

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23790675

研究課題名（和文）

アネキシンA8の脱メチル化を指標とした膵癌発生・進展促進因子の網羅的探索

研究課題名（英文）

Comprehensive screening of promoting factors involved in carcinogenesis and progression on the basis of DNA demethylation in Annexin A8 gene in pancreatic cancers.

研究代表者

畑 春実 (HATA HARUMI)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：00396441

研究成果の概要（和文）：膵癌細胞株において Annexin A8 (ANXA8) の機能解析を行ったところ、ANXA8 は、膵癌における増殖能、浸潤能、低酸素・低栄養環境への適応応答に寄与している可能性が示唆された。ANXA8 は、直接低酸素誘導因子 (HIF-1 $\alpha$ ) の発現を誘導し膵癌の悪性度を決定する重要な遺伝子であることが明らかになった。ANXA8 プロモーター制御下にルシフェラーゼ遺伝子を発現させるためのコンストラクトを作製し、ANXA8 の脱メチル化促進因子を網羅的に探索した。これらは、ANXA8 の発現を誘導し、膵癌の進展を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We first investigated the functional role of ANXA8 in pancreatic cancer cell lines. We clarified that ANXA8 elevated transcriptional activation of HIF-1 $\alpha$ , and that changes in expression levels of ANXA8 were associated with cell viability, migration, and resistance against hypoxic conditions in pancreatic cancer cells. Using the construct harboring the promoter sequences of ANXA8 upstream of the luciferase gene, we exhaustively explored promoting factors involved in carcinogenesis and progression on the basis of DNA demethylation in ANXA8 gene in pancreatic cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：Annexin、メチル化

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は、最難治癌の1つであり、極めて予後不良である。これは、早期診断が困難であるために発見時に切除不能な進行例が多いこと、治療抵抗性が高く、浸潤・転移能が高いことに起因する。このため、膵癌患者の予後改善には、早期診断法と新規治療法の開発が必須である。

そこで、本研究では、膵癌の罹患率・死亡率減少を将来の目標に掲げ、発癌危険因子の同定（一次予防の面から）、早期診断マーカーの確立・新規治療法の開発（二次予防の面から）、癌進展促進因子、予後予測因子の同定（二次+三次予防の面から）に取り組むことを全体構想とする。

## 2. 研究の目的

申請者は、平成 21-22 年度科学研究費補助金若手研究(B)交付期間中に、各種ヒト癌細胞株において ANXA8 が高発現していることを見出し、新規癌特異的発現遺伝子として同定した。さらには、ANXA8 の発現にエピジェネティクス制御（プロモーター領域のメチル化）が関与していること、その発現が膵癌の悪性化（増殖・浸潤・転移）に関与する可能性があることを報告した。

そこで、本研究では、膵癌における ANXA8 の機能と発現制御機構の解析を進めるとともに、ANXA8 の発現を誘導する因子＝プロモーター領域の脱メチル化を促進する因子を網羅的に探索することで、新規膵癌発生・進展促進因子を同定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 膵癌細胞株における ANXA8 の機能解析

- ①ANXA8 の full-length cDNA を pcDNA3 に挿入した発現ベクター (pcDNA3-ANXA8) を作製した。対照として pcDNA3 ベクターを用いた。
- ②ANXA8 の低発現膵癌細胞株である PANC-1 に、pcDNA3-ANXA8 をトランスフェクションした後、経時的に MTT assay、3 日目に BrdU assay を行った（増殖試験）。
- ③ANXA8 の高発現膵癌細胞株である BxPC-3 に、small interfering RNA (siRNA)、対照として control siRNA をトランスフェクションした後、経時的に MTT assay、Caspase 3/7 assay を行った（増殖試験）。
- ④ANXA8-targeting siRNA により、BxPC-3 細胞における ANXA8 の発現を抑制した後、Migration assay、Invasion assay を行った（遊走試験、浸潤試験）。
- ⑤ANXA8 の低発現膵癌細胞株である PANC-1 に低栄養環境（無血清培地）を処置し、経時的に ANXA8 の発現量の変化を評価した (Real-time PCR)。
- ⑥PANC-1 に、pcDNA3-ANXA8、対照として pcDNA3 ベクターをトランスフェクションした後、低栄養環境（培地）を処置し、2 日目に MTT assay を行った。
- ⑦BxPC-3 に、ANXA8-targeting siRNA、対照として control siRNA をトランスフェクションした後、経時的に ANXA8 が各種遺伝子の発現に及ぼす影響を評価した。(RT-PCR, Real-time PCR)。
- ⑧ルシフェラーゼレポーターベクター (pGL4. 14) に低酸素誘導因子 HIF-1 $\alpha$  のプロモーター領域の配列を組み込んだコンストラクト (HIF-1 $\alpha$ -LUC) を作製した。PANC-1 に、pcDNA3-ANXA8 (対照として pcDNA3 ベクター) と HIF-1 $\alpha$ -LUC をコトランスフェクションした後、経時的にルシフェラーゼ活性を測定した。また、細胞内 Ca<sup>2+</sup>キレート剤 BAPTA-AM を前処理した後、同様に行った。

