

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590379

研究課題名(和文) 発癌における炎症とホスホリパーゼC の機能の解明

研究課題名(英文) Role of inflammation and phospholipase Cepsilon in tumor development

研究代表者

枝松 裕紀 (Edamatsu, Hironori)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70335438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍形成には、腫瘍細胞の遺伝子変異に加え、周囲の微小環境も大きく関与する。低分子量GTPaseのRasとRapのエフェクターであるホスホリパーゼC (PLC)は、腫瘍微小環境中での炎症促進を介して腫瘍形成に役割を果たすが、その詳細な分子機構についてはよくわかっていない。本研究では、PLC がI Bの持続的な不活性化を介して炎症関連遺伝子の発現を上昇させることを示す。また、in vitroでの活性化型変異体H-Rasの過剰発現による細胞生存が、培地からの亜鉛イオンとグルコースの供給に影響を受けることも示す。これらの因子は共にin vivoにおいて腫瘍微小環境中から供給されることが知られている。

研究成果の概要(英文)：Tumor development is driven not only by the alterations in the genome of cancer cells itself but also by the surrounding microenvironment that supplies factors crucial for their growth and survival. Although it is known that phospholipase C (PLC), an effector of Ras and Rap small GTPases, plays an important role in tumor development through augmenting cancer-associated inflammation in the tumor microenvironment, the molecular mechanism by which PLC -mediated tumor development is not fully understood. This research shows that PLC mediates signals that upregulates proinflammatory gene transcription through prolongation of I B inactivation. It shows that the survival of cells overexpressing the mutationally-activated H-Ras in vitro is affected by the supply of zinc ions and glucose, both of which are known to be supplied from the microenvironment in vivo.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Rasシグナル 炎症 腫瘍微小環境 糖代謝 亜鉛

1. 研究開始当初の背景

腫瘍の形成とその悪性化は、腫瘍細胞でのがん遺伝子・がん抑制遺伝子の変異のみで進行するのではなく、その周囲の環境(微小環境)の影響を大きく受ける。特に炎症やそのメディエーター(サイトカイン)は、重要な役割を果たしていることが様々な研究により示唆されていた。例えば、家族性大腸ポリポーシス(FAP)の患者に対する抗炎症作用を示すシクロオキシゲナーゼ2(COX-2)阻害剤の投与は、FAPの患者における腺腫の悪性化を抑制する。また、がん遺伝子の活性型変異等によりトランスフォームした細胞は細胞死を起こしやすいが、その細胞死回避には炎症性サイトカインが関与するなど炎症などの腫瘍形成、増殖、悪性化での重要性が示唆されていた。

ホスホリパーゼ Cε (PLCε) は、ホスホイノシチド特異的 PLC の一つで、ras がん遺伝子産物である Ras タンパク質とその類縁の Rap タンパク質の下流因子(エフェクター)の一つとして機能する細胞内シグナル伝達分子である。PLCε は上流刺激による活性化に伴い、ホスファチジルイノシトール・ビスリン酸を加水分解し、イノシトール3リン酸とジアシルグリセロールとを産生する(図1)。PLCε との発がんとの関係は、研究代表者らによる遺伝子ノックアウト(KO)マウスを用いた一連の解析により、実験動物レベルで明らかにされてきた。それらによれば、PLCε は、上皮や間質などの非免疫細胞での炎症性サイトカインの産生促進により炎症性の腫瘍微小環境の形成を促し、腫瘍形成に関与すると考えられている。ヒトにおいては、近年のゲノムワイド解析により PLCε をコードする遺伝子(PLCE1)の多型と胃腺がん、あるいは食道扁平上皮がんとの関連が指摘されるようになってきた。

しかし、腫瘍形成に関わる PLCε の関与の機構、特に腫瘍形成に重要である PLCε によるサイトカインの産生制御の仕組みには不明な点が多く残されていた。さらには、個体レベルでは、がん遺伝子活性化後の腫瘍の形成とその悪性進展に関わる炎症をはじめとする微小環境の意義については、不明な点が多く残されていた。

