

## 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 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791557

研究課題名（和文）アクアポリン発現解析に基づく食道癌低浸透圧細胞破壊療法の開発

研究課題名（英文） The expression and role of Aquaporin in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

石井 博道 (ISHII HIROMICHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：90515206

研究成果の概要（和文）：アクアポリン 5（AQP5）は、様々な癌種に発現し腫瘍進展などに関与していることが報告されているが、食道扁平上皮癌（ESCC）におけるその発現と役割についての報告はない。ESCC 細胞株に対し、AQP5 siRNA を用いてノックダウンを行ったところ、G1 期での細胞周期の停止、細胞増殖の抑制、細胞死の誘導が認められた。さらに AQP5 ノックダウンによる種々の mRNA 発現レベルの変化をマイクロアレイにて解析したところ、mRNA 発現レベルが 2 倍以上に上昇/低下した遺伝子はそれぞれ 1472/660 種であった。これらを Ingenuity Pathway Analysis にて解析したところ、Cellular growth and proliferation が AQP5 ノックダウンに関連したトップネットワークの一つとして抽出された。根治切除術を施行した ESCC68 例の組織標本に対し免疫染色を行い、その染色強度と範囲から AQP5 高発現群と低発現群に 2 群化したところ、AQP5 高発現群/低発現群はそれぞれ 41/27 例であり、前者において有意に腫瘍径が大きく、分化型が多かった。AQP5 高発現群/低発現群の 3 年無再発生存率は前者で有意に予後不良であった。以上より、ESCC 細胞株において、AQP5 は細胞周期、細胞増殖や細胞死に関与する可能性が示唆された。また、ESCC 組織での AQP5 発現レベルは腫瘍径や組織型と関連性を持ち、高発現群は予後不良となる傾向があることを解明した。

研究成果の概要（英文）：Aquaporins (AQPs) are water channel proteins that facilitate transcellular water movements. Recent studies have shown that AQP5 is expressed in various cancers, and plays a role in tumor progression. However, its expression and role in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) have not been investigated. We examined the pathophysiologic role of AQP5 in cell proliferation and survival, and also investigated its expression and effects on the prognosis of ESCC patients. AQP5 expression was high in TE2 and TE5 cells, human ESCC cell lines. In these cells, the knockdown of AQP5 using siRNA inhibited cell proliferation and G1-S phase progression, and induced apoptosis. A microarray analysis identified 2,132 genes whose expression was altered by AQP5 knockdown in TE5 cells. Of these, 398 genes had cell proliferation-related functions. Pathway analysis showed that cellular growth and proliferation was the top-ranked signal network. Immunohistochemical staining of 68 ESCC patients showed the expression of AQP5 is associated with tumor size, histological type, and tumor recurrence. In conclusion, the expression of AQP5 in ESCC cells may affect cell proliferation and survival, and impact on the prognosis of ESCC patients.

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：外科系臨床医学、消化器外科

キーワード：食道癌、アクアポリン

## 1. 研究開始当初の背景

アクアポリン(AQP)は水を特異的に通過させるチャネルであり、300前後のアミノ酸で構成される6回貫通型膜蛋白で、13種類のアイソフォームを持つ。近年、種々の癌細胞において、AQPが高発現していることが報告されており、腫瘍進展におけるその重要な機能が注目されている。

一方、消化器癌播種性転移の制御は極めて困難であり、有効な予防法・治療法の研究開発が急がれる。術野に撒布された癌細胞の破壊を目的とした蒸留水洗浄や、播種性転移に対する蒸留水投与による治療経験が報告されているが、AQP発現に着目した研究報告は存在しない。

## 2. 研究の目的

本研究では、食道癌細胞株・組織におけるAQP発現とその意義を検討する。“AQPを高発現する食道癌細胞では、低浸透圧刺激による細胞破壊が促進される”という実験仮説の検証を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト食道癌細胞株における AQP 発現レベルの解析

種々の食道癌細胞株における AQP5 の蛋白発現をウェスタンブロット法で確認。

### (2) ヒト食道癌細胞株における AQP 発現調節 (siRNA) と細胞周期・アポトーシス・microarray 解析

AQP 高発現細胞株を選択し、AQP5 siRNA をトランスフェクション後、細胞周期・アポトーシスへの影響をフローサイトメトリーを用いて検証。また、関連遺伝子発現変化を microarray による網羅的に解析。

### (3) ヒト食道癌組織における AQP 発現レベルの解析と、臨床病理学的因子との相関性の検討

手術臨床標本のパラフィンブロックを用い、AQP 5 に対する免疫染色を行い発現レベルを癌部で確認すると共に、臨床病理学的因子や、予後・再発形式との相関を解析。

### (4) 消化器癌細胞株における低浸透圧刺激に対する反応性の解析

各種消化器癌細胞株を用い、低浸透圧刺激に対する反応性の変化を解析。また、AQP5 siRNA をトランスフェクションし、低浸透圧刺激に対する反応性の変化を解析。低浸透圧刺激に対する反応性の解析は、ビデオ微分干

渉顕微鏡システム、高分解能型自動細胞解析装置(Cell Lab Quanta)、トリパンブルー染色、再培養試験により行う。

### (5) マウスモデルにおける低浸透圧液投与の安全性の検討

BALB/c マウスで蒸留水投与群と生理食塩水投与群を作成し、3日間連日で2ml ずつ腹腔内投与し、生存・腹腔内所見を解析。

## 4. 研究成果

まずヒト食道癌細胞株における AQP 発現レベルの解析を試みた。種々のヒト食道癌細胞株におけるアクアポリン5の蛋白発現をウェスタンブロット法で解析したところ、TE2、TE5での高発現、KYSE70、KYSE170、TE9での低発現を確認した(図1)。また、AQP5 高発現食道癌細胞株である TE2、TE5 に、AQP5-siRNA をトランスフェクションしたところ、G0/G1 停止による細胞増殖抑制効果、アポトーシスの増強効果が確認された(図2, 3, 4, )。AQP5-siRNA をトランスフェクションした TE5 を用いて microarray による網羅的解析を試みたところ、mRNA 発現レベルが2倍以上に上昇/低下した遺伝子はそれぞれ1472/660 種であった。これらを Ingenuity Pathway Analysis にて解析したところ、Cellular growth and proliferation が AQP5 ノックダウンに関連したトップネットワークの一つとして抽出され、関連遺伝子の発現変化を real time PCR で確認した(図5)。さらに、手術臨床標本のパラフィンブロックを用い、AQP5 に対する免疫染色を行ったところ、食道癌組織における AQP5 の高発現を確認し(図6)、p21・CyclinD1 との発現相関を見出した(図7)。また、AQP5 の発現が、腫瘍径・組織学的分化度・術後無再発生存期間と相関することを見出した(図8)(J Gastroenterol. 2013)。また、AQP5-siRNA を導入した TE5 細胞株を低浸透圧処理したところ、75 mosmol/kgH<sub>2</sub>O での細胞容積変化と、0 mosmol/kgH<sub>2</sub>O での細胞破壊効果の増強が確認できた。さらに、生体への低浸透圧液投与の安全性を確認するため、BALB/c マウスで3日間連日で2ml ずつ各々蒸留水と生理食塩水を腹腔内投与したところ、両群とも day5, day7 で全例生存し、肉眼的・組織学的な腹腔内所見にも差を認めなかった。同時に、低浸透圧細胞破壊療法の基礎的検討を進め、胃癌細胞株(J Surg Res. 2012)、膵癌細胞株(Pancreatol. 2012)において、クロライド輸送体阻害により低浸透圧細胞破壊効果が増強されることを解明した。

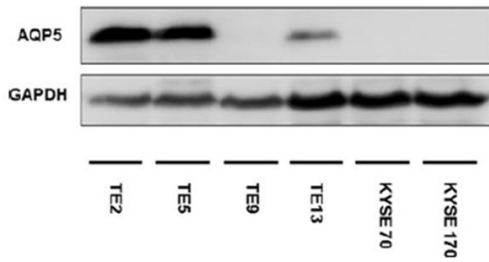


図1 食道癌細胞株における AQP5 発現

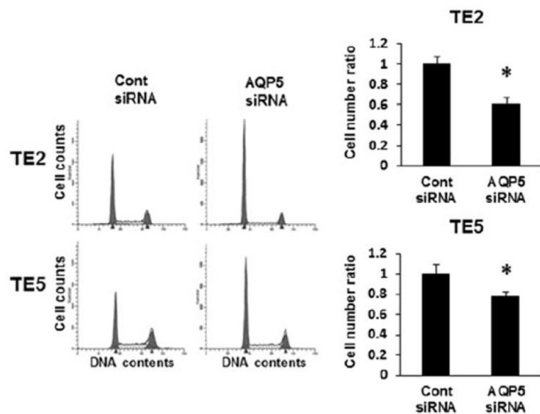


図2 細胞周期解析

図3 細胞増殖解析

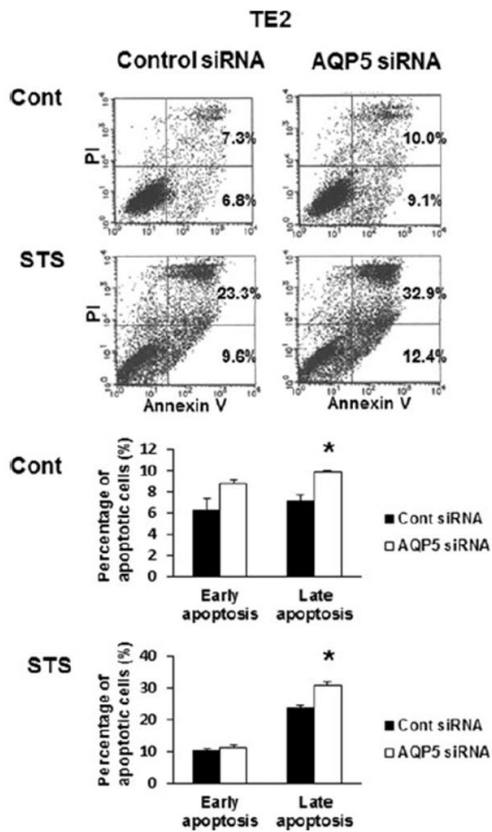


図4 アポトーシス解析

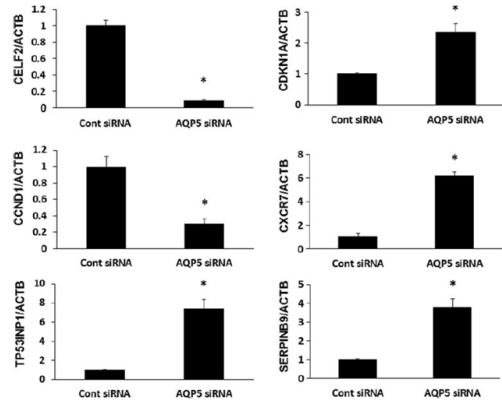


図5 細胞周期関連遺伝子の発現変化

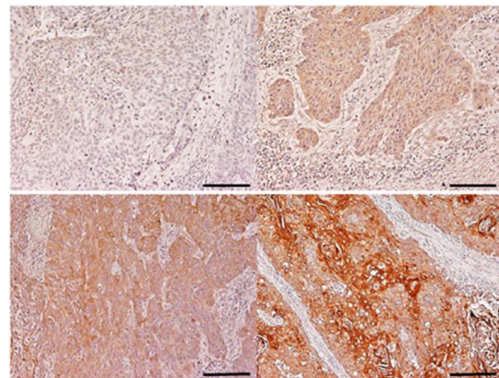


図6 食道癌組織 AQP5 免疫染色

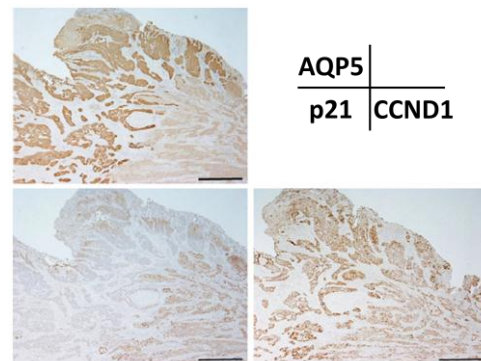


図7 AQP5、p21、CyclinD1(CCND1)発現

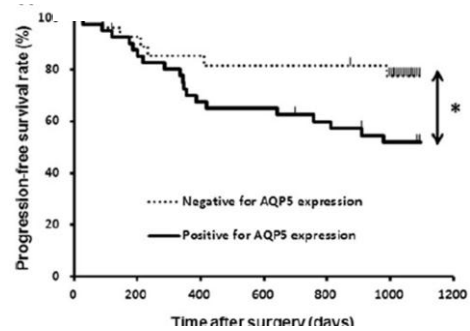


図8 無再発生存率

## 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) Shimizu H, Shiozaki A, Ishii H, et al.  
The expression and role of Aquaporin 5 in esophageal squamous cell carcinoma. J Gastroenterol. 2013, 印刷中, 査読有. 10.1007/s00535-013-0827-9.
- (2) Iitaka D, Shiozaki A, Ishii H, et al.  
Blockade of chloride ion transport enhances the cytotoxic effect of hypotonic solution in gastric cancer cells. J Surg Res. 2012;176:524-34. 査読有, 10.1016/j.jss.2011.10.039.
- (3) Nako Y, Shiozaki A, Ishii H, et al.  
Enhancement of the cytotoxic effects of hypotonic solution using a chloride channel blocker in pancreatic cancer cells. Pancreatology. 2012;12(5):440-8. 査読有, 10.1016/j.pan.2012.08.003.

[学会発表] (計2件)

- (1) Nakou Y, Shiozaki A, Ishii H, et al.  
Enhancement of cytotoxic effect of hypotonic solution using chloride channel blocker in pancreatic cancer cells. 日本癌学会学術総会, 2012年9月19-21, 愛知.
- (2) 竹本健一、塩崎敦、石井博道ら. 消化器癌細胞におけるクロライド輸送体制御を利用した低浸透圧細胞破壊効果の増強. 日本外科学会, 2013年4月11-13, 福岡.

[図書] (計0件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 博道 (ISHII HIROMICHI)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：90515206

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：