

## 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23年12月27日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791242

研究課題名（和文） 規内因性血管、リンパ管新生制御因子の癌増殖、転移に関する機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of the repressive factor of angiogenesis and lymphangiogenesis, CSDA.

研究代表者

齊藤 幸裕 (SAITO YUKIHIRO)

旭川医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：80540583

研究成果の概要（和文）：【目的】内因性血管，リンパ管新生制御因子として我々が同定した Cold Shock Domain Protein A (CSDA) について，発癌過程における CSDA 発現の変化と，癌細胞からの血管，リンパ管新生因子分泌能の関連を明らかとする．さらに CSDA の調節が癌増殖，転移の抑制に繋がる検討する．【結果 1】 1， CSDA の発現；CSDA は低酸素環境下 3 日目から上昇し，このとき細胞はアポトーシスが誘導されていることが，ミトコンドリア膜電位変化や TUNEL 染色で明らかとなった．またこの変化にはオートファジーは関与していなかった．さらにアポトーシスを薬剤で誘導すると CSDA の発現が上昇したことから，CSDA の発現調節にはアポトーシスが重要であった． 2， 癌細胞への作用；マウス大腸癌，肺癌細胞，ヒト胃癌細胞に CSDA を導入したところ，*c-fos* promoter 活性，*VEGF* promoter 活性ともに上昇した．理論的には両 promoter を抑制する機能を持つ CSDA の作用としては矛盾しており，これを説明する新たな機序が必要となる．[仮説] 次の仮説を立てた． 1， CSDA は癌幹細胞，非幹細胞で発現が異なっているのではないか． 2， 非幹細胞に CSDA が発現をしているのであれば CSDA は腫瘍形成能力の喪失に関与しているのではないか． 3， CSDA が癌幹細胞に発現せず非幹細胞に発現しているなら，非幹細胞の CSDA 発現による変化が，癌幹細胞に作用し血管新生誘導因子が分泌されるのではないか．【結果 2】 3， 乳癌細胞 4 T1 の癌幹細胞分離；FACS により CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>細胞を幹細胞分画とした．全体の 2～5%程度であり今後の解析のため更なる検討が必要となる．【結語】 癌細胞における CSDA 発現，機能の新たな機序が必要であり，癌幹細胞コンセプトを導入した仮説を打ち出した．今後これの検証が必要である．

研究成果の概要（英文）：【Objective】 Our objective was to investigate the effect of cold shock domain protein A (CSDA) on carcinogenesis and secretions of angiogenic and lymphangiogenic factors from tumor cells. 【Results】 In human skeletal muscle cells (SkMC), CSDA was up-regulated during hypoxia when cells were damaged and apoptosis was induced. CSDA expression could up-regulate the *c-fos* and VEGF promoter activity on cancer cell lines, CT26, LLC, and AZL5G, but these results were inconsistent with previous reports. We hypothesized that CSDA expresses on cancer non-stem cells and CSDA can control the secretions angiogenic and lymphangiogenic factors from cancer stem cells. We tried to sort the cancer cell line, 4T1, and only 4% cells were recognized as the cancer stem cells. 【Conclusion】 Given with our *in vitro* data, we assessed novel hypothesis. Further experiments were required to confirm our concept.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
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：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：実験外科学

### 1. 研究開始当初の背景

本邦における死因の上位を占める癌、心筋梗塞、脳卒中に共通する重要な疾患因子の一つは血管新生である。血管新生を抑制することは腫瘍血管新生抑制療法へと繋がり、現在すでに抗 VEGF-A 抗体(bevacizuma- b)が臨床応用されている。また血管新生を促進する虚血性疾患に対する血管新生療法は先進医療として多くの試みがなされており、今後の発展が期待される場所である。これまで血管新生のコントロールは VEGF-A に代表される血管新生因子の投与、あるいは抑制によってなされてきたが、近年内因性の血管新生調節因子が重要な役割を果たすことが見出されてきた(Watanabe, *et al. J Clin Invest.* 2004; Tateno, *et al. Circ Res.* 2006)。また癌転移や循環動態において血流と共にリンパ流は重要な循環システムであり、これを無視した議論は不十分であると考えられる。これらから申請者は血管新生に加えリンパ管新生も同時にコントロール可能な内因性の脈管新生調節因子を見出し、疾患への関与を明らかにするため研究してきた。