(2) 膵癌細胞株における ANXA8 の発現とその制御機構の解析

①膵癌における ANXA8 の発現制御とエピジェネティクス機構の関連を解析するため、ANXA8 低発現膵癌細胞株である PANC-1 に、脱メチル化剤 (5-Aza-dC)、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (Sodium butyrate) 処置による RNA 発現量の変化を評価した (RT-PCR, Real-time PCR)。

②Bisulfite-sequencing 法により、各種ヒト癌細胞株における ANXA8 遺伝子の Exon1-promoter 領域の CpG メチル化状態を解析した。

③メチル化と ANXA8 発現量との関係を明確化するため、ルシフェラーゼレポーターベクター (pGL4. 14) に ANXA8 のプロモーター領域の配列を組み込んだコンストラクト (ANXA8-LUC) を作製した。さらに、CpG メチルトランスフェラーゼ (M. SssI) により CpG サイトを完全にメチル化したコンストラクト (Me-ANXA8-LUC) を作製した。対照として、pGL4. 14 ベクターとそのメチル化体 (Me-pGL4. 14) を用いた。これらを PANC-1 細胞にトランスフェクションし、24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

(3) 脱メチル化促進因子の網羅的探索

①ルシフェラーゼレポーターベクター (pGL4. 14) に ANXA8 のプロモーター領域の配列を組み込んだコンストラクト (ANXA8-LUC) を PANC-1 にトランスフェクションした後、ANXA8 の脱メチル化を促進する因子を網羅的に探索した。

## 4. 研究成果

(1) 膵癌細胞株における ANXA8 の機能解析  
PANC-1 細胞に、ANXA8 を高発現させることで、細胞増殖能が有意に上昇した (図 1)。siRNA により BxPC-3 細胞の ANXA8 の発現を抑制したところ、細胞増殖能が有意に減少し、細胞死が誘導され (図 2)、遊走能・浸潤能も減少した (図 3)。これらの結果より、ANXA8 は膵癌細胞株の増殖能、遊走能、浸潤能に対する促進因子である可能性を見出した。ANXA8 は、膵癌の悪性度を決定する重要な遺伝子であることが明らかになった。

PANC-1 細胞を低栄養環境下（無血清培地）で培養することにより、ANXA8 の発現が強く誘導された (図 4)。PANC-1 細胞に、ANXA8 を高発現させることで、低栄養環境に対して抵抗性を示した (図 4)。ANXA8 発現抑制細胞 (BxPC-3) を用いて、各種遺伝子の発現を検討したところ、ANXA8 の発現と低酸素誘導因子 (HIF-1 $\alpha$ ) の発現に関連があることが示された (図 5)。ルシフェラーゼレポーター遺伝子上流に HIF-1 $\alpha$  のプロモーター領域の配列を組み込んだコンストラクト (HIF-1 $\alpha$ -LUC) と pcDNA3-ANXA8 をコトランスフェクシ

オンすることにより、ルシフェラーゼ活性が上昇した(図6)。この活性は、細胞内Ca<sup>2+</sup>キレート剤BAPTA-AMの前処理により消失したことから、ANXA8は直接HIF-1 $\alpha$ の発現を誘導し、その機序には細胞内Ca<sup>2+</sup>が関わっていることが明らかになった(図6)。

