

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890015
 研究課題名（和文） MSX2 拘束性ベクターによる膵癌遺伝子治療の検討
 研究課題名（英文） Development of the gene therapy against pancreatic cancer by using the MSX2-restricted vector
 研究代表者
 濱田 晋（HAMADA SHIN）
 東北大学・病院・医員
 研究者番号：20451560

研究成果の概要：

本研究により、EMT に際して MSX2 と共に誘導されるカルシウム結合蛋白 S100P が同定され、その誘導は MSX2 と同様 Smad4 依存性であった。MSX2、S100P の誘導にはいずれも新規の蛋白合成が必要であり、Smad4 の下流の標的遺伝子がこの過程に重要であると推測された。ホメオボックス遺伝子である MSX2 が膵癌において癌幹細胞の性質のひとつである抗癌剤耐性を誘導し、その過程にはトランスポーター遺伝子である ABCG2 の誘導が関わっていることが明らかにされた。プロモーター解析により MSX2 は ABCG2 の発現を直接制御していることが判明した。これらの分子機構は膵癌の新規治療標的となりうるものであると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,330,000 | 0 | 1,330,000 |
| 2008年度 | 1,350,000 | 405,000 | 1,755,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,680,000 | 405,000 | 3,085,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：MSX2, S100P, EMT, 膵癌, BMP4

1. 研究開始当初の背景

(1)膵臓癌は消化器癌の中でも特に予後不良であり、大多数の症例においては最初の診断時においてすでに門脈への浸潤や上腸間膜動脈への浸潤といった局所進展、あるいは肝転移やリンパ節転移といった遠隔転移の為に根治的手術が不可能となっている。正常組織への障害が避けられない従来の治療と比較して、より腫瘍特異的に浸潤・転移の抑制や化学療法への抵抗性を改善することを目標とした膵臓癌に対する新しい治療法の開

発が必要であると考えられる。このような膵臓癌細胞の著しい浸潤性、および化学療法への抵抗性の分子機序については様々な研究がなされている。

(2)癌細胞の浸潤・転移能については、種々のサイトカインや成長因子により誘導される epithelial-mesenchymal transition (以下 EMT) と呼ばれる機構が深く関与している。EMT は上皮系細胞において各種の刺激により上皮系マーカーの発現低下と間葉系マーカー

一の発現増加が起こり、細胞の運動能が亢進する現象である。我々のこれまでの検討により、ヒト膵癌細胞株である Panc-1 において Bone Morphogenetic Protein 4 (以下 BMP4) が EMT を誘導することが明らかとなった (Hamada S et al. J Cell Physiol. 2007 Dec; 213(3):768-74.)。この現象は BMP4 の代表的な標的遺伝子である MSX2 の誘導に依存していることが判明している。

(3)ヒト膵癌細胞株 BxPC3 を用いて MSX2 過剰発現細胞株を作成し、microarray にて遺伝子発現プロファイルを比較したところ抗癌剤耐性機構に強く関与している ATP-binding cassette transporter, G2 subfamily (ABCG2) が標的遺伝子として同定された。以上のように MSX2 は膵癌の浸潤性・抗癌剤抵抗性に寄与する重要な分子であると考えられる。我々の検討では MSX2 の発現は正常組織に比べ膵癌細胞株およびヒト膵癌検体において高いことが判明しており (Satoh K et al. Am J Pathol. 2008 Apr;172(4):926-39.)、MSX2 は腫瘍特異的な治療標的として有用であると考えられる。

(4)MSX2 は DNA 配列特異的な転写因子であり、同様に核内に存在する他の転写因子と複合体を形成し、標的遺伝子の発現を制御する。MSX2 の発現は正常組織では発生段階でその発現量が多く、成長後の組織での発現は低く抑えられている。近年の研究により正常組織および腫瘍組織での adult stem cell あるいは cancer stem cell の重要性が明らかとなっているが、膵癌における cancer stem cell の完全な同定は未だに困難である。MSX2 のように腫瘍において特異な効果を持つ転写因子が脱分化の結果として高発現しているとなれば、cancer stem cell と MSX2 の関係についても検討する必要があるものと考えられる。

2. 研究の目的

膵癌細胞の浸潤および転移の抑制、抗癌剤耐性の改善を最終目的に、EMT に際して MSX2 とともに誘導される新規遺伝子の同定、MSX2 依存性に下流の遺伝子発現を促進する制御配列の同定、MSX2 高発現細胞特異的な遺伝子発現抑制のための基礎検討を行う。

3. 研究の方法

(1)膵癌細胞株 Panc-1 において BMP4 は EMT を誘導することが判明している。この系を用いて microarray を行い、MSX2 とともに誘導され、EMT に寄与する新規遺伝子を同定した。新たに BMP 標的遺伝子として同定されたカルシウム結合蛋白 S100P の機能については siRNA を用いたノックダウン実験により検討

した。

(2)S100P と MSX2 の BMP による誘導形式は cycloheximide 処理およびレポーターアッセイを用いて比較検討した。定型的な Smad4 依存性のシグナルが S100P の誘導に寄与するかについては siRNA を用いたノックダウンの系にて検討した。

(3)ヒト膵癌細胞株及びヒト正常膵管上皮細胞株を用いて、MSX2 発現レベルと ABCG2 発現レベルをリアルタイム PCR にて比較した。MSX2 低発現細胞株である BxPC3 を用いて MSX2 強制発現細胞株 B7、B21 を樹立。ABCG2 発現レベルをリアルタイム PCR および FACS にて比較した。また、MSX2 高発現細胞株である Panc-1 を用いて MSX2 ノックダウン細胞株 215 を樹立。同様に ABCG2 発現レベルを比較した。MSX2 強制発現細胞株におけるゲムシタビン感受性を MTT アッセイにて検討した。

(4)MSX2 による ABCG2 遺伝子の発現制御機構を検討するため、ABCG2 遺伝子の転写開始点より上流 1kb までの DNA 配列を National Center for Biotechnology Information のデータベースより入手し、MatInspector (Genomatix Software GmbH, München, Germany) を用いて MSX2 consensus binding element の同定を行った。レポーターベクターには PCR にて増幅した ABCG2 遺伝子のプロモーター領域をサブクローニングし、種々の deletion construct を作成した。MSX2 発現ベクターとの co-transfection により、各々のレポーターベクターの活性化を検討した。

4. 研究成果

(1)膵癌細胞株 Panc-1 において BMP4 により誘導される遺伝子群を microarray を用いて解析した結果を以下に示す (図 1)。

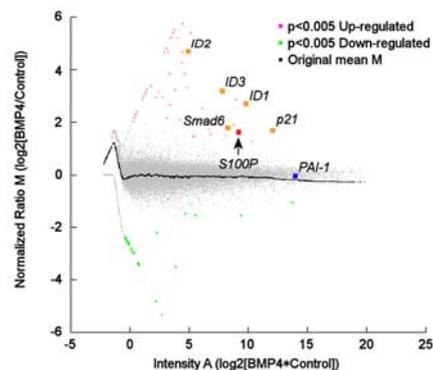


図 1

従来より BMP 標的遺伝子として報告されている ID1, ID2, ID3, p21, Smad6 が抽出されていたが、それらと共にカルシウム結合蛋白である S100P が標的遺伝子として同定された。

典型的な TGFβ 標的遺伝子である PAI-1 は有意な発現レベルの変動を認めなかった。BMP4により Panc-1で誘導される EMTに S100Pが寄与しているかを S100P 特異的な siRNAを用いて検討した。以下に示すように、S100Pのノックダウンにより BMP4による EMTが抑制されることが判明した(図2)。

