

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 10 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380194

研究課題名（和文） 造血系悪性腫瘍における低酸素反応性とアポトーシス耐性獲得機構の分子解析

研究課題名（英文） Molecular analysis of resistant mechanisms against both hypoxic and pro-apoptotic stimulation in malignant hematopoietic cell tumors.

研究代表者

田中あかね（TANAKA AKANE）

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：80418673

研究成果の概要（和文）：細胞の癌化過程で最も深刻な悪性獲得形質は、細胞の無秩序な増殖能と細胞死シグナルの無能力化によるアポトーシス耐性能である。本研究では、造血系悪性腫瘍細胞におけるミトコンドリア由来内因性アポトーシス経路の無能力化機構および低酸素環境下での細胞機能維持機構を解析し、殺癌より制癌作用を発揮する分子標的薬の探索を行い、NF- κ B の活性化によりアポトーシス耐性が誘導されるメカニズムや低酸素反応性因子（HIF）とのクロストークに関して解析した。

研究成果の概要（英文）：The malignant acquired character that is the most serious in the tumor development of the cell is the abnormal proliferation and apoptosis resistance by the disablement of the cell death signal. In this study, I analyzed the disablement mechanism of the endogenous apoptotic process dependent on the mitochondria in the haematopoietic malignant tumor and cell function maintenance mechanism under the hypoxia environment. I also searched for the molecular target medicine which showed anti-cancer property. The crosstalk of the hypoxia-inducible factor (HIF) and NF- κ B resulting in apoptosis resistance was investigated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学、獣医学

キーワード：肥満細胞腫、リンパ腫、白血病、伴侶動物、細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

ヒトと同様にイヌなどの伴侶動物医療においても、近年悪性腫瘍の発生頻度が著しく上昇し、個体死因のトップとなっている。小動物臨床現場における悪性腫瘍への主なア

プローチは、1) 可能な限り早期の広範な外科的切除、2) 化学療法、3) 放射線療法などであるが、いずれも癌細胞を根絶することを目的としている。リンパ腫・白血病・肥満細胞腫に対し、様々な多剤併用化学療法が試

みられているが、癌細胞の殺滅を目指す多くの化学療法剤には避けることの出来ない副作用が存在する。また動物医療における抗癌化学療法は、施設や医療体制の整備不足から、必ずしも十分な薬物効果を得られない事も多い。しかしながら、ヒトに比べ寿命の短い伴侶動物において、不幸にして悪性腫瘍に罹患しても、腫瘍細胞の増殖・浸潤・転移を遅延し、苦痛や臓器機能不全を軽減できれば、腫瘍と共存しながら寿命を全うすることが可能となる。このような観点から申請者は、基盤研究(B)(平成18-20年度)において、造血系悪性腫瘍の細胞周期調節メカニズムを解析することで腫瘍性増殖制御法開発に取り組み、有糸分裂チェックポイントの中でも主としてG1期からS期への移行を制御する細胞周期調節分子群の発現制御についての研究を遂行してきた。上記の研究を遂行する過程で、NF- κ B経路の恒常的活性化によるアポトーシス耐性能の獲得や低酸素反応性(酸素濃度の低い細胞にとって劣悪な環境でも癌細胞が細胞機能を失わない性質)の獲得が、細胞周期の無秩序な進行と連動しながら、しかしながら異なるメカニズムで、腫瘍性増殖の根幹を支えていることを見いだした。そこで、これらの知見や予備データをもとに、造血系悪性腫瘍研究をさらに発展させ、1)ミトコンドリア由来の内因性アポトーシス制御機構におけるBcl-2ファミリータンパクの発現動態、および、2)低酸素反応性因子(HIF)とNF- κ Bのクロストークによる相乗的機能増強機構を解明することで、殺滅ではなく制癌作用を期待できる治療標的分子の探索を行い、伴侶動物にやさしい新たな癌制御法を提唱することを目指した。

2. 研究の目的

(1)ミトコンドリア由来内因性アポトーシス制御分子の探索

Bcl-2ファミリータンパクは、ミトコンドリアに存在しアポトーシスを制御する分子として知られるが、アポトーシスを抑制するタンパク群(Bcl-2・Bcl-xL・Mcl-1など)と、直接アポトーシスを促進するタンパク群(Bax・Bakなど)および間接的にアポトーシスを促進するタンパク群(BH3-onlyタンパク)が存在し、これらの分子が複雑に制御されて細胞死が調節されている。癌細胞では、この調節機構に破綻があると考えられており、すでに申請者は肥満細胞腫におけるMcl-1の過剰発現とそれに対応するBH3-onlyタンパクの発現低下を見いだした。これを発展させ、造血系悪性腫瘍におけるアポトーシス抑制性および促進性Bcl-2ファミリー分子の相互関係をウェスタンブロット法や免疫沈降法にて明らかにするとともに、遺伝子導入法で制御実験を実施する。

(2)低酸素反応性因子(HIF)およびその制御分子の解析

HIFには、様々な細胞に広範に発現するHIF-1と低酸素刺激にともなって発現するHIF-2が存在するが、いずれもその活性化によって血管内皮成長因子(VEGF)や線維芽細胞増殖因子(FGF)などの血管新生作用因子の発現が亢進する。通常HIFには抑制因子が作用し、過剰な血管新生を防いでいるが、癌細胞ではHIF抑制因子の機能不全が示唆される。すでに申請者は、ラットにHIF-2抑制因子をsiRNAでサイレンシングすることにより、局所血管新生が促進されることを見いだし、これを発展させ、HIF特異的な抑制因子を癌細胞に遺伝子導入し、低酸素環境下における反応性を調べるとともに、in vivoでの血管新生抑制作用を検討する。

(3)NF- κ B活性化の遺伝子操作(過剰発現やサイレンシング)による細胞内発現分子解析

正常細胞にNF- κ B構成分子(p65およびp50)を過剰発現させる、あるいは、内因性NF- κ B抑制因子であるI κ B α をsiRNAでサイレンシングすることにより細胞周期調節タンパク・アポトーシス調節タンパク・低酸素反応性因子・癌抑制因子などの発現動態の変化を解析し、正常細胞が癌化してゆく過程におけるNF- κ Bの直接的または間接的役割を明らかにする。

(4)免疫不全マウス実験系における分子操作試験(標的分子操作の前臨床試験)
免疫不全マウスの担癌モデルを用いて、標的分子のsiRNAによる遺伝子サイレンシングや抑制遺伝子の導入が腫瘍形成や拡大に及ぼす影響を調べ、副作用のない制癌標的分子を探索する。

3. 研究の方法

(1)Bcl-2ファミリータンパクの発現と相互作用の解析

イヌ及びヒトの造血系悪性腫瘍細胞株に関して、様々なBcl-2ファミリータンパクの発現動態とその相互作用を調べた。具体的には、以下の計画に沿って研究を実施した。

- ・ウェスタンブロット法および免疫染色法で網羅的に発現を評価
- ・免疫沈降法により経時的な分子結合やその乖離を評価し、細胞種による主たるアポトーシス抑制性及び促進性Bcl-2ファミリータンパクの組み合わせを探索

(2)低酸素反応性遺伝子解析

イヌ及びヒトの造血系悪性腫瘍細胞株を正常酸素濃度下または低酸素濃度下で培養し、低酸素反応性因子(HIF)の発現や関連遺伝子の発現動態を調べた。また、シグナル伝達経路の阻害により、低酸素濃度下における反応がどのようなカスケードで誘導されるの

かを調べた。さらに、移植実験系とレーザードップラー血流画像化装置を用いて、経時的に移植した癌組織における血流量の変化を調べるとともに、移植マウスから様々なタイミングで腫瘍サンプルを採取して低酸素反応性転写因子群 (HIF) やその制御下にある血管増殖因子などの発現動態を検索した。

- ・低酸素培養による発現因子のリアルタイム PCR 及びウェスタンブロット解析
- ・レーザードップラーによる移植腫瘍組織の経時的血流量変化の測定
- ・経時的な腫瘍サンプルの採取とリアルタイム PCR 法やジーンチップ・プロテインチップ法による低酸素反応性因子群発現動態の網羅的解析

4. 研究成果

2009年度

(1) Bcl-2ファミリータンパクの発現と相互作用の解析

- ① イヌ及びヒトの造血系悪性腫瘍細胞株に関して、様々なBcl-2ファミリータンパクの発現動態とその相互作用を、ウェスタンブロット法、免疫沈降法、免疫染色法を用いて解析し、細胞種による主たるアポトーシス抑制性及び促進性Bcl-2ファミリータンパクの組み合わせを探索した。
- ② 特に肥満細胞腫瘍では、細胞周期調節因子サイクリンD3が高発現しており、そこにサイクリン依存性キナーゼ2あるいは4が結合して細胞周期を進行させていること、およびアポトーシス抑制性Bcl-2ファミリータンパクのうち特にMc1-1の発現が高いことなどが、動物種を問わず確認された。

(2) 低酸素反応性遺伝子解析

- ① 造血系悪性腫瘍細胞株を正常酸素濃度下または低酸素濃度下で培養し、低酸素反応性因子 (HIF) の発現や関連遺伝子の発現動態を調べた。
- ② シグナル伝達経路の阻害により、低酸素濃度下における反応がどのようなシグナルカスケードで誘導されるのか、プロテインアレイ法で解析している。さらに、免疫不全マウスを用いた移植実験系とレーザードップラー血流画像化装置を用いて、経時的に移植した癌組織における血流量の変化を調べるとともに、移植マウスから様々なタイミングで腫瘍サンプルを採取して低酸素反応性転写因子群 (HIF) やその制御下にある血管増殖因子などの発現動態を網羅的に解析した。
- ③ 得られた成果は第148回日本獣医学会で発表するとともに、学術雑誌に論文として掲載され、さらに学術論文として発表