これらの結果より、ANXA8は、膵癌細胞における低栄養・低酸素環境への適応応答に寄与している可能性が示唆された。

## (2) 膵癌細胞株におけるANXA8の発現とその制御機構の解析

PANC-1においてANXA8の発現(RNA)は5-Aza-dC、Sodium butyrate処置により上昇した(図7)。各種癌細胞株において、ANXA8遺伝子のExon1-promoter領域のCpGメチル化状態とANXA8発現量には関連が認められた(図8)。ANXA8のプロモーター領域の配列を組み込んだコンストラクト(ANXA8-LUC)のレポーター活性は、メチル化(Me-ANXA8-LUC)により有意に抑制した(図9)。

これらの結果より、癌細胞株におけるANXA8の発現制御には、エピジェネティクス機構が関与している可能性を見出した。また、ANXA8遺伝子の脱メチル化による発現誘導が、膵癌細胞の悪性化において非常に重要である可能性が示唆された。これより、ANXA8の脱メチル化を促進する因子を網羅的に探索することが、将来の膵癌の発癌予防、早期発見、予後改善に繋がると予想される。

## 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3件)

(1)Hata H, Tatemichi M, Nakadate T. Involvement of Annexin A8 in the Properties of Pancreatic Cancer. *Mol. Carcinog. In press* doi: 10.1002/mc.21961. 査読有

(2)Ohara A, Kasahara Y, Yamamoto H, Hata H (4番目), 他7名. Exclusive expression of VMAT2 in noradrenergic neurons increases viability of homozygous VMAT2 knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 432 (3):526-32. (2013) doi:10.1016/j.bbrc.2013.02.014. 査読有

(3)Kasai S, Kan F, Hata H, Takamatsu Y, Hagino Y, Shiroishi T, Koide T, Ikeda K. Relationship between Oprm1 polymorphism and morphine sensitivity in inbred-strain mice derived from wild mice. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi.* 31(2):87-88.

(2011) 査読有

[学会発表] (計1件)

①立道昌幸, 畑 春実. 非変異原性発がん物質による Activation-induced Cytidine Deaminase の誘導-新規発がんメカニズムの可能性. 第71回日本癌学会学術総会 H24.9.19-21 (札幌)

[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]

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

畑 春実 (HATA HARUMI)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号: 00396441