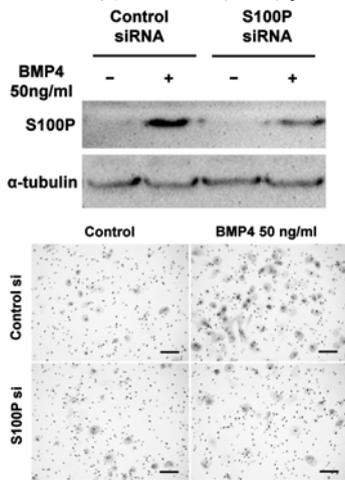


図 2

(2) BMP4による S100P及びMSX2の誘導機構の詳細について、cycloheximide 処理にて検討したところ、S100P及びMSX2の誘導には de novo の蛋白合成が必要であることが明らかとなった(図3)。

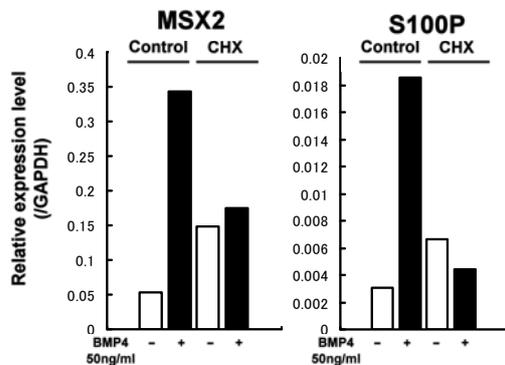


図 3

S100Pのプロモーター解析では図4に示すように、転写開始点上流-171~-138bpに重要な制御領域が存在すると考えられた。

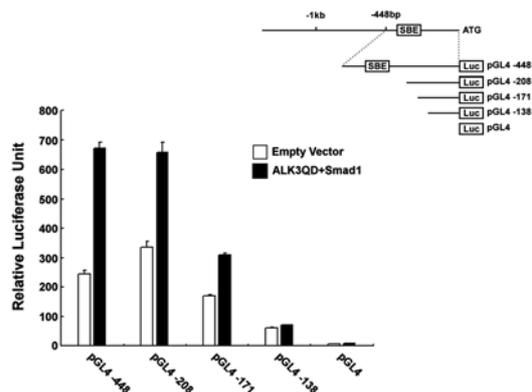


図 4

この領域には Smad-binding element (SBE)が存在しないため、Smad4 安定ノックダウン細胞株 643S4si、1446S4siを樹立し、定型的な Smad4 依存性のシグナルの S100P 誘導への寄与を検討した。以下に示すように、Smad4ノックダウン細胞株では BMP4による S100Pの誘導は抑制されていた(図5)。

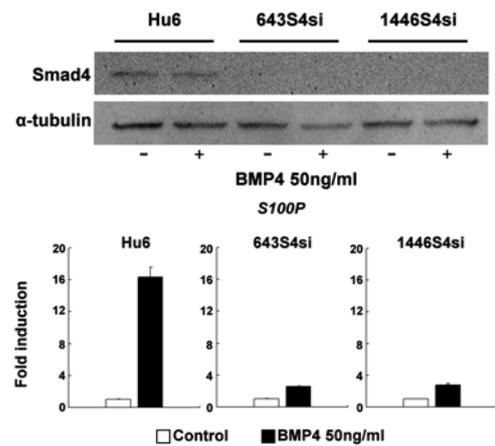


図 5

以上より、MSX2およびS100Pの誘導には定型的な Smad4 依存性のシグナルにより誘導される未知の因子が必要であると考えられ、新たな治療標的となる可能性が考えられた。以上の知見については Hamada S et al. Cancer Sci. 2009 Jan;100(1):103-10.にて論文を発表し、学会においても報告を行った。現在は MSX2、S100Pの転写を直接制御する因子の同定を目的に検討を進めている。

(3) ABCG2発現レベルをリアルタイムPCRを用いて各種細胞間で比較したところ、以下のような結果が得られた(図6)。

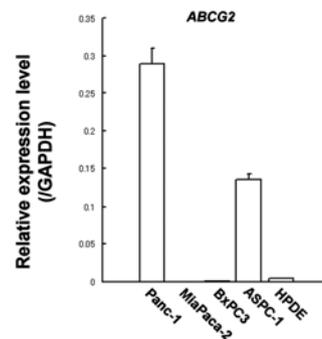


図 6

以前の報告では Panc-1 および ASPC-1 は MSX2 高発現細胞株であり、BxPC3 および MiaPaca-2 は MSX2 低発現細胞株であった。MSX2 の発現レベルと ABCG2 の発現レベルに関連が予測さ

