

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 5 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592357

研究課題名（和文） 核内受容体による Mcl-1 発現制御が癌細胞増殖・転移に与える影響とそのメカニズム

研究課題名（英文） Role of Mcl-1 expression on tumor cell growth and metastasis

研究代表者

和田 孝一郎 (WADA KOICHIRO)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：90263467

研究成果の概要（和文）：

核内受容体によって発現を制御されている遺伝子群を網羅的に解析したところ、癌細胞で Myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) と呼ばれる分子の発現が亢進していた。そこで Mcl-1 の癌細胞増殖・浸潤における役割について検討したところ、Mcl-1 の発現抑制によって癌細胞の増殖・浸潤が抑制された。さらに新たな癌細胞増殖・浸潤関連分子として、アクアポリン3の存在が明らかになった。これらの結果は、Mcl-1 などの分子が癌細胞の増殖・浸潤に重要な役割を果たしていることを示したものであり、その成果は多くの外国雑誌や各種学会において報告された。

研究成果の概要（英文）：

Myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1), a member of the B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) family, has been reported to be a critical survival factor in hematopoietic cells, yet little data exists for a role of Mcl-1 in human squamous cell carcinoma (SCC). A high level expression of Mcl-1 was observed in tumor cells of human primary SCC, lymph node metastasis tissues, and SCC cell lines. We observed that Mcl-1 siRNA inhibited the growth of SCCs accompanied with apoptosis. We also observed the involvement of aquaporin 3 on the growth of SCCs. These results imply a potentially important and novel role of the inhibition of Mcl-1 or aquaporin 3 by the use of specific siRNA in the treatment of SCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：核内受容体・Mcl-1・扁平上皮癌・アノイキス・浸潤

1. 研究開始当初の背景

核内受容体 PPAR には α 、 γ 、 δ の3種類が存在し様々な生理機能に関与することが報告されており、特にPPAR γ は脂肪細胞の分化やインスリン感受性に重要な役割を果たしていることが知られている。我々はこの PPAR γ の脂肪細胞分化やインスリン感受性以外の重要な作用に注目して様々な研究を行ってきた。すなわち、免疫反応や抗炎症作用に重要な働きをしているほか、特に癌組織での発現が高く癌細胞増殖に重要な役割を果たしていることも報告してきた。すなわち、PPAR γ をsmall interfering RNA (siRNA)を用いてノックダウンすることで癌細胞の接着が抑制され、その結果アポトーシスが誘発されることを報告した。この接着阻害によって引き起こされるアポトーシスは「アノイキス」と呼ばれる現象であり、癌においてPPAR γ 阻害によってアノイキスが引き起こされるのを報告したのは世界的にみても我々がはじめてである。この様にPPAR γ をはじめとする核内受容体が癌細胞の生存・増殖に重要な役割を果たしていることを報告してきたが、さらに最近これらの研究成果をさらに発展させるために、癌細胞においてPPAR系によって発現を制御されている遺伝子群をDNA microarrayを用いて網羅的に解析することを試みた。その結果、扁平上皮癌や大腸癌といった種々の癌細胞でPPAR γ により発現が制御されている可能性がある分子としてMcl-1を見出した。これが本研究の着想に至った経緯である。

2. 研究の目的

本研究では、核内受容体である PPAR が、アポトーシス関連因子といわれている Mcl-1 の発現を制御することにより癌細胞の増殖・浸潤・転移に影響を与える可能性を検討し、さらに Mcl-1 が癌治療のターゲットとなる可能性まで追求することを目的としている。Mcl-1 は B-cell lymphoma-2 family の一つであり、造血系細胞では重要な生存因子として抗アポトーシス作用を有することが報告されているが、癌細胞における役割については不明な点が多い。さらに我々は予備的検討を行い、ヒト口腔扁平上皮癌組織において実際に Mcl-1 が高発現していることを認めている。これは DNA microarray の結果を裏付けるものであり、我々の着想が極めて実現性の高いものであることを示している。一方、Mcl-1 の転写調節領域には PPRE が存在しその発現が PPAR γ 経路によって制御されている可能性が高いが、その詳細は不明であり全く報告されていない。これらのことから本研究は、