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

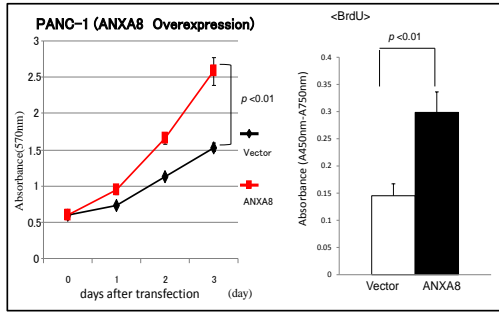


図 1

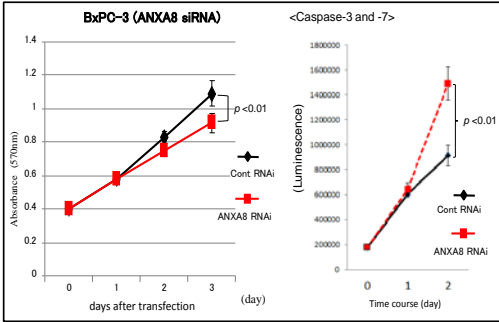


図 2

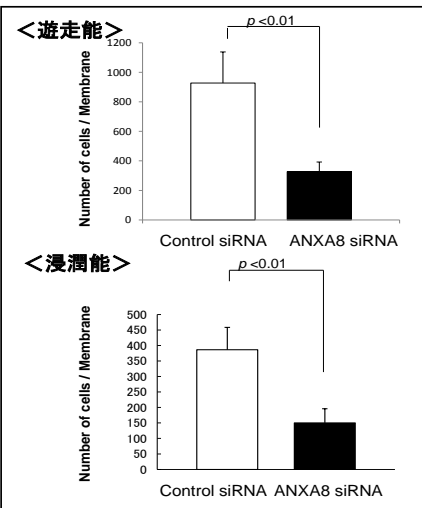


図 3

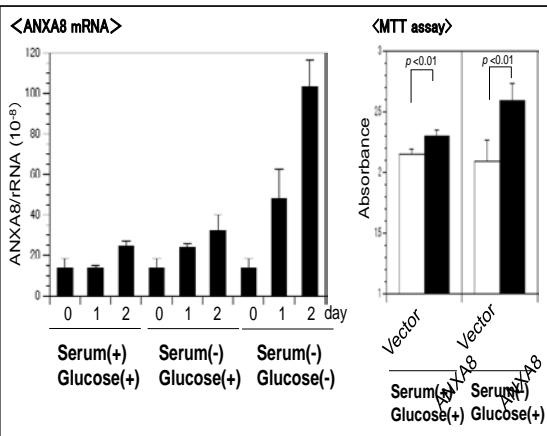


図 4

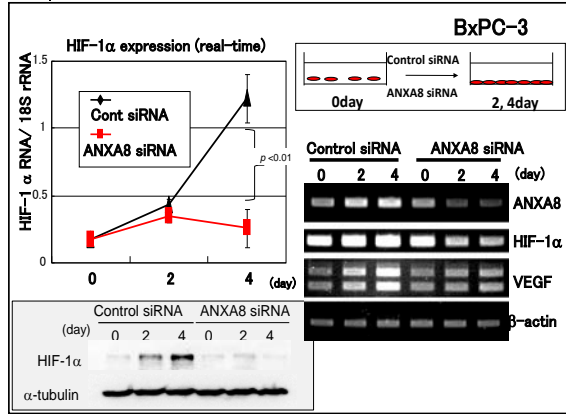


図 5

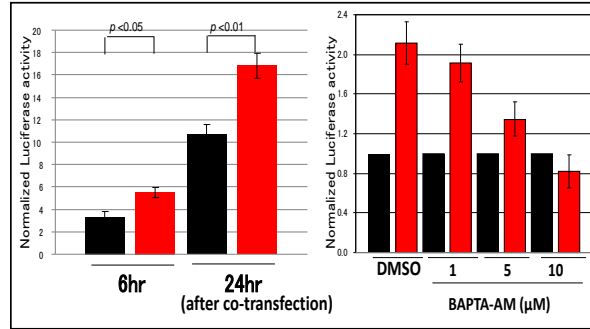


図 6

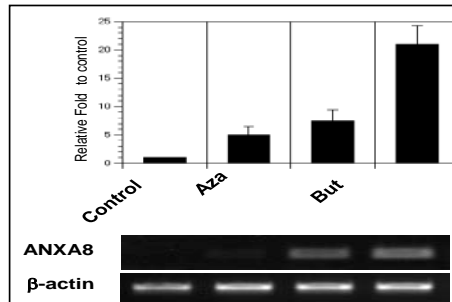


図 7

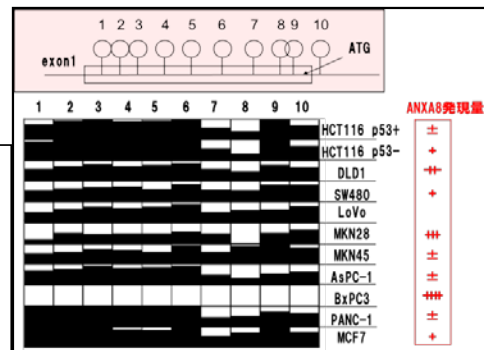


図 8

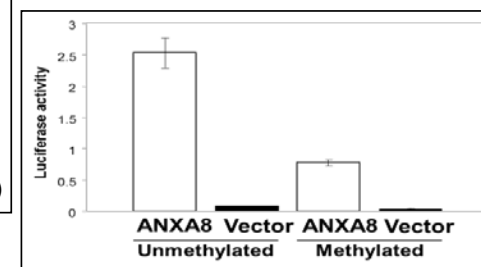


図 9