れたため、BxPC3にMSX2を過剰発現させ、MSX2安定発現細胞株 B7、B21 を樹立した。B7 とコントロール細胞株である B3EV を microarray にて比較したところ、以下のようにトランスポーター遺伝子である ABCG2 が有意に発現上昇している遺伝子として同定された (図 7)。

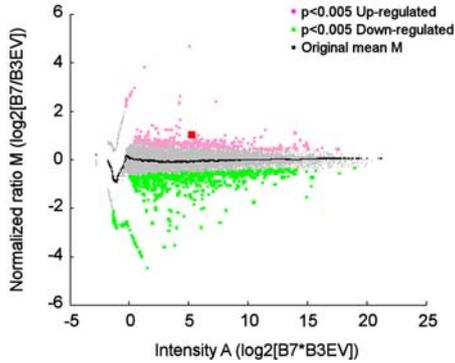


図 7

以上の知見に基づき、B3EV と B7、B21 細胞株における ABCG2 発現レベルをリアルタイム PCR と FACS にて検討した。図 8 に示すように B7、B21 細胞株での ABCG2 発現は上昇しており、FACS の結果でも ABCG2 陽性細胞の率が増加していることが確認された (表 1)。

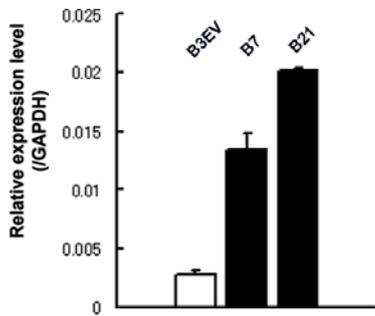


図 8

ABCG2 positive cells;

| | |
|------|---------------|
| B3EV | 1.66 ± 0.06% |
| B7 | 8.49 ± 0.30% |
| B21 | 30.14 ± 0.44% |

N=3

表 1

これとは逆に、Panc-1 と MSX2 siRNA 発現ベクターを用いて安定 MSX2 ノックダウン細胞 215 を樹立。同様にリアルタイム PCR と FACS にて ABCG2 発現レベルを検討した。図 9 と表 2 に示すように、コントロール細胞株 Hu6 に比較して 215 細胞株では ABCG2 発現レベルが低下しており、FACS にて ABCG2 陽性細胞の割

合も減少していた。

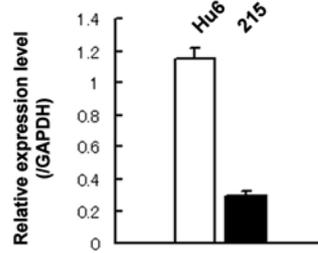


図 9

ABCG2 positive cells;

| | |
|-----|--------------|
| Hu6 | 6.77 ± 0.22% |
| 215 | 0.71 ± 0.12% |

N=3

表 2

MSX2 強制発現細胞株において、ゲムシタビンに対する感受性を MTT アッセイにより検討した。図 10 に示すように、MSX2 強制発現によりゲムシタビン耐性が誘導されることが確認された。

