

## 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 6 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 年度 ～ 2011 年度

課題番号：21590408

研究課題名（和文） ヘッジホッグシグナル制御因子から見た膵臓癌前癌病変の分子病理

研究課題名（英文） Roles of SIX3 and SIL in the Hedgehog signaling during pancreatic carcinogenesis.

研究代表者

笠井謙次 (KASAI KENJI)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70242857

研究成果の概要（和文）：

Sonic hedgehog (Shh) 遺伝子制御因子SIX3は正常膵管上皮に発現しているが、PanIN・癌には発現していないこと、SIX3非発現膵臓癌細胞株ではSIX3遺伝子プロモーターのCpG Islandがメチル化されていること、SIX3はShh遺伝子転写開始点より約300kb上流にあるエンハンサー領域を介してTLE1・HDAC1依存性抑制に関わっていることを見出した。またHhシグナル伝達に必須な細胞内蛋白SILはlow-grade PanINから発現が増加し、癌では強発現していること、正常膵管上皮で僅かに観察される蛋白集積部位は概ね基底膜に沿った細胞底面であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

SIX3 protein was expressed in the normal duct cells of the pancreas whereas not in PanIN / cancer cells. Human SIX3 promoter contained a CpG island which was methylated in SIX3(-) pancreatic cancer cell lines. Reporter assay revealed roles of SIX3 and TLE1/HDAC1 in the MACS1-dependent suppression of human Shh gene. SIL was strongly expressed in PanIN / cancer cells of the pancreas. It was also weakly expressed at the basal of the normal duct cells of the pancreas, indicating its role for the cellular attachment to the matrix.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：ヘッジホッグ 膵臓癌 前癌病変 SIX3 SIL

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性癌の代表である膵臓癌では、形態形成因子として知られる分泌型糖蛋白Sonic hedgehog (Shh) などヘッジホッ

グ (Hh) 蛋白が75%以上の症例で過剰発現していること、また遺伝子改変マウスを用いた研究からK-RAS変異とHhシグナル活性化の両者が膵臓癌発生には必要であ

ることが報告されるに至り、膵臓癌発生過程でのHhシグナルの役割に注目が集まっている。

(2) しかし正常膵管上皮細胞から前癌病変 (PanIN)・膵臓癌に至る膵臓癌化過程において、どのような分子機構がShh発現をもたらした細胞内Hhシグナル活性化を引き起こしているのかについて、十分に理解されているとは言い難い。

(3) これまで本研究代表者らはHhシグナル関連因子の同定と機能解析を進めてきたが、その中でもSIX3 (中枢神経の発生過程においてShh遺伝子を制御する転写抑制因子)とSIL (癌細胞において細胞内Hhシグナル伝達に必須な細胞質蛋白)の膵臓癌化過程での役割、特にShh遺伝子制御並びに細胞内Hhシグナル活性化への関与の詳細は不明であった。

## 2. 研究の目的

Hh制御因子 (SIX3・SIL) の発現の変化とShh遺伝子活性化機構という観点から膵臓癌化過程を分子病理学的に解析しようとするものである。

## 3. 研究の方法

(1) 病理組織学的解析:市販抗体および本研究代表者が作成したウサギ抗SIL抗体を用いて、担癌膵臓組織の免疫組織学的解析を行った。

(2) コンピューター遺伝子解析:CpG Island searcherなどによるコンピューター解析によりヒトSIX3遺伝子プロモーター中のCpG Islandを予測した。

(3) DNAメチル化解析:膵臓癌細胞株のSIX3遺伝子プロモーター領域をbisulfite sequencing法にて解析した。

(4) レポーターアッセイ:文献上知られているヒトShh遺伝子の臓器特異的エンハンサーをクローニングしレポーターベクターを作成した。これをSIX3・TLE1・HDAC1の各発現ベクターともに細胞株に遺伝子導入しアッセイを行った。

(5) ノックダウン解析:SIX3・TLE1に対するsiRNAを膵臓癌細胞株に導入して当該遺伝子産物のノックダウンを行い、Shh発現の変化を解析した。

(6) tetracycline誘導性SIX3発現株作成:SIX3非発現・Shh発現ヒト膵臓癌細胞株を元にtet-offシステムによるSIX3誘導発現細胞株を作成した。

(7) laser microdissection法:laser microdissection法にて正常膵管上皮細胞

および膵臓癌細胞DNAを抽出しSIL遺伝子プロモーター領域のメチル化状況を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) SIX3について

①担癌膵臓の免疫組織染色では、SIX3は正常膵管上皮に陽性であるが、多くのPanIN及び膵臓癌には陰性であった。

またSIX3共役転写抑制因子TLE1およびHDAC1は正常膵管上皮に陽性であった。

②コンピューター解析によりヒトSIX3遺伝子は転写開始点を含む293塩基中にCpG Islandを有すること (G+C含有率57%, CpG実測頻度/予測頻度0.674) がわかった。この領域のシトシンはSIX3非発現ヒト膵臓癌細胞株ではメチル化されているが、SIX3発現ヒト膵臓癌細胞株ではヘミメチル化の状態であった。