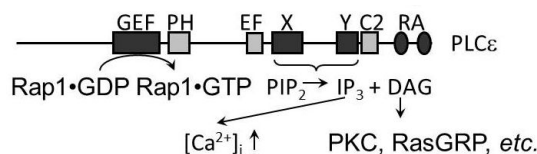


図1. PLCεの構造と機能

2. 研究の目的

このように、PLCε による腫瘍形成促進機構として、炎症性サイトカイン産生促進による腫瘍微小環境の形成を介したものであると考えられた。しかし、腫瘍形成に関わる

PLCε によるサイトカイン産生機構については、不明な点が多く残されていた。さらに、炎症をはじめとする微小環境因子による腫瘍形成や悪性化の制御機構は不明な点が残されていた。そこで、下記の2つの研究目的により、本研究課題を進めた。

(1) 腫瘍形成・悪性化に関わるサイトカインとその産生機構: 主に PLCεKO マウスを用いた腫瘍形成モデルで解析し、間質や上皮などの非免疫細胞での PLCε による炎症性サイトカイン産生の関与を明らかにし、さらに分子機構も明らかにする。

(2) がん遺伝子活性型変異が誘導する細胞死と炎症をはじめとする微小環境因子との関係: 培養細胞を用いた *in vitro* 系での解析を行い、活性型変異体がん遺伝子産物(H-ras 活性型変異体)発現による細胞死の特性を明らかにする。さらに、腫瘍形成に関わる微小環境因子として炎症性サイトカインなどによる細胞死制御のシグナル伝達を明らかにする。腫瘍数決定に関わると予想されるがん遺伝子活性化(イニシエーション)後の腫瘍細胞に対する炎症など微小環境因子の役割を、分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍形成・悪性化に関わるサイトカインとその産生機構:

マウス腫瘍モデルを用いた *in vivo* 解析: Apc がん抑制遺伝子にナンセンス変異を持つ ApcMin マウスでは、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を含む飲料水を飲水させると大腸炎誘発性の腺腫が形成される。PLCεKO マウスとの交配により PLCε 野生型(以下、PLCεWT)あるいは PLCεKO の異なる PLCε 遺伝子型を持つ ApcMin マウスを作成し、腺腫形成への PLCεKO の影響を病理学的に解析した。形成した腫瘍の数とその異型度をまとめ、PLCε 遺伝子型との相関を検討した。また、Apc 遺伝子に変異のないマウスを用いて DSS 飲水による炎症と PLCε 遺伝子型との相関を検討した。さらに、PLCεKO により mRNA レベルでの発現低下が認められる炎症性サイトカインを定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) で同定した。PLCε 遺伝子型依存的に発現する炎症性サイトカインの産生細胞の同定を目的として、一部の炎症性サイトカインについては、その産生細胞を抗サイトカイン抗体による免疫染色で検出した。

培養細胞を用いた PLCε 依存的サイトカイン産生機構の解析: 研究代表者らの先行研究から、PLCε は、ヒト株化角化細胞(PHK16-0b)やマウス初代培養細胞での腫瘍壊死因子(TNF)-α 刺激によるケモカイン CCL2 (別名 MCP-1) などの発現制御に関わることがわかっている。そこで、ヒト大腸由来株化細胞(ともにヒト大腸がん由来の DLD-1、Caco-2)でも同様に PLCε 依存的に炎症性サイトカインが産生されるか検討した。これらの細胞に PLCε を標的とした

siRNA をエレクトロポレーション法によりトランスフェクトして *PLCε* をノックダウンした。*PLCε* がノックダウンされたこれらの細胞を TNF-α 刺激し、TNF-α 刺激による発現誘導が *PLCε* ノックダウンで阻害されるサイトカイン等の mRNA を逆転写 (RT)-PCR または qRT-PCR により探索した。次いで、*PLCε* 依存性発現が認められたサイトカインの発現制御に関わる細胞内シグナル伝達系について、伝達因子の候補となるキナーゼに対する阻害剤の効果を検討した。阻害剤の効果が示されたシグナル経路については、そのシグナル伝達分子の活性型 (リン酸化型) 特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングにて、*PLCε* ノックダウンの影響を検討した。

