

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17609

研究課題名(和文) NADPH oxidase 5とROSの細胞内輸送による大腸癌進展機序の解明

研究課題名(英文) The role of NADPH oxidase 5 and intracellular transportation of ROS in tumor progression of colon cancer

研究代表者

清水 浩紀 (Shimizu, Hiroki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00756827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト大腸癌細胞株を使用し、活性酸素種(ROS)の産生に関するNADPH oxidase 5 (NOX5)遺伝子発現を抑制したところ細胞増殖、細胞周期、細胞遊走浸潤能が抑制されることを見出した。またマイクロアレイ解析にてNOX5遺伝子発現の抑制により細胞周期に関する遺伝子が数多く変化していることを確認した。細胞外ROS(過酸化水素)濃度はNOX5遺伝子発現により明らかな変化はなく、今回の一連結果は細胞外ROS濃度変化とは別機序でシグナル伝達変化が起きていると考えられた。以上結果は、学会や論文にて発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はヒト大腸癌細胞株を使用し、近年注目されている活性酸素種産生に関するNOX5の大腸癌における発現・機能の解析を行い、大腸癌進展への関与を解明した初めての報告である。また、我々はヒト大腸癌組織でもNOX5発現が高度であれば予後不良となることをこれまでに確認、報告している。今後、さらに研究を進めることによりNOX5機能の制御が新たな大腸癌治療としての標的となる可能性を秘めており、学術的・社会的意義は大きいものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the relationship between NOX5 and cancer development using an in vitro model. Real-time quantitative PCR was performed to determine the NOX5 expressions levels of colon cancer cell lines. NOX5 knockdown experiments were conducted, and the impact on cell proliferation, migration, and invasion were analyzed. In addition, mRNA microarray was conducted to assess changes in gene profile. NOX5 mRNA expression was high in HCT116 cells and moderate in SW48 cells. NOX5 knockdown significantly inhibited cell migration and invasion in both HCT116 and SW48 cells; however, NOX5 knockdown reduced cell proliferation in only HCT116 cells. mRNA microarrays showed a strong relationship between NOX5 expression levels and integrin-linked kinase signaling pathways. The NOX5 expression in colon cancer cells affects cancer progression, especially cell motility. NOX5 may be a novel therapeutic target for the future development of treatments for colon cancer.

研究分野：Molecular biology of gastrointestinal cancer

キーワード：大腸癌

## 1. 研究開始当初の背景

進行再発大腸癌の治療成績は、近年いくつかの分子標的薬の出現により向上しており、更に新たな分子標的薬の研究、開発が望まれる。NADPH oxidase (NOX) family は NOX1-5 と DUOX1-2 の 7 つより成り、細胞膜間での電子輸送により reactive oxygen species (ROS) を産生する膜タンパクである (Physiol Rev. 2007;87,245-313)。ROS は正常細胞と比較して癌細胞で多く産生されており、細胞内シグナル伝達に作用して増殖、分化、細胞死のみならず VEGF を介した腫瘍血管新生による癌進展に關与することが知られている (Cancer Res.2007;67,10823-30)。

NOX5 は 2001 年に初めて報告され (J Biol Chem.2001; 276,37594-601) NOX1-4 と異なって Ca 依存性であり細胞内 Ca 濃度上昇により ROS ( $H_2O_2$ ) 産生が亢進されることが知られている (J Biol Chem.2004;279,18583-91)。悪性腫瘍における NOX5 の細胞内シグナル制御を含めた分子生物学的機能については、食道癌 (Cancer Res.2010;70,1247-55)、前立腺癌 (Mol Carcinog.2016;55,27-39)、悪性リンパ腫 (Free Radic Biol Med.2015;84,22-29) 乳癌 (Exp Cell Res.2017;351,51-58) 悪性黒色腫 (Mol Carcinog.2017;56,2643-62) において報告はあるが数少なく、その詳細な機序については明らかになっていないのが現状である。これまで大腸癌における NOX5 の発現については、Tissue microarray にて約 60% のヒト大腸癌検体において高発現であった (Free Radic Biol Med.2013;65,497-508) との報告があるのみであったが、我々は最近、ヒト大腸癌組織における NOX5 の発現解析を行い、正常組織と比較して高発現であり、NOX5 高発現の症例において 5 年無再発生存率が有意に不良であることなどを報告してきた (Anticancer Res.2019;39,4405-10)。一方、大腸癌において、NOX1 を介した ROS が癌進展に關与していることはこれまでに報告 (J Bio Chem. 2017;292,7866-87) があるが、NOX5 は NOX1 と異なり Ca 依存性であり、その分子生物学的な機能解析についての報告はない。これまでに我々は、大腸癌細胞株 10 種を用い、Western blotting 法にてそれぞれの細胞株における NOX5 のタンパク発現程度について確認している。更に、NOX が産生した ROS の細胞内輸送については水輸送チャネルタンパクとして知られる aquaporin (AQP) の役割について報告があり、肺癌細胞株において AQP3 が  $H_2O_2$  を細胞内輸送し、EGF-EGFR 細胞シグナル伝達に關与する (Biochem Biophys Res Commun.2016;471,603-9)。大腸正常粘膜上皮においても、AQP3 により  $H_2O_2$  が細胞内輸送されるとの報告がある (PNAS.2017;114,568-73)。研究代表者らは、これまでに膜輸送タンパクである AQP5 (2014, J Gastroenterol) anion exchanger (2017, Oncotarget) ならびに  $Na^+/H^+$  exchanger (2017, Oncotarget) に着目し、食道癌での癌進展に關与することを報告してきた。しかし、大腸癌のみならず癌進展における NOX5、ROS と膜輸送タンパクの關連性に着目した研究はこれまで報告されていない。