した。

2010年度

- (1) Bcl-2ファミリータンパクの制御研究
- ① 造血系悪性腫瘍細胞株を用いて、発現の亢進するアポトーシス抑制性Bcl-2ファミリータンパクや、それに対応するアポトーシス抑制性BH3-onlyタンパクに関し、細胞周期進行やアポトーシス耐性への関与を解析した。
 - ② 肥満細胞腫で特に発現が亢進するCyclin D3について、数種のsiRNAを作製し、予備試験を実施、阻止効率の高いsiRNAを選択している。
 - ③ 本学動物医療センターにて、臨床症例から提供を受けた造血系悪性腫瘍組織におけるBcl-2ファミリータンパクの発現プロファイルを解析した。

(2) 低酸素反応性分子及び関連因子の発現動態解析

- ① HIFに対するsiRNAを設計、低酸素濃度下のin vitro実験系に導入してHIF抑制効果を確認した。また、当該siRNAがin vivoでも効果を発揮することをマウスやラットのモデルで確認した。
- ② 免疫不全マウスへの移植実験系を用いて、経時的に癌組織における血流量の変化や浸潤3)拡大動態を、経時的に調べた。また、様々なタイミングで腫瘍サンプルを採取して低酸素反応性転写因子群やその制御下にある血管内皮増殖因子などの発現動態をクロマチン免疫沈降法やリアルタイムRT-PCR法で検索し、血管新生にbFGFやHGFの発現が重要な役割を果たしていることを突き止めた。

2011年度

- (1) Bcl-2ファミリータンパクの制御研究
- ① 造血系悪性腫瘍細胞株を用いて、発現の亢進するアポトーシス抑制性Bcl-2ファミリータンパクや、それに対応するアポトーシス抑制性BH3-onlyタンパクに関し、細胞周期進行やアポトーシス耐性への関与を解析し、肥満細胞腫株では、Mc1-1の発現亢進とMc1-1と結合してその機能を抑制するBimの発現低下が認められ、これが無秩序な細胞周期進行に関与している可能性が示された。
 - ② 細胞死誘導効果が比較的強く細胞周期停止効果の高い標的分子としてD型サイクリンに着目し、その活性を阻害したところ、肥満細胞腫細胞の増殖が抑制された。
 - ③ 細胞株を用いて得られた結果を自然発症例でも起こっている事象であることを確認するために、本学動物医療センターに

て、臨床症例から提供を受けた肥満細胞腫組織におけるBcl-2ファミリータンパクの発現プロファイルを解析し、同様の結果を得た。

- ④ グルココルチコイド感受性に関する転写制御について、肥満細胞腫細胞を用いて検討したところ、NF- κ Bの活性化とこれに連動するスプライシング因子SRp30cにより調節されていることがわかった。

(2) 低酸素反応性分子及び関連因子の発現動態解析

- ① 肥満細胞の低酸素培養を行い、経過時間的に細胞増殖や分化程度を調べた。この実験は現在まだ継続中であり、浮遊性の肥満細胞を低酸素培養することで接着性となり、接着因子の発現プロファイルに変化が起こることを突き止めた。
- ② 免疫不全マウスへの腫瘍細胞移植実験系を用いて、経時的に癌組織における血流量の変化や浸潤・拡大動態を経時的に調べた。また、様々なタイミングで腫瘍サンプルを採取して低酸素反応性転写因子群やその制御下にある血管内皮増殖因子などの発現動態をクロマチン免疫沈降法やリアルタイムRT-PCR法などで検索、FGFやHGFの高発現を確認した。

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 8 件)

- ① Jung K, Tanaka A, Fujita H, Matsuda A, Oida K, Karasawa K, Okamoto N, Ohmori K, Jee Y, Shin T, Matsuda H. Peroxisome proliferator-activated receptor γ -mediated suppression of dendritic cell function prevents the onset of atopic dermatitis in NC/Tnd mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2011, 127:420-429. 査読あり
DOI: 10.1016/j.jaci.2010.10.043
- ② Okamoto N, Tanaka A, Jung K, Karasawa K, Orito K, Matsuda A, Amagai Y, Oida K, Ohmori K, Matsuda H. Silencing of *Int6* gene restores function of the ischemic hindlimb in a rat model for peripheral arterial disease. *diavasc Res.* 2011, 92:209-217. 査読あり
DOI: 10.1093/cvr/cvr203
- ③ Matsuda A, Tanaka A, Amagai Y, Ohmori K, Nishikawa S, Xia Y, Karasawa K, Okamoto N, Oida K, Jang H, Matsuda H. Glucocorticoid sensitivity depends on expression levels of

glucocorticoid receptors in canine neoplastic mast cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011, 144:321-328. 査読あり

DOI: 10.1016/j.vetimm.2011.08.013

- ④ Furusaka T, Tanaka A, Matsuda H, Ikeda M. Consecutive daily low-dose S-1 adjuvant chemotherapy after radical treatment for squamous cell carcinoma in head and neck cancer. *Acta Otolaryngol.* 2011, 131:1099-1103. 査読あり

DOI: 10.3109/00016489.2011.590153

- ⑤ Tanaka A, Nomura Y, Matsuda A, Ohmori K, Matsuda H. Mast cells function as an alternative modulator of adipogenesis through 15-deoxy-delta-12, 14-prostaglandin J2. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011, 301:C1360-1367. 査読あり

DOI: 10.1152/ajpcell.00514.2010

- ⑥ Matsuda A, Tanaka A, Muto S, Ohmori K, Furusaka T, Jung K, Karasawa K, Okamoto N, Oida K, Itai A, Matsuda H. A novel NF-kappaB inhibitor improves glucocorticoid sensitivity of canine neoplastic lymphoid cells by up-regulating expression of glucocorticoid receptors. *Res Vet Sci.* 2010, 89:378-382. 査読あり

DOI: 10.1016/j.rvsc.2010.03.017

- ⑦ Ohmori K, Tanaka A, Makita Y, Takai M, Yoshinari, Y, Matsuda H. Pilot evaluation of the efficacy of shampoo treatment with ultra-pure soft water for canine pruritus. *Vet Dermatol.* 2010, 21:477-483. 査読あり

DOI: 10.1111/j.1365-3164.2010.

00900.x

- ⑧ Tanaka A, Jung K, Benyacoub J, Prioult G, Okamoto N, Ohmori K, Blum S, Mercenier A, Matsuda H. Oral supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 prevents development of atopic dermatitis in NC/NgaTnd mice possibly by modulating local production of IFN-gamma. *Exp Dermatol.* 2009, 18:1022-1027. 査読あり

DOI: 10.1111/j.1600-0625.2009.

00895.x

[学会発表] (計 7 件)

- ① XXII World Allergy Congress. Metallic soap aggravates skin conditions in patients with atopic dermatitis and a mouse model for human atopic derm

atitits, NC/Tnd mice. 2011年12月9日
メキシコ・カンクン

- ② 1st Biohousing International Symposium (招待講演) Expression levels of glucocorticoid receptors correlated with glucocorticoid sensitivity in mast cell tumors. 2011年9月30日 韓国・グアンジュ
- ③ 22nd World Congress of Dermatology (招待講演) Expression levels of glucocorticoid receptors correlated with glucocorticoid sensitivity in mast cell tumors 2011年5月28日 韓国・ソウル
- ④ Skin Allergy Meeting 2010. PPAR γ -mediated suppression of dendritic cell function prevents the onset of atopic dermatitis in NC/NgaTnd mice. 2010年11月12日 イタリア・ベニス
- ⑤ 第148回日本獣医学会学術集会 リンパ腫／白血病細胞におけるグルココルチコイド耐性獲得機構における転写因子NF- κ Bの関与 平成21年9月26日 鳥取県鳥取市
- ⑥ 第148回日本獣医学会学術集会 ヒト乳癌細胞株の生存・増殖におけるNF- κ Bの役割 平成21年9月26日 鳥取県鳥取市
- ⑦ 第147回日本獣医学会学術集会肥満細胞腫におけるアポトーシス耐性獲得機構の解析 平成21年4月4日 栃木県宇都宮市

[図書] (計1件)

- ① 疾患モデルマウス 表現型解析指南 (アレルギー別冊、山村研一・若菜茂晴編集) 中山書店

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称：移植用細胞シートの製造方法、移植用細胞シート、及び移植用細胞シートを用いる治療方法

発明者：田中あかね、松田浩珍

権利者：同上

種類：特願

番号：2010-192683

出願年月日：2010年8月30日

国内外の別：国内

名称：オリゴヌクレオチド

発明者：田中あかね、松田浩珍、松田彬

権利者：同上

種類：特願

番号：2011-274897

出願年月日：2010年12月16日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

http://www.tuat.ac.jp/~mol_path/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 あかね (TANAKA AKANE)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：80418673

(2) 研究分担者

松田 浩珍 (MATSUDA HIROSHI)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：80145852

大森 啓太郎 (OHMORI KEITARO)

東京農工大学・大学院農学研究院・講師
研究者番号：20466915