国際的に見てもユニークな着想であり、かつ非常に興味深い分野であると考えられる。また本研究は我々のこれまで行ってきた研究成果をもとに着想・計画されたのであり、これらの研究成果をさらに発展・展開できるものと考えられる。本研究により Mcl-1 が癌細胞の増殖・浸潤・転移に重要な影響を与えていることを明らかにできれば、Mcl-1 が癌治療のターゲットとなる可能性を示すことができる。

3. 研究の方法

(1) in vitro培養細胞実験系での検討：

DNA microarray による予備的検討から、PPAR γ 経路により Mcl-1 の発現が制御されている可能性が高い。そこでPCRによりその発現制御を確認する。さらにより詳細に PPAR γ 経路による転写調節を証明するため、Chromatin Immuno-precipitation assay (ChIP assay)を行って確認する。同時に Mcl-1 特異的な siRNA を設計・作製し、扁平上皮癌その他の細胞に transfection して Mcl-1 の発現が抑制されているのかどうかを検討し、発現抑制が十分であると確認された場合、扁平上皮癌細胞を中心とした細胞に transfection して、その増殖を抑制するかどうかを検討する。

(2) 組織切片での免疫染色実験系：

我々はこれまでに口腔扁平上皮癌の組織切片を用いて数多くの免疫組織染色を行い、報告を行ってきた。これらの方法を用いて研究を行う。

(3) 扁平上皮癌におけるMcl-1-siRNA の癌細胞浸潤における作用の検討とメカニズムの検討：

効果を確認したMcl-1-siRNAを用いて、扁平上皮癌細胞の浸潤を抑制できるかどうかについて検討を行う。我々はinvasion chamberを用いた癌細胞浸潤能を評価する系を確立しており、これを用いることで浸潤能に対する作用を評価できる。また、siRNA による Mcl-1 の発現抑制がどのようなメカニズムで細胞増殖や細胞浸潤を抑制しているのかについてもMAPK経路を中心として検討する。

(4) 種々の癌細胞におけるMcl-1発現の検討：

扁平上皮癌以外の癌組織でMcl-1が発現しているのかについて、Tumor tissue array を用いて検討する。Tumor tissue arrayは種々の癌組織における癌部と非癌部が一枚のスライドガラス上についており、一度に多数の癌組織での発現を検討できる。これを用いてスクリーニングを行う。

(5) データの解析・結果の妥当性に関する検

討および研究の総括：

これまで得られたすべてのデータの解析を行い、その妥当性に関して検討を行う。妥当性に関しては、相互にデータの信頼性等を検証し、討論する。最終的に研究代表者が本研究に関する総括を行い、報告書を作成する。さらに本研究の成果について国際的な学術雑誌に投稿するとともに、国内外の学会で発表を行う。

4. 研究成果

本研究では核内受容体である Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) が、アポトーシス関連因子といわれている Mcl-1 の発現を制御することにより癌細胞の増殖・浸潤・転移に影響を与える可能性を明らかにし、さらに Mcl-1 が癌治療のターゲットとなる可能性まで検討して数多くの成果をあげた。我々は PPAR をはじめとする核内受容体が癌細胞の生存・増殖に重要な役割を果たしていることを報告してきたが、より詳細な検討を行うため癌細胞において PPAR 系によって発現を制御されている遺伝子群を DNA microarray を用いて網羅的に解析した。その結果、癌細胞で Mcl-1 の発現が制御されていることを見出した。Mcl-1 は造血系細胞では重要な survival factor として抗アポトーシス作用を有することが報告されているが、癌細胞における役割については不明であった。我々はヒト口腔扁平上皮癌組織において実際に Mcl-1 が高発現していることを見出した。この Mcl-1 の転写調節領域には PPRE が存在しており、その発現が PPAR 経路によって制御されていること、さらに Mcl-1 の発現を siRNA を用いてノックダウンしたところ、癌細胞の増殖・浸潤が抑制されることを確認した。そのメカニズムに MAP キナーゼ経路が関与することも明らかにした。更に既存の抗がん剤であるシスプラチンや 5-FU との併用により強力な癌細胞増殖抑制効果を示すことも明らかにした。さらに解析を続けていく過程で、新たな癌細胞増殖・浸潤関連分子として、Aquaporin3 (AQP3) の存在が明らかになった。この分子も Mcl-1 と同様に PPAR 経路によって発現調節されており、扁平上皮癌細胞において高い発現が認められた。siRNA を用いて AQP3 をノックダウンしたところ、やはり癌細胞の増殖が抑制された。これらの結果は PPAR 経路を中心とした Mcl-1 や AQP3 などの分子が、癌細胞の増殖・浸潤に重要な役割を果たしていることを示したものであり、扁平上皮癌のみならず、様々な癌細胞に対する薬物療法を考える上で重要な知見となるものと考えられる。総括として、本研究の目的であった Mcl-1 の癌細胞増殖・浸潤・転移における役割を明らかにできたことから、当初の目的はほぼ達したものと考え