我々は血管、リンパ管新生を同時に制御する新規治療用分子を同定するために、大阪大学遺伝子治療学教室共同で独自に開発された High throughput screening 法による解析を行った(Figure 1)。これにより cold shock domain protein A(CSDA)が特定され、機能解析を行い、これまでに以下の点を明らかにした。

- 1, CSDA の一般的な機能は CT rich な遺伝子配列への DNA 結合作用であり、結果として転写因子に競合的に作用して転写を阻害する。
- 2, VEGF promoter 領域の HRE への DNA binding による VEGF 転写阻害ならびに MAPK の最下流である SRE への DNA binding によるシグナル阻害作用を有する(Figure 2)。
- 3, 血管新生、リンパ管新生を同時に抑制する。
- 4, 実際の腫瘍に CSDA を過剰発現させると、腫瘍増殖、転移を有意に抑制した。
- 5, VEGF 転写阻害に加え NFκB と競合することで活性を抑制する。
- 6, 血管新生誘導サイトカイン(IL-6、IL-8)の誘導を阻害する。
- 7, 下肢虚血マウスにおいて CSDA の発現抑制が血管新生を誘導し虚血を改善することができた(Figure 3)。

これまでの検討から CSDA は正常組織では心臓と骨格筋に特異的に発現していること

が明らかとなっている。しかし癌細胞では正常組織では全く見られなかった CSDA 発現がほぼ臓器に関係なく高発現していることを見出した(Figure 4)。CSDA の発現は癌の増殖、転移に必須と思われる VEGF-A、C の分泌にとっては極めて不利である。

Fig 1. Schematic diagram of the high throughput screening with HT-JE

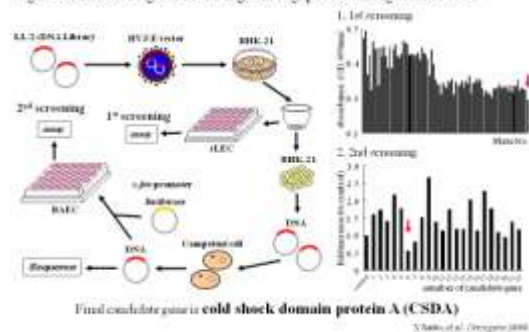


Fig 2. The mechanism of EC proliferate inhibition by CSDA

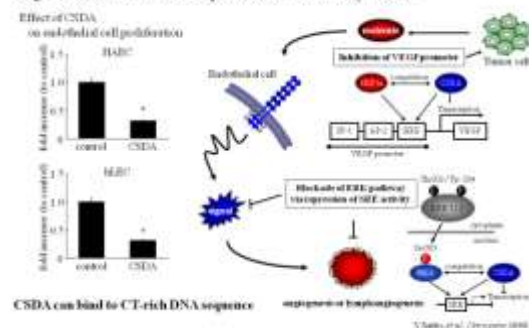


Fig 3. Mechanism underlying the regulation of angiogenesis induced by skeletal muscle

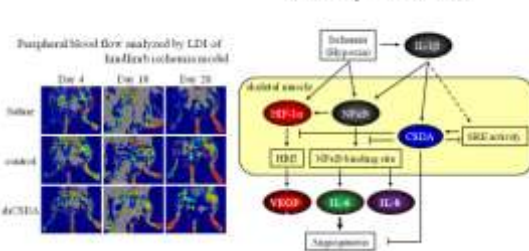
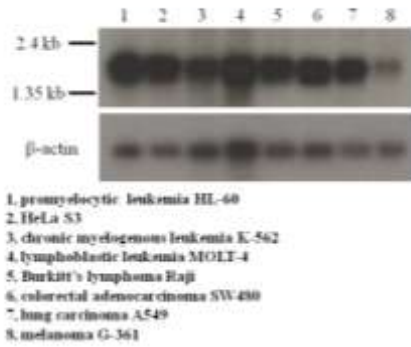