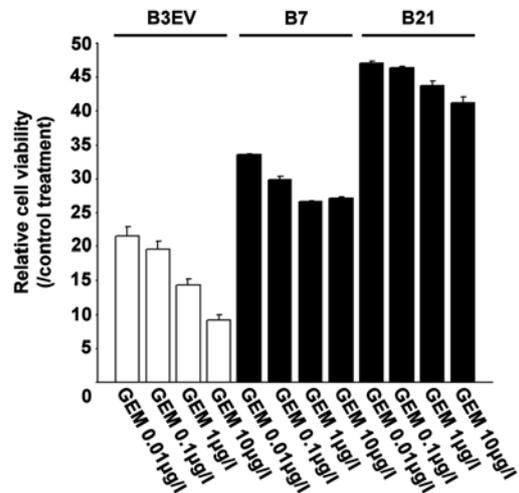


図 10

MSX2 による ABCG2 の転写制御機構を詳細に解析するため、データベース解析を行った。その結果、ABCG2 の転写開始点より 1kb 上流までの DNA 配列中に 6 箇所の MSX2 consensus binding sequence が同定された。MSX2 による転写制御の詳細は図 11 に示すごとく、レポーターアッセイにて検討した。細胞株には内因性に MSX2 および ABCG2 を発現していないヒト正常膀胱上皮細胞株 HPDE を用いた。転写開始点上流 1kb までの配列を含むレポーターを元に図の如く deletion construct を

作成したが、転写開始点上流 400bp までの deletion construct にて MSX2 による転写活性化が有意に低下し、この近傍に存在する 2 つの MSX2 consensus binding sequence が ABCG2 の転写制御に重要であると考えられた。

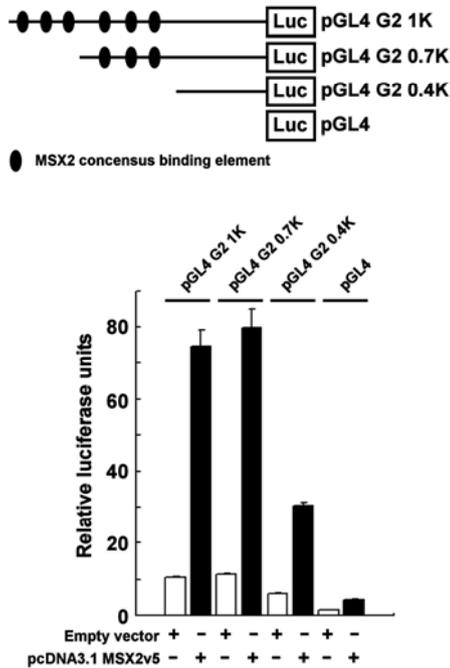


図 11

MSX2 による ABCG2 の発現制御機構は抗癌剤耐性の克服に際し有用な治療標的となるものと考えられる。現在、ABCG2 の発現制御領域の構造について更なる解析を進めており、ABCG2 の発現制御に関わる他の分子の同定も合わせて行う方針である。これらの知見については 2009 年中に日本消化器病学会総会、JDDW において学会発表を予定している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Hamada S, Satoh K, Hirota M, Fujibuchi W, Kanno A, Umino J, Ito H, Satoh A, Kikuta K, Kume K, Masamune A, Shimosegawa T.,
Expression of the calcium-binding protein S100P is regulated by bone morphogenetic protein in pancreatic duct epithelial cell lines.
Cancer Sci., Jan;100(1), 103-110, 2009,
査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 濱田晋 佐藤賢一 廣田衛久 下瀬川徹
膵癌における新規 BMP 標的遺伝子の同定と

EMT 誘導過程への寄与について

第 16 回浜名湖シンポジウム、2008 年 12 月 20 日、浜松

② 濱田晋 佐藤賢一 廣田衛久 菅野敦海野純 伊藤広通 下瀬川徹
膵癌細胞株における BMP4 によるカルシウム結合蛋白 S100P の発現誘導とその機能についての検討

JDDW 2008、2008 年 10 月 3 日、東京

③ 濱田晋 佐藤賢一 廣田衛久 菅野敦海野純 伊藤広通 下瀬川徹
ヒト膵癌細胞株における Bone morphogenetic protein 4 による EMT 誘導経路の検討

第 94 回日本消化器病学会総会、2008 年 5 月 8 日、福岡

④ Hamada S et al.

Comprehensive analysis of BMP target gene in pancreatic cancer cell line and its functional role during cancer cell migration.

2008 AACR Annual Meeting, 2008 年 4 月 15 日, San Diego, U.S.A

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 晋 (HAMADA SHIN)
東北大学・病院・医員
研究者番号：20451560

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者