られる。さらに本研究の過程で、新たな癌細胞増殖関連分子として AQP3 を見出すことができた。これは今後の癌細胞増殖に関する研究を更に発展させる可能性があるため、当初の計画より進展したと考えられる。なお、本研究の成果は、国際学術雑誌や各種学会において報告された。

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 20 件)

- ① Ishimoto S, Wada K, Usami Y, Tanaka N, Aikawa T, Okura M, Nakajima A, Kogo M, Kamisaki Y. Differential expression of aquaporin 5 and aquaporin 3 in squamous cell carcinoma and adenoid cystic carcinoma. **International Journal of Oncology** 査読有 40;1011-1019 (2012)
- ② Kojima A, Nakano K, Wada K, Takahashi H, Katayama K, Yoneda M, Higurashi T, Nomura R, Hokamura K, Muranaka Y, Matsuhashi N, Umemura K, Kamisaki Y, Nakajima A, Ooshima T. Infection of specific strains of *Streptococcus mutans*, oral bacteria, confers a risk of ulcerative colitis. **Scientific Reports** 査読有 2; 332: doi:10.1038/srep00332, (2012).
- ③ Yoneda M, Naka S, Nakano K, Wada K, Endo H, Mawatari H, Imajo K, Nomura R, Hokamura K, Ono M, Murata S, Tohnai I, Sumida Y, Shima T, Kuboniwa M, Umemura K, Kamisaki Y, Amano A, Okanoue T, Ooshima T, Nakajima A. Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. **BMC Gastroenterology** 査読有 12; 16, (2012).
- ④ Ishimoto S, Wada K, Tanaka N, Yamanishi T, Ishihama K, Aikawa T, Okura M, Nakajima A, Kogo M, Kamisaki Y. Role of endothelin receptor signaling in squamous cell carcinoma. **International Journal of Oncology** 査読有 40; 1011-1019, (2012).
- ⑤ Nakano K, Hokamura K, Taniguchi N, Wada K, Kudo C, Nomura R, Kojima A, Naka S, Muranaka Y, Thura M, Nakajima A, Masuda K, Nakagawa I, Speziale P, Shimada N, Amano A, Kamisaki Y, Tanaka T, Umemura K, Ooshima T. The collagen-binding protein of *Streptococcus mutans* is involved in hemorrhagic stroke. **Nature Communications** 査読有 2; 485: doi:10.1038/ncomms1491, (2011).
- ⑥ Uchiyama T, Takahashi H, Sugiyama M, Sakai E, Hosono K, Endo H, Yoneda K, Yoneda M, Inamori M, Nagashima Y, Inayama Y, Wada K, Nakajima A. Leptin

- receptor is involved in STAT3 activation in human colorectal adenoma. **Cancer Science** 査読有 102; 367-372, (2011).
- ⑦ Nakano K, **Wada K**, Nomura R, Nemoto H, Inaba H, Kojima A, Naka S, Hokamura K, Mukai T, Nakajima A, Umemura K, **Kamisaki Y**, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Characterization of aortic aneurysms in cardiovascular disease patients harboring *Porphyromonas gingivalis*. **Oral Disease** 査読有 17; 370-378, (2011).
- ⑧ Yoneda M, Kato S, Mawatari H, Kirikoshi H, Imajo K, Fujita K, Endo H, Takahashi H, Inamori M, Kobayashi N, Kubota K, Saito S, Tohnai I, Watanuki K, **Wada K**, Maeda S, Nakajima A. Liver abscess caused by periodontal bacterial infection with *Fusobacterium necrophorum*. **Hepatology Research** 査読有 41; 194-196, (2011).
- ⑨ Nemoto H, Nakano K, Masuda K, **Wada K**, Ardin AC, Nomura R, Ooshima T. Distribution of oral streptococci highly resistant to amoxicillin in dental plaque specimens from Japanese children and adolescents. **Journal of Medical Microbiology** 査読有 60; 1853-1859, (2011).
- ⑩ Kato Y, Shirai M, Murakami M, Mizusawa T, Hagimoto A, **Wada K**, Nomura R, Nakano K, Ooshima T, Asai F. Molecular detection of human periodontal pathogens in oral swab specimens from dogs in Japan. **Journal of Veterinary Dentistry** 査読有 28; 84-89, (2011).
- ⑪ Endo H, Hosono K, Uchiyama T, Sakai E, Sugiyama M, Takahashi H, Nakajima N, **Wada K**, Takeda K, Nakagama H, Nakajima A. Leptin acts as a growth factor for colorectal tumours at stages subsequent to tumour initiation in murine colon carcinogenesis. **Gut** 査読有 60; 1363-1371, (2011).
- ⑫ Uchiyama T, Takahashi H, Endo H, Sugiyama M, Sakai E, Hosono K, Nagashima Y, Inayama Y, **Wada K**, Hippo Y, Nakajima A. Role of the long form leptin receptor and of the STAT3 signaling pathway in colorectal cancer progression. **International Journal of Oncology** 査読有 39; 935-940, (2011).
- ⑬ Fujita K, **Wada K**, Nozaki Y, Yoneda M, Endo H, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Saito S, Nakajima A. Serum nitric oxide metabolite as a biomarker of visceral fat accumulation: clinical significance of measurement for nitrate/nitrite. **Med. Sci. Monitor**. 査読有 17; CR123-131, (2011).
- ⑭ Kusayama M, **Wada K**, Nagata M, Ishimoto S, Takahashi H, Yoneda M, Nakajima A, Okura M, Kogo M, **Kamisaki Y**. Critical role of aquaporin 3 on growth of human esophageal and oral squamous cell carcinoma. **Cancer Science** 査読有 102; 1128-1136, (2011).
- ⑮ Hokamura K, Inaba H, Nakano K, Nomura R, Yoshioka H, Taniguchi K, Ooshima T, **Wada K**, Amano A, Umemura K. Molecular analysis of aortic intimal hyperplasia caused by *Porphyromonas gingivalis* infection in mice with endothelial damage. **Journal of Periodontal Research** 査読有 45; 337-344, (2010).
- ⑯ Sakuma S, Nishioka Y, Imanishi R, Nishikawa K, Sakamoto H, Fujisawa J, **Wada K**, **Kamisaki Y**, Fujimoto Y. cis9, trans11-conjugated linoleic acid differentiates mouse 3T3-L1 preadipocytes into mature small adipocytes through induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition** 査読有 47; 167-173, (2010).
- ⑰ Endo H, Hosono K, Fujisawa T, Takahashi H, Sugiyama M, Yoneda K, Nozaki Y, Fujita K, Yoneda M, Inamori M, **Wada K**, Nakagama H, Nakajima A. Involvement of JNK pathway in the promotion of the early stage of colorectal carcinogenesis under high-fat dietary condition. **Gut** 査読有 58; 1637-1643, (2009).
- ⑱ Yoneda M, Hotta K, Nozaki Y, Endo H, Tomeno W, Watanabe S, Hosono K, Mawatari H, Iida H, Fujita K, Takahashi H, Kirikoshi H, Kobayashi H, Inamori M, Kubota K, Shimamura T, Saito S, Maeyama S, **Wada K**, Nakajima A. Influence of iNOS polymorphisms in Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology Research** 査読有 39; 963-971, (2009).
- ⑲ Yoneda M, Hotta K, Nozaki Y, Endo H, Uchiyama T, Mawatari H, Iida H, Kato S, Fujita K, Takahashi H, Kirikoshi H, Kobayashi N, Inamori M, Abe Y, Kubota K, Saito S, Maeyama S, **Wada K**, Nakajima A. Association between angiotensin II type I receptor polymorphisms and the occurrence of nonalcoholic fatty liver disease. **Liver International** 査読有 29; 1078-1085, (2009).
- ⑳ Nagata M, **Wada K**, Nakajima A, Kusayama M, Masuda T, Iida S, Okura M, Kogo M, **Kamisaki Y**. Role of myeloid cell leukemia-1 on cell growth of squamous cell carcinoma. **Journal of Pharmacological Sciences** 査読有 110; 344-353, (2009).

