

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380168

研究課題名(和文)低酸素・低栄養微小環境で増殖する肥満細胞腫の生き残り機構の分子解析

研究課題名(英文)Molecular analysis on neoplastic survival of mast cells in a poor microenvironment

研究代表者

田中 あかね (Tanaka, Akane)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80418673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、伴侶動物臨床でよく遭遇する肥満細胞腫が生き残る理由を、ストレス応答や細胞内代謝から分子生物学的に解析した。マウスの肥満細胞を低酸素環境で培養すると血管新生誘導因子の産生が亢進した。また培養中に酸素濃度を変化させると脱顆粒が誘導された。イヌの肥満細胞腫から樹立した様々な細胞株を用いて検証すると、血管新生因子の産生に加えて、ビルビン酸キナーゼ活性が亢進することから、解糖系の活性化が示唆された。また腫瘍性の肥満細胞では小胞体ストレス応答が亢進していた。以上の結果から、腫瘍性の肥満細胞では、低酸素応答性や細胞内代謝を亢進して急速な増殖に伴う劣悪な微小環境に対応していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the current study, I explored the molecular mechanisms which underpins neoplastic proliferation and survival of mast cells in a poor micro environment. Particularly, stress response and intracellular metabolism of malignant mast cells were investigated. Cytokines that induce neovascularization were up-regulated when mouse bone marrow-derived cultured mast cells were incubated in hypoxic condition. Relative hypoxia, but not hyperoxia, induced degranulation of mast cells in antigen and IgE independent manner. Not only production of angiogenic factors but also glycolysis were promoted in mast cells derived from canine mast cell tumor. In addition, acceleration of endoplasmic reticulum responses was identified in malignant but not normal mast cells. These results suggest that aggravation of above mentioned responses to hypoxia and lack of nutrition might involve in rapid growth of neoplastic mast cells.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：獣医学 腫瘍 ストレス応答 低酸素

1. 研究開始当初の背景

代表者はこれまでに、肥満細胞腫やリンパ腫など、イヌ・ネコに多発する造血系悪性腫瘍に関し、細胞周期調節タンパク質の発現動態を詳細に解析し、アポトーシス抑制因子の誘導との関連などを検討してきた。多くの細胞種では、D型サイクリンとサイクリン依存性キナーゼ4または6が複合体を形成し、サイクリンEと結合するサイクリン依存性キナーゼ2を介して細胞周期をG1期からS期へと進行させているが、肥満細胞腫細胞ではD型サイクリンとサイクリン依存性キナーゼ2が結合しており、サイクリンEを介さずに細胞周期を進行させることを明らかにした(平成18~20年度、基盤研究B)。また、造血系悪性腫瘍細胞株を正常または低酸素濃度下で培養すると、低酸素反応性因子(HIF)の発現や関連遺伝子の発現が増強され、細胞の抗アポトーシスタンパク質や血管誘導因子の発現が亢進することを見出した(平成21~23年度、基盤研究B)。これらの研究の中で、がん細胞を低栄養状態(血清飢餓)あるいは低酸素状態(酸素濃度1%)におくと、増殖はしなくなるが長期間にわたって生存し、栄養状態(血清添加)や酸素濃度が改善すると再び増殖へ転ずるといった現象を発見している。劣悪な微小環境を生きのびるという能力(栄養飢餓耐性および酸素飢餓耐性)は、がん細胞が宿主を何度も苦しめることになる最大の特徴である。がん細胞の生存機構は上皮系固形癌で研究が進み、細胞死への抵抗性を付与する様々なメカニズムが提起されている。

2. 研究の目的

本研究では、がん細胞の生き残り戦略の分子メカニズムを肥満細胞腫について解析することで、肥満細胞の生存維持機構とがん化への関与を明らかにし、新たな治療標的分子の探索に繋げることを目的とした。また、肥満細胞の生理学的意義や肥満細胞が関連するアレルギー性疾患の制御に関しても、重要な知見を提供できると考え着想した。具体的には、肥満細胞腫細胞におけるストレス応答性を、細胞内における小胞体ストレス反応、オートファジー、および解糖系に着目して解析した。各項目について様々な動物およびヒトの肥満細胞株やイヌ臨床例から樹立した肥満細胞株を用いて基礎的検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 肥満細胞腫における解糖系代謝機能の解析