## 2. 研究の目的

以下の二つの仮説を証明することを目的とした。

NOX5 は大腸癌に高発現し、NOX5 により増産された ROS が膜輸送タンパクを介して細胞内に輸送され、癌進展に關与する細胞内シグナル伝達経路へ介入する。

NOX5 の機能ならびにその産生する ROS の輸送機能を阻害することで、大腸癌進展

を抑制することができる。

### 3. 研究の方法

#### 1、ヒト大腸癌細胞株における NOX5 の発現・機能解析

当研究室で保有している 10 種のヒト大腸癌細胞株における NOX5 のタンパク発現レベルをウェスタンブロット法、mRNA 発現レベルを定量的 RT-PCR にて確認する。NOX5 高発現株を用い、NOX5 の RNA 干渉 (siRNA) による細胞増殖解析 (MTT 法)、細胞周期解析 (フローサイトメトリー; PI 染色)、細胞死解析 (フローサイトメトリー; PI/アネキシン V 二重染色)、細胞遊走・浸潤能解析 (ボイデンチャンバー法) を行うとともに、細胞外 ROS ( $H_2O_2$ ) 濃度を測定する (The Amplex<sup>®</sup> Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit)。

#### 2、ヒト大腸癌細胞における NOX5 の RNA 干渉下での網羅的遺伝子解析

NOX5 高発現のヒト大腸癌細胞株を用い、NOX5 siRNA によるトランスフェクションを行って遺伝子発現プロファイルの変化をマイクロアレイ法にて網羅的解析する。解析ソフトには Ingenuity<sup>®</sup> Pathway Analysis を用いる。

#### 3、NOX5 発現変化を介し、大腸癌進展に関連した細胞内シグナル伝達機構の解明

上記 2 の解析より上記 1 で有意差を得られた事象に關与する候補遺伝子をいくつか選択し、マイクロアレイ結果の再現性を定量的 RT-PCR により確認する。NOX5 siRNA によるトランスフェクションの結果、候補タンパク発現の変化についてウェスタンブロット法にて確認し、NOX5 が關与する大腸癌進展に関連した細胞内シグナル伝達機構について検討する。

### 4. 研究成果

ヒト大腸癌細胞株 10 種を使用し、NOX5 のタンパクならびに mRNA 発現レベルを確認し、高発現株の HCT116、中等度発現株の SW48 を以後の機能解析に用いた。NOX5 siRNA を用いたトランスフェクションにて、両細胞株においてタンパク、mRNA レベルでのノックダウンを Western blot、qRT-PCR にて確認した。抗 NOX5 抗体は 2 種使用し、結果に相違ないことを確認した。NOX5 高発現株である HCT116 においてはノックダウンにて細胞増殖、細胞周期が有意に抑制されたが、NOX5 中等度発現株である SW48 では有意変化を認めなかった。遊走・浸潤能は両細胞株において有意にノックダウンにより有意に抑制された。また、ヒト組織標本での NOX5 タンパクの免疫染色にて癌部と比較して正常部での NOX5 発現が低発現であることを確認した。

NOX5 高発現株である HCT116 細胞を用いて NOX5 siRNA によるトランスフェクションを行い、遺伝子発現プロファイル変化をマイクロアレイ法にて網羅的に解析した (IPA software を使用)。遺伝子がノックダウンにより 1.4 倍以上変化した約 4000 遺伝子を解析した結果、ILK signaling pathway に関わる遺伝子発現の多くが有意に変化していることが判明した。そのいくつかの遺伝子 (ITGA2, GSK3B, JUN, FOS) を抽出して qRT-PCR によるバリデーションを行い、マイクロアレイ結果と同様であることを確認した。ITGA2 についてはウェスタンブロット法でも同様結果を確認した。さらに細胞遊走・浸潤能との関連性について報告がある plasminogen activator urokinase (PLAU) もマイクロアレイにて有意な変化 (ノックダウンにて -4.61 倍) を示しており、バリデーションにて同様の結果を確認した。また、NOX5 siRNA によるトランスフェクションにて HCT116、

SW48 両細胞株における ROS の 1 種である過酸化水素の細胞外濃度変化を測定し、コントロールと比較して有意差がないことを確認した(今回の一連結果は細胞外 ROS 濃度変化とは別機序でシグナル伝達変化が起きていると考えられた。)

以上結果は、2020 年第 79 回日本癌学会総会で発表、International Journal of Oncology に投稿し受理された。(Ashizawa N, Shimizu H, et al. NADPH oxidase 5 has a crucial role in cellular motility of colon cancer cells. Int J Oncol. 2021 Aug;59(2):63. doi: 10.3892/ijo.2021.5243. Epub 2021 Jul 19.)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

|  |                  |
|--|------------------|
| 1. 著者名<br>NAOKI ASHIZAWA, HIROKI SHIMIZU, KATSUTOSHI SHODA, SHINJI FURUYA, HIDENORI AKAIKE, NAOHIRO HOSOMURA, YOSHIHIKO KAWAGUCHI, HIDETAKE AMEMIYA, HIROMICHI KAWAIDA, MAKOTO SUDO, SHINGO INOUE, HIROSHI KONO, KEITA KATSURAHARA, ATSUSHI SHIOZAKI, DAISUKE ICHIKAWA | 4. 巻<br>59       |
| 2. 論文標題<br>NADPH oxidase 5 has a crucial role in cellular motility of colon cancer cells   | 5. 発行年<br>2021年  |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Oncology  | 6. 最初と最後の頁<br>63 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3892/ijo.2021.5243. Epub 2021 Jul 19   | 査読の有無<br>有       |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-        |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>清水浩紀   |
| 2. 発表標題<br>The Significant Oncologic Role of NOX5 in Colon Cancer |
| 3. 学会等名<br>第79回日本癌学会総会  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|