〔学会発表〕(計 15 件)

- ① 和田孝一郎、上崎善規、米田正人、中島淳。非アルコール性脂肪肝発症のリスクファクターとしての歯周病菌。第 85 回日本薬理学会年会。2012 年 3 月 14 日～16 日、京都。
- ② 石本俊介、和田孝一郎、大倉正也、古郷幹彦、上崎善規。口腔癌における Aquaporin 5 と Aquaporin 3 の発現と役割。第 85 回日本薬理学会年会。2012 年 3 月 14 日～16 日、京都。
- ③ 小島あゆち、和田孝一郎、仲野和彦、大嶋隆、梅村和夫、中島淳、上崎善規。高病原性 *Streptococcus mutans* は炎症性腸炎を悪化させる。第 85 回日本薬理学会年会。2012 年 3 月 14 日～16 日、京都。
- ④ Kamisaki Y, Wada K, et.al. Role of oral bacteria in cardiovascular diseases - Involvement of *Porphyromonas gingivalis* in arteriosclerosis. 2nd International conference of Inflammation and Translational medicine. September 25-26, 2011, Shanghai.
- ⑤ 石本俊介、和田孝一郎、他。扁平上皮癌における AQP5 受容体シグナルの役割。第 119 回日本薬理学会近畿部会。平成 23 年 7 月 8 日、名古屋。
- ⑥ Ishimoto S, Wada K, et.al. Role of endothelin receptor signaling on proliferation of squamous cell carcinoma. The 6th International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal Transduction and Drug Effects. April 1 – 2, 2011, Kyoto.
- ⑦ Ishimoto S, Wada K, et al. Role of endothelin reseptor signaling in squamous cell carcinoma. 第 84 回日本薬理学会年会。2011 年 3 月 22 日～24 日、横浜。
- ⑧ Kojima A, Wada K, et al. High-virulent *Streptococcus mutans* aggravates inflammation in DSS-induced colitis mice. 第 84 回日本薬理学会年会。2011 年 3 月 22 日～24 日、横浜。
- ⑨ 和田孝一郎、他。非アルコール性脂肪肝炎発症のリスクファクターとしての口腔細菌。第 31 回日本臨床薬理学会年会。2010 年 12 月 1 日～3 日、京都。
- ⑩ 石本俊介、和田孝一郎、他。扁平上皮癌におけるエンドセリン受容体シグナルの役割。第 118 回日本薬理学会近畿部会。2010 年 11 月 19 日、大阪。
- ⑪ 平田佳永、和田孝一郎、他。ロイコトリエン B 4 はヒト脂肪細胞分化を制御する。第 52 回歯科基礎医学会学術大会。2010 年 9 月 20-22 日、東京。
- ⑫ 小浜恵子、和田孝一郎、他。口腔扁平上皮癌における細胞接着分子ギセリンの発現と役割。第 117 回日本薬理学会近畿部会。2010 年 7 月 8 日、徳島。
- ⑬ Wada K, Kamisaki Y. Bacteremia by virulent oral bacteria is a potent risk factor for stroke under endothelial cell injury condition. 第 83 回日本薬理学会年会。2010 年 3 月 16 日～18 日、大阪。
- ⑭ Kusayama M, Wada K, et al. Role of Aquaporin-3 on squamous cell carcinoma. 第 83 回日本薬理学会年会。2010 年 3 月 16 日～18 日、大阪。
- ⑮ Hirata K, Wada K, et al. RLeukotriene B4 is a regulatory signal for human adipocyte differentiation. 第 83 回日本薬理学会年会。2010 年 3 月 16 日～18 日、大阪。

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：「高病原性口腔細菌による腸炎誘発原因分子の産生とその高感度検出法」

発明者：梅村和夫、外村和也、仲野和彦、大嶋隆、野村良太、和田孝一郎

権利者：国立大学法人浜松医科大学・国立大学法人大阪大学

種類： 科学技術

番号： PCT/JP2011/055688

出願年月日： 平成 22 年 3 月 10 日

国内外の別： 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 孝一郎 (WADA KOICHIRO)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号： 90263467

(2) 研究分担者

上崎 善規 (KAMISAKI YOSHINORI)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号： 40116017