Fig 4. Expression of CSDA mRNA on cancer cell line



## 2. 研究の目的

癌の早期発見や手術成績の向上によりローカルコントロールに関する成績は向上してきたが、癌治療成績全体を向上させるには新たなブレークスルーが必須である。Folkman らが癌に対する血管新生抑制治療を提唱して以来 (Folkman J. *N Engl J Med.* 1971.)、いくつかの治療用分子が報告されてきた。またリンパ節転移に関しても癌細胞がリンパ管新生を促し転移する機序が示され、血管新生と同様にリンパ管新生抑制治療の可能性が見いだされた。我々は血管新生、リンパ管新生を同時に抑制しうる初めての分子として CSDA を同定した。また癌微小環境での血管新生に関して“量的”抑制に加え、“質的”調節も重要であることが報告されている (Noguera-Troise I, *et al. Nature.* 2006.; Hamzah J, *et al. Nature.* 2008.)。つまり腫瘍血管は病的血管であり、この透過性の亢進した血管のため腫瘍では正常の循環環境が整っておらず、腫瘍内圧の亢進、低酸素化、pH 異常など腫瘍特異的環境が形成されている。これが抗癌剤の癌集積、化学的作用の抑制、放射線感受性の低下など治療抵抗性を誘導していることが明らかとなった。CSDA は血管、リンパ管に対し量的に抑制することに加え、質的に構造変化を調節できる可能性がある。内因性血管、リンパ管新生制御因子と

そこで本研究では発癌過程における CSDA 発現の変化と、癌細胞からの血管、リンパ管新生因子分泌能の関連を明らかとする。さらに CSDA の調節が癌増殖、転移の抑

制に繋がるか検討する。

## 3. 研究の方法

### ① 細胞培養

ヒト骨格筋細胞 (SkMC) は 10% FBS, skeletal muscle growth supplement (including rhEGF, insulin, GA-1000, fetuin, dexamethasone, and BSA) を添加した SkGM で培養した。またマウス大腸癌細胞 CT26, 肺癌細胞 LLC, ヒト胃癌細胞 AZL5G は 10% FBS 添加 DMEM で培養した。低酸素培養は AnaeroPack system (Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc., Tokyo, Japan) を用いた。遺伝子導入は LipoTrust™ EX Gene reagent (Hokkaido System Science Co., Ltd., Hokkaido, Japan) を使用した。actinomycin D (10  $\mu$ M), camptothecin (2  $\mu$ M), etoposide (100  $\mu$ M) (BioVision, Inc., Mountain View, CA) によってアポトーシスを誘導した。

### ② Real-time Quantitative PCR

mRNA の発現は real-time quantitative PCR で TaqMan Gene Expression Assays (human CSDA, Hs01124964; Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて測定した。

$\beta$ -actin の発現により補正し, standard curve により標準化した。

### ③ Western blotting

細胞から核蛋白を NE-PER™ (Promega) を用いて抽出した。Western blotting は標準的な方法によって行った。次の抗体を使用した: CSDA (Aviva Systems Biology, San Diego, CA), actin (Sigma, St. Louis, MO). cytochrome c の測定は Cytochrome c Releasing Apoptosis Assay Kit (BioVision, Inc.) を使用した。

### ④ アポトーシスの検討

MitoCapture Apoptosis Detection Kit (BioVision, Inc.) によりミトコンドリアの膜電位変化を検討した。TUNEL 染色は in Situ Apoptosis Detection kit (Takara, Shiga, Japan) を使用した。また GFP-Certified Apoptosis/Necrosis Detection Kit (Enzo Life Sciences International, Inc., Plymouth Meeting, PA) でネクローシスについても検討した。



⑤ c-fos promoter 活性および VEGF promoter 活性の測定  
c-fos promoter 活性および VEGF promoter 活性はそれぞれの配列の後方に luciferase を挿入したレポーター遺伝子により検討した。

⑥ FACS  
マウス乳癌細胞 4T1 に CD44, CD24, lineage 抗体でラベルし, CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>Lineage<sup>-</sup>の分画を癌幹細胞とした。

⑦ 統計学的処理  
すべてのデータは means ± SEM で示されている。2 群間の比較は Student t test で, 多群間の比較は ANOVA により検定された。P<0.05 を統計学的有意差とした。