③文献上知られているShh遺伝子の臓器特異的エンハンサーを用いてレポーターアッセイを行った。その結果、Shh遺伝子転写開始点より約300kb上流にあるMACS1と呼ばれる消化管・肺特異的エンハンサー領域がSIX3およびTLE1・HDAC1依存性レポーター活性抑制に関与することを見出した。

④SIX3発現・Shh非発現ヒト膵臓癌細胞株において、siRNA法によりSIX3遺伝子産物をノックダウンすると、Shh発現が見られた。同様にTLE1遺伝子産物のノックダウンにてShh発現が見られた。

⑤しかしSIX3非発現・Shh発現ヒト膵臓癌細胞株を元にtetracycline誘導性SIX3発現株を作成し、SIX3を発現誘導すると、Shh発現はむしろ増強した。以上よりヒト膵臓癌細胞株では、SIX3に対する応答性が異なる可能性が示唆された。すなわち、SIX3発現・Shh非発現株では確かにSIX3がShh発現に対し抑制性に働いているが、SIX3非発現・Shh発現株にSIX3を強制発現しても逆にShh発現が増強することから、後者ではSIX3と共役し転写活性化する因子が別に存在しているものと考えられた。以上よりヒト膵臓癌細胞株ではSIX3に対する応答性が異なる二群、則ちSIX3非発現群 (major group)とSIX3発現群 (minor group)に区別できる可能性を考えた。このため、SIX3陽性膵臓癌症例を見出しその臨床病理学的特徴を抽出すべく、症例を増やして免疫染色を行っている。

### (2) SILについて

①膵臓癌症例の免疫組織染色では、SIL

は正常膵管上皮に陰性〜弱陽性であるが、low-grade PanINから染色性を増し、癌では強陽性であった。

②正常膵管上皮細胞および膵臓癌細胞DNAをlaser microdissection法にて抽出し解析したところ、SIL遺伝子プロモーター領域にメチル化状況の変化は明らかでなかった。

③正常膵管上皮細胞におけるわずかなSIL陽性部位は、概ね基底膜に沿った細胞底面であった。このことから、SILは細胞が基底膜と接する細胞内領域において何らかの役割を担っている可能性を考えた。

#### 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2件)

① Shingo Inaguma, Kenji Kasai, Mitsuyoshi Hashimoto, Hiroshi Ikeda: "GLI1 modulates EMT in pancreatic cancer-Letter"  
Cancer Research *in press*.  
(doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0379)  
(2012) (査読有)

② Shingo Inaguma, Kenji Kasai, Hiroshi Ikeda: "GLI1 facilitates the migration and invasion of pancreatic cancer cells through MUC5AC-mediated attenuation of E-cadherin"  
Oncogene 30:714-723.  
(doi: 10.1038/onc.2010.459)  
(2011) (査読有)

[学会発表] (計5件)

① 稲熊真悟、笠井謙次、池田 洋: 「胃小細胞癌の一例: 遺伝子変異 LOH 解析を含めた検討」第100回日本病理学会総会 (平成23年4月29日) パシフィコ横浜 (横浜市)

② 稲熊真悟、笠井謙次、米山亜紀子、池田洋: 「GLI1 は MUC5AC の発現誘導によって E-cadherin による細胞間接着を阻害し膵臓癌細胞の遊走・浸潤を促進する」第99回日本病理学会総会 (平成22年4月29日) 京王プラザホテル (東京都)

③ 稲熊真悟、笠井謙次: 「GLI1 enhances the motility and invasion by gel forming mucin MUC5AC up-regulation in pancreatic cancer cells」第68回日本癌学会学術総会 (平成21年10月1日) パシフィコ横浜 (横浜市)

④ 米山亜紀子、稲熊真悟、笠井謙次、池田

洋: 「膵臓癌および Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) における SIL 発現状況の免疫組織学的解析」第98回日本病理学会総会 (平成21年5月3日) 国立京都国際会館 (京都市)

⑤ 稲熊真悟、笠井謙次、米山亜紀子、池田洋: 「膵臓癌において GLI1 は bHLH 型転写抑制因子 DEC2 の発現を直接誘導し MLH1 を介した遺伝子不安定性に寄与する」第98回日本病理学会総会 (平成21年5月3日) 国立京都国際会館 (京都市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

新聞報道 (計1件)

①中目新聞「膵臓がん 広がる仕組みを解明 粘液物質が進行促進」(平成22年11月11日夕刊) (稲熊真悟、笠井謙次、池田 洋 研究成果報道)

ホームページ等

<http://www.aichi-med-u.ac.jp/univ/medic/lecture2/10.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠井 謙次 (KASAI KENJI)  
愛知医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 70242857

(2) 研究分担者

(3)連携研究者

池田 洋 (IKEDA HIROSHI)  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00131219

稲熊 真悟 (INAGUMA SHINGO)  
愛知医科大学・医学部・講師  
研究者番号：80410786