休止期を経ない細胞周期の進行により、がん細胞では異常な速度での細胞増殖が繰り返されている。これには多大なエネルギーと細胞構成成分の供給を必要とする。特に嫌気的条件下にあるがん細胞ではミトコンドリアの機能は低下し、TCA回路の停滞および解糖系の異常な活性化状態に陥る。解糖系では

酸素供給が十分に確保されると解糖速度は低下し、逆に不足すると上昇するという性質があるため、がん細胞ではグルコースの消費量が常に増加し、その多くが解糖系を経て乳酸へ代謝される。つまり、正常細胞と比べ亢進した解糖系の影響により乳酸産生量が増加すること、解糖系律速酵素であるホスホフルクトキナーゼ1(PFK1)およびピルビン酸キナーゼ(PK)、さらに乳酸脱水素酵素(LDH)の活性が高まることが特徴である。そこで、代表者らが所有する6種類のイヌ肥満細胞腫細胞およびヒトやげっ歯類の肥満細胞株を用いて、細胞内乳酸量、PFK1、PK、LDHの検出や動態解析を行い解糖系の活性化状態を解析した。

(2) 肥満細胞腫におけるオートファジー機構の解析

すでに代表者らは、肥満細胞腫細胞では一般的な自己食機構としてのオートファジーが減弱しており、血清飢餓などのストレスによって誘導されないことを見つけている。このことは、肥満細胞腫がオートファジー細胞死に強い抵抗性を有する可能性を示唆している。そこで、イヌ肥満細胞腫細胞を酸素および栄養飢餓状態でのオートファジーをさらに解析し、オートファジー抑制剤や誘導剤を作用させ、その影響を調べることで、肥満細胞腫細胞におけるオートファジーの意義を解析した。

(3) 肥満細胞腫における小胞体ストレス回避反応の解析

小胞体内腔に折り畳み不全のタンパク質が蓄積する小胞体ストレスが加わると細胞は直ちにストレスから回避するための防御システムを活性化させる(小胞体ストレス応答、UPR)。このストレス応答系は酵母から哺乳細胞に至るまで真核細胞に広く保存されており、非常時に細胞死から身を守る重要なシステムである。小胞体ストレスセンサーとして異常タンパク質の蓄積を感知し、細胞質あるいは核内にシグナルを伝える小胞体膜タンパク質の検出や核内移行、さらには小胞体ストレス応答シグナル分子や遺伝子の検出を行って、肥満細胞腫細胞の酸素および栄養飢餓時の小胞体ストレスを解析する。また抑制あるいは誘導剤を用いて、肥満細胞腫細胞における小胞体ストレス反応性を解析した。

4. 研究成果

(1) 低酸素・低栄養環境での培養と網羅的解析

イヌおよびヒトやげっ歯類の肥満細胞腫細胞に関して、様々な飢餓ストレス応答タンパク質の発現動態とその相互作用を調べたところ、細胞の生存や活性化には大きな変化が認められなかったが、細胞内サイトカインの発現において血管内皮細胞増殖因子(VEGF)や

線維芽細胞増殖因子 (FGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、インターロイキン4、5、13などの発現が増加することが明らかになった。このことは、増殖する腫瘍の局所で低酸素環境が発生した時に、血管新生を促進する VEGF、FGF、HGF を産生して血管を組織内に誘導するとともに、Th2 型サイトカインを放出し抗腫瘍性の Th1 型サイトカインを抑制することで、腫瘍の拡大を促進している可能性を示している。また、イヌ肥満細胞腫の中には、増殖因子である stem cell factor を自己産生することで増殖が誘導されているものが存在し、新たな肥満細胞の増殖機構はイヌ症例から採取した肥満細胞腫組織においても確認された。この SCF 自己産生は、PI3 シグナル系などを介して誘導されていた。さらに、肥満細胞腫細胞を培養中に酸素濃度を変化させた時、特に相対的低酸素にすると細胞の活性化や脱顆粒が誘導され、様々な細胞内因子が放出されることが明らかとなった。この時に放出されるトリプターゼは、VEGF とは異なるカスケードで末梢血管の新生を誘導した。

(2) 低酸素反応性因子の検出

イヌ及びヒトの造血系悪性腫瘍細胞株を正常酸素濃度下または低酸素濃度下で培養し、低酸素反応性因子 (HIF) の発現や関連遺伝子の発現動態を調べたところ、肥満細胞における HIF の発現はやや増強するもののその発現強度は他の細胞と比べ高くなかった。

(3) オートファジーの誘導

肥満細胞を IgE で感作するとオートファジーが誘導された。しかしながら特異高原で暴露して脱顆粒を誘導すると顕著ではなくなった。イヌ肥満細胞腫から樹立した様々な細胞株で確認したが、オートファジーに関する一定の知見は得られず、細胞や動物腫、あるいは細胞周期によってオートファジー状態は様々であった。

(4) ストレス応答性の解析

イヌ肥満細胞腫から樹立した様々な肥満細胞株、げっ歯類やヒトの腫瘍性肥満細胞株、および正常なマウスやヒトの肥満細胞株について解糖系の亢進を比較検討したところ、腫瘍性の肥満細胞でピルビン酸キナーゼ活性が亢進していた。とくにイヌの肥満細胞腫細胞では、げっ歯類やヒトと比べて活性は亢進していた。また、小胞体ストレス応答について解析すると、解糖系と同様に腫瘍性の肥満細胞で明らかな亢進が認められた。これらの結果より、肥満細胞は腫瘍化の過程で、低酸素環境に耐えるべく解糖系による ATP 産生を亢進させるとともに、腫瘍性の増殖が引き起こす異常なタンパク質の細胞内蓄積への対応として小胞体ストレス応答が亢進する可能性が示唆された。これらの事象は、腫瘍化の原因ではないかもしれないが、腫瘍性増殖の維持に重要であり、将来的な治療ターゲット

となる可能性を示唆している。

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10件)

(1) Amagai Y, Matsuda A, Jung K, Oida K, Jang H, Ishizaka S, Matsuda H, Tanaka A. A point mutation in the extracellular domain of KIT promotes tumorigenesis of mast cells via ligand-independent auto-dimerization. *Sci Rep*. 2015; 5: 9775. doi: 10.1038/srep09775. 査読あり

(2) Jensen-Jarolim E, Fazekas J, Singer J, Hofstetter G, Oida K, Matsuda H, Tanaka A. Crosstalk of carcinoembryonic antigen and transforming growth factor- β via their receptors: comparing human and canine cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2015; 64: 531-537. doi: 10.1007/s00262-015-1684-6. 査読あり

(3) Furusaka T, Tanaka A, Matsuda H, Hasegawa H, Asakawa T, Shigihara S. Cervical branch of the facial nerve approach for retrograde parotidectomy compared with anterograde parotidectomy. *Acta Otolaryngol*. 2014; 134: 1192-1197. doi: 10.3109/00016489.2014.900701. 査読あり

(4) Oida K, Matsuda A, Jung K, Xia Y, Jang H, Amagai Y, Ahn G, Nishikawa S, Ishizaka S, Jensen-Jarolim E, Matsuda H, Tanaka A. Nuclear factor- κ B plays a critical role in both intrinsic and acquired resistance against endocrine therapy in human breast cancer cells. *Sci. Rep*. 2014; 17: 4: 4057. doi: 10.1038/srep04057. 査読あり

(5) Amagai Y, Tanaka A, Jung K, Matsuda A, Oida K, Nishikawa S, Jang H, Ishizaka S, Matsuda H. Production of stem cell factor in canine mast cell tumors. *Res. Vet. Sci*. 2014; 96: 124-126. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.10.014. 査読あり

(6) Nishikawa S, Tanaka A, Matsuda A, Oida K, Jang H, Jung K, Amagai Y, Ahn G, Okamoto N, Ishizaka S, Matsuda H. A molecular targeting against nuclear factor- κ B, as a chemotherapeutic approach for human malignant mesothelioma. *Cancer Med*. 2014; 3: 416-425. 査読あり

(7) Amagai Y, Tanaka A, Matsuda A, Jung K, Ohmori K, Matsuda H. Stem cell factor contributes to tumorigenesis of mast cells via an autocrine/paracrine mechanism. *J. Leukoc. Biol*. 2013; 93: 245-250. doi: 10.1189/jlb.0512245. 査

読あり

(8) Amagai Y, Tanaka A, Matsuda A, Oida K, Jung K, Matsuda H. The phosphoinositide 3-kinase pathway is crucial for the growth of canine mast cell tumors. J. Vet. Med. Sci. 2013: 75:791-794. <http://doi.org/10.1292/jvms.12-0540> 査読あり

(9) Amagai Y, Tanaka A, Matsuda A, Oida K, Jung K, Nishikawa S, Jang H, Ishizaka S, Matsuda H. Increased expression of the antiapoptotic protein MCL1 in canine mast cell tumors. J. Vet. Med. Sci. 2013: 75: 971-974. <http://doi.org/10.1292/jvms.13-0025> 査読あり

(10) Amagai Y, Tanaka A, Matsuda A, Jung K, Oida K, Nishikawa S, Jang H, Matsuda H. Heterogeneity of internal tandem duplications in the c-kit of dogs with multiple mast cell tumours. J Small Anim Pract. 2013: 75: 377-380. doi: 10.1111/jsap.12069. 査読あり

〔学会発表〕(計 8 件)

(1) Tanaka A, et al.
Role of nuclear factor-kappaB in both intrinsic and acquired resistance against endocrine therapy in breast cancer. 19th World Congress on Advance in Oncology, Athens (Greek), 2014 年 10 月 10 日 (招待講演)

(2) Oida K, Tanaka A, et al.
NF-kappaB, a new target molecule in treatment of mesothelioma, 18th World Congress on Advance in Oncology, Athens (Greek), 2013 年 10 月 12 日

(3) 雨貝陽介, 田中あかね, 他
KIT 細胞膜ガイドメイン点変異による肥満細胞の腫瘍化、日本獣医学会学術集会、岐阜大学 (岐阜県岐阜市) 2013 年 9 月 21 日

(4) 雨貝陽介, 田中あかね, 他
KIT 細胞膜ガイドメイン点変異による肥満細胞の腫瘍化、CBSM2013、ホテル石庭(山梨県笛吹市) 2013 年 7 月 13 日

(5) Tanaka A, et al.
Splicing regulation of glucocorticoid receptor isoforms in lymphocytes with glucocorticoid resistance. EAACI 2013, Milan (Italy), 2013 年 6 月 13 日 (招待講演)

(6) Oida K, Tanaka A, et al.
House dust mite allergens induce IgE-dependent activation of canine mast cells NI-1. Annual Meeting of German Society for Immunology, Vienna (Austria), 2013 年 4 月 5 日

(7) 北村亮, 田中あかね, 他

イヌ肥満細胞腫におけるc-kit mRNA全長の塩基配列解析、日本獣医学会学術集会、岩手大学 (岩手県盛岡市) 2012年9月16日

(8) 雨貝陽介, 田中あかね, 他
イヌ肥満細胞腫における幹細胞因子自己産生メカニズム、日本獣医学会学術集会、岩手大学 (岩手県盛岡市) 2012 年 9 月 16 日

〔図書〕(計 2 件)

(1) 田中あかね, 雨貝陽介, 松田浩珍
肥満細胞腫における分子標的治療法の最近の知見 (J-Vet) 株式会社インターズー
2012: 16-24

(2) 田中あかね, 松田彬, 雨貝陽介, 松田浩珍
肥満細胞の腫瘍化メカニズム (J-Vet) 株式会社インターズー
2012: 8-15

〔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 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
http://www.tuat.ac.jp/~mol_path/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 あかね (Tanaka Akane)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号 : 80418673

(2)研究分担者

岸本 海織 (Kishimoto Miori)
東京農工大学・大学院農学研究院・講師
研究者番号 : 50588960

松田 彬 (Matsuda Akira)

東京農工大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号： 90613969

(3)連携研究者
該当なし