#### 4. 研究成果

##### ① CSDA の発現

正常骨格筋細胞を低酸素培養し CSDA の発現を検討したところ, mRNA は低酸素環境下 3 日目から上昇し, タンパクは 7 日目から上昇した(Figure 5 A-C)。このとき細胞はアポトーシスが誘導されていることが, ミトコンドリア膜電位変化や TUNEL 染色, cytochrome c の測定から明らかとなった(Figure 5 D-F)。またこの変化にはオートファジーは関与していなかった。この際アポトーシスが誘導されている細胞に CSDA が発現していることが蛍光染色にて明らかとなった(Figure 6 A, B)。さらに正常酸素下でアポトーシス誘導薬剤を添加すると細胞がアポトーシスに陥っていることを確認した(Figure 6 C, D)。この細胞で CSDA の発現を確認したところ, 上昇したことから(Figure 6 E, F), CSDA の発現調節にはアポトーシスが重要であることが明らかとなった。

##### ② 癌細胞への作用

マウス大腸癌, 肺癌細胞, ヒト胃癌細胞に CSDA を導入したところ, c-fos promoter 活性, VEGF promoter 活性ともに上昇した(Figure 7)。理論的には両 promoter を抑制する機能を持つ CSDA の作用としては矛盾しており, これを説明する新たな機序が必要となる。

[仮説] 次の仮説を立てた。1, CSDA は癌幹細胞, 非幹細胞で発現が異なっているのではないか。2, 非幹細胞に CSDA が発現しているのであれば CSDA は腫瘍形成能力の喪失に関与しているのではないか。3, CSDA が癌幹細胞に発現せず非幹細胞に発現しているなら, 非幹細胞の CSDA 発現による変化が, 癌幹細胞に作用し血管新生誘導因子が分泌されるのではないか。

これを検討するため癌幹細胞研究で汎用さ

Figure 5

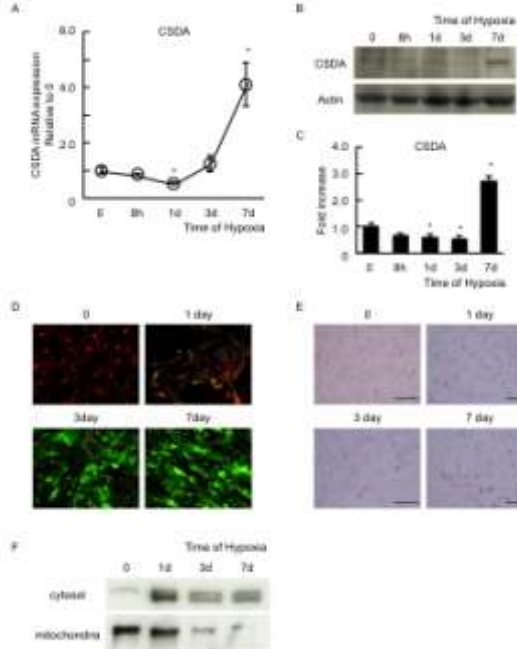
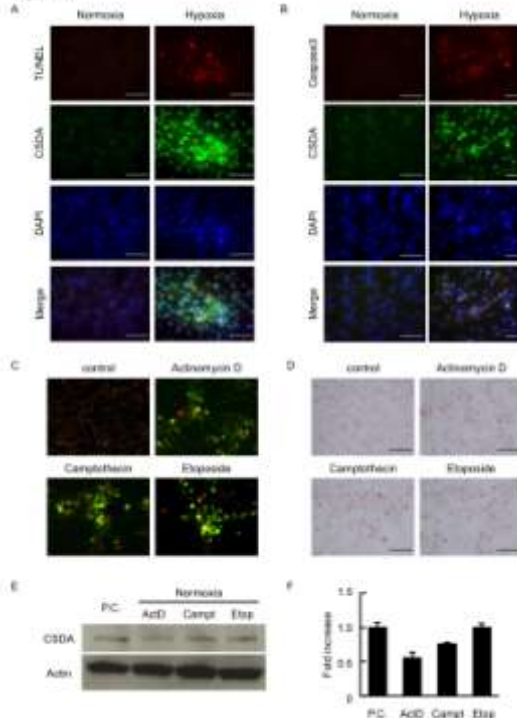


Figure 6



れている乳癌細胞を使用することとした。

##### ③ 乳癌細胞 4T1 の癌幹細胞分離

FACS により CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>Lineage<sup>-</sup>細胞を幹細胞分画とした。結果として全体の 2~5%程度の細胞がこの分画に該当し回収することができた(Figure 8)。しかしこの分画の遺伝子発現解析などを行うに十分な細胞が得られなかったため, 今後の解析のためにはスケールアップする必要が明らかとなった。