(2) がん遺伝子活性型変異が誘導する細胞死と炎症をはじめとする微小環境因子との関係：構成的活性型変異体 H-Ras (H-RasG12V 変異体) を薬剤 (イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド; IPTG) 添加により発現誘導できる 2 種の株化細胞 (iRas:3T3 および iRas:Rat-1) を解析に供した。iRas:Rat-1 細胞は、無血清下での H-RasG12V 変異体発現により、細胞死を起こす。その細胞死の際にカスパーゼ 3 (caspase3) が活性化されるか、活性型特異的抗体によるウェスタンブロッティングで検討した。また、*in vivo* におけるがん細胞の環境を模倣する目的で、様々な培地条件によるシグナル伝達への影響を解析した。まず、培地からの炭素源 (グルコース、グルタミン) の除去を行うことで、これらの枯渇を模倣し、その細胞生存・細胞死への影響を検討した。さらに、血清中に含まれる細胞死抑制物質の探索を目的として、脂肪酸が除去されていないウシ血清アルブミンや亜鉛イオンなどを血清の代わりに無血清の培地に添加し、その効果を検討した。また、培地条件の違いによる細胞内シグナル伝達系への効果については、各種活性型 (あるいはリン酸化型) 特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングにより (1) と同様に検討した。

4. 研究成果

(1) 腫瘍形成・悪性化に関わるサイトカインとその産生機構：

マウス腫瘍モデルを用いた *in vivo* 解析：*PLCε*WT あるいは *PLCε*KO の遺伝子背景を持つ ApcMin マウスを準備した。それらに DSS を自由飲水させて、大腸炎誘発性大腸腺腫形成実験を行った。その結果、*PLCε*KO 背景を持つ ApcMin マウスでは、*PLCε*WT 背景を持つ ApcMin マウスと比べてときに、形成される腺腫の個数の減少、ならびにそれらの悪性進展が有意に抑制された。*PLCε*KO 背景での腫瘍数低下は、DSS 飲水時に誘導される炎症の低下に起因するものと考えられた (図 2)。*PLCε* がその発現細胞において種々の炎症性サイトカインの産生に関与すると考えられたので、*PLCε* 発現細胞の検討、な

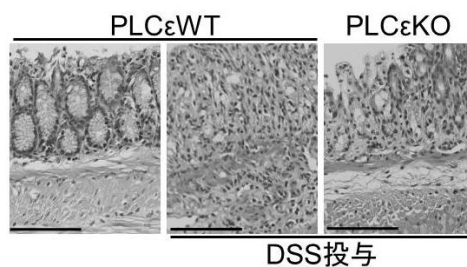


図2. *PLCε*ノックアウトによる腸炎の抑制ならびに DSS 飲水による炎症誘発時のサイトカイン産生への *PLCε*KO の影響の検討を免疫組織化学的に行った。その結果、*PLCε* は腸上皮にその発現が強く見られ、さらにそれらの細胞でサイトカインが産生されることが分かった (図 3)。そのサイトカイン産生は、*PLCε*KO により低下することが確認された

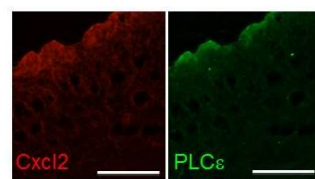


図3. 腸上皮でのサイトカインと *PLCε* の発現

らびに *PLCε* による炎症性サイトカイン産生亢進が ApcMin マウスでの腸管腺腫形成に促進的に機能することが示唆された。

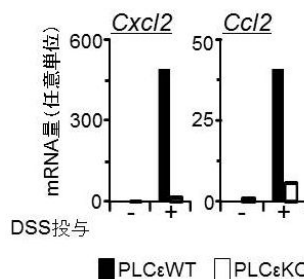


図4. *PLCε*ノックアウトによるサイトカイン産生抑制

培養細胞を用いた *PLCε* 依存的サイトカイン産生機構の解析：TNF-α 刺激によるサイトカイン産生機構について、ヒト大腸がん由来の DLD-1 細胞および Caco-2 細胞を用いて解析

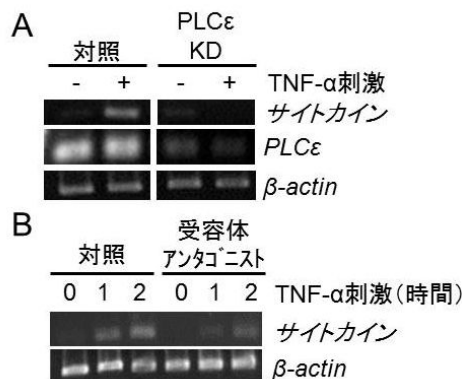


図5. *PLCε*ノックダウンと受容体アンタゴニストによるサイトカイン産生抑制

した。これらの細胞で siRNA のトランスフェクションによる *PLCε* のノックダウンを試みたところ、Caco-2 細胞でのノックダウンが

良好であったことから、以下の実験に Caco-2 細胞を用いることにした。Caco-2 細胞では、PLCε ノックダウンが TNF-α 刺激によるサイトカイン遺伝子活性化に関わる持続的 NF-κB の核移行やそれに必須である IκB のリン酸化と分解を抑制することが分かった。しかし、TNF-α は直接には PLCε を活性化できなかった。その際に PLCε の活性化に関与する液性因子の 1 つを、細胞膜受容体アンタゴニストによる阻害実験で見出した (図 5)。以上のことから、TNF-α 刺激を受けた Caco-2 細胞では、TNF-α 受容体活性化の後に別の細胞膜受容体が活性化され、その結果 PLCε 経路が活性化されて IκB のリン酸化と分解が持続的になると考えられた。また、その際 IκB リン酸化は IKK とは異なるリン酸化酵素が関与する可能性が示された。

(2) がん遺伝子活性型変異が誘導する細胞死と炎症をはじめとする微小環境因子との関係：H-RasG12V 変異体を IPTG 依存的に発現する 2 種類の細胞で、無血清下での H-RasG12V 発現による細胞死誘導を検討した (図 6)。その結果、ラット胎児線維芽細胞 Rat-1 細胞由来の iRas:Rat-1 では、

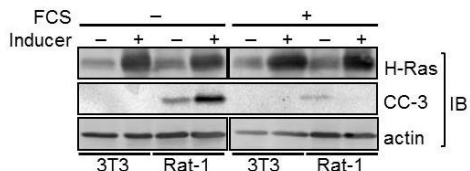


図6. 無血清下でのH-RasG12V発現とカスパーゼ3活性化

H-RasG12V 発現に伴うカスパーゼ3活性化がウェスタンブロットで、切断型カスパーゼ3 (CC-3) として確認された。一方、マウス胎児線維芽細胞 3T3 細胞由来 iRas: 3T3 では、H-RasG12V 発現に伴うカスパーゼ3の活性化が逆に抑制された。血清 (10% ウシ胎児血清; FCS) 存在下で同様の実験をしたところ、iRas:Rat-1 と iRas: 3T3 の両者で共に、カスパーゼ3の活性化が H-RasG12V の発現により抑制された。これらのことから、iRas:Rat-1 細胞での H-RasG12V 発現による細胞死抑制には FCS 中の細胞死抑制物質が要求されることが示唆された。また、iRas:Rat-1 細胞での H-RasG12V 発現によるカスパーゼ3活性化は、ストレス応答性 MAP キナーゼ (p38MAPK、および JNK) に対する阻害剤の処置で抑制されたことから、この細胞死へ

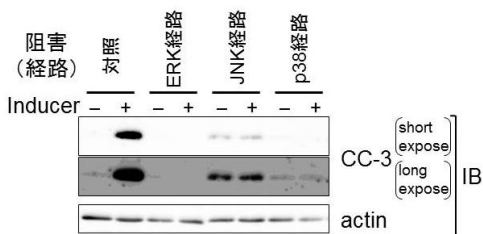


図7. 各種MAPK経路阻害剤の効果

のこれらストレス応答性 MAP キナーゼの関与が示唆された (図 7)。

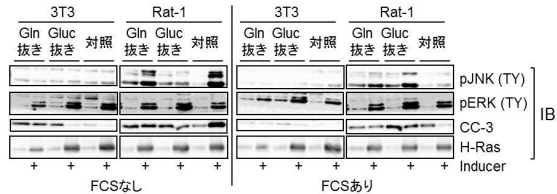


図8. H-RasG12V発現によるカスパーゼ3活性化などに対する炭素源の影響

次に、培地中の炭素源の検討を行った。通常のダルベッコ改変イーグル培地 (4.5 g/l のグルコースを含む) から、グルコースあるいはグルタミンを除去したところ、特にグルコースを除去により iRas:Rat-1 細胞での H-RasG12V 発現によるカスパーゼ3活性化が引き起こされなかった (図 8)。さらに、ストレス応答性 MAP キナーゼの活性化も低下した (図 8)。これらのことから、H-RasG12V 発現によって引き起こされる細胞内シグナル伝達系の活性化に、代謝系に依存したものがあることが明らかとなった。

また、血清中に含まれる細胞死抑制物質の探索を目的として、亜鉛イオンなどを血清の代わりに無血清の培地に添加し、その効果を検討無血清下での iRas:Rat-1 細胞での H-RasG12V 発現によるカスパーゼ3活性化への効果を調べた。その結果、10% FCS に相当する濃度の亜鉛イオンを培地へ添加すると、無血清下であっても H-RasG12V 発現によりカスパーゼ3活性化が起らず、血清添加時と同様に阻害的になった (図 9)。

以上の観察事実は、H-RasG12V 発現により糖代謝系において、亜鉛イオン要求性の制御がかかる可能性を示唆している。そこで糖代謝経路の酵素類を中心に、それらの活性に関わる翻訳後修飾が培地中の亜鉛イオンと H-RasG12V 発現の有無により変化するものを探索した。その結果、無血清下での活性型

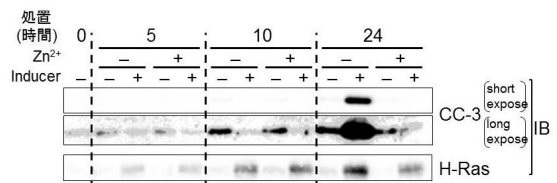


図9. H-RasG12V発現によるカスパーゼ3活性化に対する亜鉛イオンによる抑制効果

H-Ras 発現による翻訳後修飾が培地中の亜鉛とグルコースの濃度により影響を受けていると思われるタンパク質を見出した。

亜鉛イオンの取り込みの上昇が、がん遺伝子でトランスフォームした細胞やがん細胞の生存・増殖に重要であることが、他の研究者による先行研究で示唆されている。このことを踏まえ、本研究での成果は、がんの生存・増殖における亜鉛イオンの役割を示すものであると言える。

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2件)

Nagano, T., Edamatsu, H., Kobayashi, K., Takenaka, N., Yamamoto, M., Sasaki, N., Nishimura, Y., and Kataoka, T. (2014). Phospholipase C ϵ , an effector of ras and rap small GTPases, is required for airway inflammatory response in a mouse model of bronchial asthma. *PLoS One*, **9**, e108373. (査 読 有)
<http://www.lib.kobe-u.ac.jp/repository/9002727.pdf>

Okada, K., Miyake, H., Yamaguchi, K., Chiba, K., Maeta, K., Bilasy, S.E., Edamatsu, H., Kataoka, T., and Fujisawa, M. (2014). Critical function of RA-GEF-2/Rapgef6, a guanine nucleotide exchange factor for Rap1, in mouse spermatogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **445**, 89-94. (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

枝松裕紀、片岡 徹. Rasにより活性化される細胞内シグナル伝達系制御への代謝産物と金属イオンの関与 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25日 パシフィコ横浜(神奈川県)

脇田将裕、枝松裕紀、片岡 徹. ホスホリパーゼ C ϵ を介したサイトカイン産生制御機構の解明 第37回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜(神奈川県)

Nagano, T., Edamatsu, H., Kobayashi, K., Nishimura, Y., and Kataoka, T. Crucial role of phospholipase C ϵ in T helper type 2 cell-mediated airway inflammation in mice. ATS2014 2014年5月20日 サンディエゴ(アメリカ合衆国)

永野達也、枝松裕紀、小林和幸、西村善博、片岡 徹. 気道炎症におけるホスホリパーゼ C ϵ の役割 第4回 IAA 学術集会 2013年4月21日 東京国際フォーラム

脇田将裕、枝松裕紀、北澤荘平、片岡 徹. Crucial role of phospholipase C ϵ in colitis-induced colon tumor formation in ApcMin mice (日本語演題名: ApcMin マウスの腸炎誘発性大腸腺腫発生におけるホスホリパーゼ C ϵ の重要な役割)第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11日 福岡国際会議場(福岡県)

〔図書〕(計1件)

枝松裕紀、片岡 徹、南山堂、15. がん微小環境を制御する Ras/Rap 標的タンパク質 PLC ϵ の選択的阻害剤の開発(次世代がん戦略研究 Update がん基盤生物学 革新的シーズ育成に向けて) 2013年、336(142-146)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/molbiol/index.html>

html

6. 研究組織

(1)研究代表者

枝松 裕紀 (EDAMATSU, Hironori)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 70335438

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: