

機関番号：20101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21792022

研究課題名（和文） 口腔癌における腫瘍内微小血管形成に関する転写因子の役割の解明

研究課題名（英文） Analysis of the role of transcription factor in the formation of tumor microvessel in oral cancer

研究代表者

萩 和弘 (KAZUHIRO OGI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40433114

研究成果の概要（和文）：腫瘍内の低酸素環境は、腫瘍の大部分で起きており血管新生を誘導したり、転移や抗癌剤治療に対する抵抗性を生み出す。低酸素環境下では、複数の細胞内分子や経路を活性化するようにみえるが、全体の分子機構は不明である。今回通常酸素下および低酸素環境下で扁平上皮癌細胞株をもちい、転写因子 HIF1 と NF-kappaB の既知の標的遺伝子の cDNA plate array を行った。それぞれプロファイリングした 23 個の標的遺伝子からアレイデータを得た。

研究成果の概要（英文）：Hypoxia in tumor occurs in the majority of tumors, promoting angiogenesis, metastasis and resistance to chemotherapy. Although hypoxia seems to activate several cellular molecules and pathways, the overall molecular mechanism remains unknown. We performed HIF1 and NF-kappaB regulated cDNA plate array with oral squamous cell carcinoma under hypoxia and normoxia. We obtained a plate based array data for profiling 23 HIF-regulated genes and 23 NF-kappaB-regulated genes. There are some difference among oral squamous cell carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：がん微小環境、HIF1、NF-kappaB、転写因子

1. 研究開始当初の背景

・固形がんの内部では血管形成が異常な為、低酸素や低グルコース環境が形成されている。特に低酸素状態やグルコース飢餓などの環境因子が抗癌剤感受性に及ぼすかを検討することで、治療効果を高めることができるかに着目した。転写因子 HIF1 と NF-kappaB の標的遺伝子の発現解析を行い、低酸素応答性を示す遺伝子群の解析を行うことで抗癌剤治療の感受性を高めることが可能かを検証する。

・がん細胞が血流不足による低酸素と、低栄養状態に暴露されたときに、グルコースからのエネルギー産生からアミノ酸を用いたエネルギー産生にその代謝をシフトして細胞増殖を行う。がん微小環境下でのメカニズムを解明することは、抗癌剤感受性にも影響を及ぼすことから多様な環境因子の影響を検証することが必要である。

・近年、口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma : OSCC) に対する放射線治療と抗癌剤同時併用療法が顕著な治療効果を発揮している。口腔扁平上皮癌における頸部リンパ節転移は患者の予後を決定する重要な因子の一つであるが、悪性腫瘍の所属リンパ節転移の機序において血管新生の関与を明らかにし、抗癌剤の組織移行性を高めることも検討課題となっている。

2. 研究の目的

・近年臨床で行われている口腔癌治療での選択的動注化学療法による頸部転移リンパ節に対する効果は、原発巣に高濃度の抗癌剤を投与すれば転移リンパ節に対して血行性あるいはリンパ行性に薬剤が移行し、一定の抗腫瘍効果があることが推測されてきた。本研

究ではこれらを背景に術前に動注化学療法 (シスプラチン) での抗腫瘍効果をモニターする分子マーカーの開発を目的とする。とくに転写因子である HIF1 と NF-kappaB の標的遺伝子のがん微小環境下での転移や浸潤に関連する遺伝子群の解析を行うことで、抗癌剤投与と遺伝子発現抑制を行うことで、抗癌剤感受性を高めるかを検証する。

3. 研究の方法

・通常酸素下および低酸素環境下で口腔癌細胞株 6 株 (HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22, SAS, Ho-1-u-1) を培養し、HIF-1 および NF-kaapaB が制御する遺伝子の発現を HIF-regulated cDNA plate array と NF-kaapaB-regulated cDNA plate array にて遺伝子発現検索を行った。

・得られた遺伝子のタンパク発現をウエスタンブロットにより確認し、標的遺伝子の si-RNA による遺伝子サイレンシングによって下流にある遺伝子発現の変化を分析した。

4. 研究成果

1) FACS による細胞周期の解析結果

シスプラチン(0.5ug/ml)を添加し、通常酸素下で 24 時間ならびに 48 時間培養し、抗癌剤感受性の低い細胞株(HSC-2,HSC-4)と高い細胞株(HSC-3,SAS,Ca9-22)に分離した。このうち HSC-2,HSC-4 を低酸素下かつグルコース存在下あるいはグルコース飢餓状態で培養したところ HSC-2 では、低酸素かつグルコース飢餓状態で subG1 の population が 3%から 24% へと増加した。一方で HSC-4 は、低酸素環境かつグルコース飢餓状態で subG1 の増加は認

められず、シスプラチン感受性が低いことが示された。

2) HIF1 が制御する標的遺伝子の cDNA plate array の結果

シスプラチンに対する感受性の差異を明らかにするために、HSC-2,HSC-4 を用いて転写因子である HIF1 と NF-kappaB の標的遺伝子の発現解析を Signosis 社の cDNA plate array を行った。それぞれ 23 個の標的遺伝子の解析を行ったところ低酸素状態で、HSC-2 株では HIF1 の標的遺伝子である GLUT1、NDRG2、VHL の発現が、HSC-4 株では、MMP1、PDGF-A などの発現上昇がみられた。一方 NF-kappaB においては、HSC-2 株では VEGFA、HSC-4 株では、IL-2,4,6 および NOS2 などの発現上昇が顕著であった(表1)。

表1. 低酸素下で発現制御される HIF-Regulated cDNA Plate Array の結果

	HSC-2 hypoxia/mock	HSC-4 hypoxia/mock
Bcl-2	2.23723547	0.944543
β -actin	2.37910847	1.007906
CA9	1.69529506	1.034164
CTSD	2.25248843	0.781876
BHLHB2	2.3202704	0.790568
Glut-1	3.18592144	0.987989
Glut-3	1.91094508	0.883625
HIF-1 α	2.49081686	1.083394
HIF-2 α	2.22969961	1.462037
HPRT	2.0638283	0.452155
IGF-II	1.26613893	1.036592
Leptin	0.66261149	0.30519
MMP1	0.59063839	2.215487
Mxl-1	1.45042892	0.601173

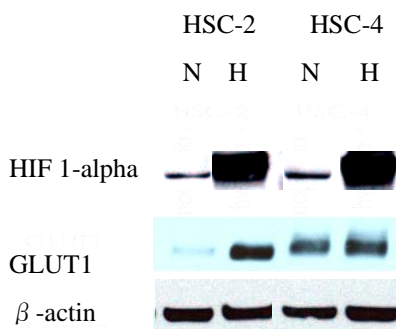
NDRG2	1.42503069	1.152341
PAI-1	1.85260322	0.913409
PDGF-A	1.29753774	1.26645
PKD1	1.8449263	0.897995
NDRG1	2.13524289	0.79902
SAG	1.79982037	0.450077
SLC6A8	1.80015195	0.776635
VEGF	0.86654825	1.030895
VHL	2.80315018	0.620068

表2. 低酸素下で発現制御される NF-kappaB-Regulated cDNA Plate Array の結果

	HSC-2 hypoxia/mock	HSC-4 hypoxia/mock
Bcl2	1.01392918	1.361645
Beta-actin	0.832282439	1.063972
CCND1	0.796499519	1.088351
Cox-2	0.688988748	1.08379
FAS-L	1.019058181	0.989916
IFNB1	0.473336636	1.273998
IL1A	1.099334812	1.168355
IL2	1.084249415	1.456658
IL6	0.838152373	2.472066
IL8	1.060530136	1.634067
GAPDH	0.827796549	1.089852
IFNg	1.13815045	1.046085
IRF1	0.546885941	1.226064
MDR1	0.76586458	1.083526
MMP1	0.769926133	1.304332
Myb	0.904740404	1.299935
Myc	0.792955856	1.240114
NOS2	0.960266762	1.547795
p53	0.734466582	1.452136
TNFA	0.734084694	1.149031
TNFR	0.806325204	1.155171
VCAM1	0.94626222	1.253308
VEGFC	1.262156756	1.660319

3) HSC-2、HSC-4 株での GLUT1 の発現

HSC-2 株においてシスプラチン投与によりグルコースの取り込みが抑制されるかを検討するために、グルコース輸送に参与する GLUT1 に着目した。Western blott による GLUT1 のタンパク発現は、低酸素状態で亢進していた。一方 HSC-4 株では通常酸素下および低酸素下では発現の変化は認められなかった。



4) si-RNA HIF1alpha を用いた knockdown (KD)による標的遺伝子の発現変化

HSC-2 株において通常酸素下および低酸素下で si-RNA HIF1alpha による KD では、抗癌剤感受性に影響はなかった。しかしながら低酸素下では GLUT1 の発現が低下し、シスプラチンの取り込みが減少することが示された。一方 HSC-4 株においては GLUT1 以外の標的遺伝子の関与が考えられ、細胞間で代謝経路が異なることが示唆された。

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 1 件)

1) Kashima L, Toyota M, Mita H, Suzuki H, Ogi K, Tokino T; CHFR, a potential tumor suppressor, downregulates interleukin-8 through the inhibition of NF-kappa B. Oncogene. 2009

28(29); 2643-53. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1) 萩 和弘、仲盛健治ら；癌低酸素領域での血管新生因子およびリンパ管新生因子の発現の検討；日本癌学会総会、2010年9月24日 大阪

2) 萩 和弘、仲盛健治ら；口腔癌における癌低酸素領域での血管新生因子およびリンパ管新生因子の発現の臨床的意義；日本癌学会総会、2009年10月2日 横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

萩 和弘 (OGI KAZUHIRO)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40433114

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし