

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：23903
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24592036
 研究課題名(和文)膵臓癌における Bcl-xL と Mcl-1 の機能解明と siRNA を用いた臨床応用

 研究課題名(英文) Simultaneous knock-down of Bcl-xL and Mcl-1 induces apoptosis in pancreatic cancer cells

 研究代表者
 高橋 広城 (Takahashi, Hiroki)

 名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

 研究者番号：30381792

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円

研究成果の概要(和文)：膵臓癌は消化器癌の中でも最も悪性度の高いものである。既存の治療にも強い抵抗性があり、このメカニズムを解明することが急務である。

われわれは膵臓癌細胞株におけるアポトーシス(細胞の自己死)に関与すると言われる Bcl-2 ファミリー蛋白について検討し、Bcl-2 ファミリー蛋白の中でも Mcl-1 と Bcl-xL が膵臓がんにおいて非常に強く発現しており、この2つのタンパクを同時にブロックすることで、膵癌細胞に強いアポトーシスを誘導することを解明した。これはこれまでには全く報告されていない発見であり、これからの膵臓癌治療において非常に有用な治療ターゲットとなりうる事が予想された。

研究成果の概要(英文)：Of all gastrointestinal carcinomas, pancreatic cancer (PaCa) has the most unfavorable prognosis. Anti-apoptotic members of the Bcl-2 protein family are often over-expressed in human cancers and are thought to mediate the resistance to chemotherapeutic drugs. Thus, a better understanding of the anti-apoptotic mechanisms and the development of potent and non-toxic strategies to overcome the pro-survival mechanisms in PaCa cells are of utmost importance to improve the outcome of PaCa patients.

In this research, we first showed that the expression and localization of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins in PaCa cells. Then, we used siRNA targeting to Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1 to confirm the importance of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins in PaCa cell survival. Simultaneous knock-down of Bcl-xL and Mcl-1 induced apoptosis strongly through Bax/mitochondria pathway. These results suggest that Bcl-xL and Mcl-1, which are over-expressed in PaCa may be potential therapeutic targets.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵臓癌 アポトーシス Bcl-2ファミリー蛋白 RNA干渉

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は消化器癌の中でも最も悪性度の高いものであり、手術時にすでに多くの症例で周囲臓器やリンパ節、肝臓に転移していることが多く、また根治手術を行い得たとしても化学療法や放射線療法への抵抗性から早期に再発転移することが多い。そのために膵臓の治療抵抗性メカニズムを分子生物学的に解明することが急務である。悪性腫瘍（特に血液関連の腫瘍）の治療抵抗性における Bcl-2 ファミリー蛋白質群の関与については現在世界中の研究者が注目しており、徐々にそのメカニズムが明らかになってきており注目度の非常に高い分野である。Bcl-2 ファミリー蛋白質はその構造や機能から 3 種類に分類され、これらの蛋白質は互いに連携しながらアポトーシスを制御している。このうち anti-apoptotic Bcl-2 ファミリー蛋白質(Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1)がいくつかの悪性腫瘍において過剰発現していることが報告されており、膵臓癌組織標本を用いた免疫組織染色の結果からも Bcl-xL と Mcl-1 の過剰発現が報告されている。しかしこの発現の程度と予後との関連についての報告はない。

われわれはこれまで様々なポリフェノールの抗腫瘍効果を検討してきており、その過程において Mcl-1 の抑制が膵臓癌のアポトーシス亢進メカニズムに重要な役割を果たしていることを発見した。しかしこれらのポリフェノールは Bcl-xL を抑制することができなかった。そこで Bcl-xL を RNA 干渉で抑制しポリフェノールで刺激をしたところ、非常に強いアポトーシス亢進作用が認められた。以上の結果からわれわれは Mcl-1 と Bcl-xL が協調してアポトーシスから細胞を保護しているのではないかと推測した。このことを証明するために Mcl-1 と Bcl-xL を RNA 干渉で同時に抑制したところ、膵臓癌細胞株 (Gemcitabine に強い抵抗性を示すといわれる Panc-1 においても) に非常に強力なアポトーシスを誘導することを発見した。これまでに単一の anti-apoptotic Bcl-2 ファミリー蛋白質を抑制することにより膵臓癌の化学療法・放射線療法への感受性を亢進させたとの報告は散見されるが、同時に 2 つ以上の anti-apoptotic Bcl-2 ファミリー蛋白質を抑制した際の効果を検討した報告はない。

2. 研究の目的

以上の経緯からわれわれはまず膵臓癌細胞株における Bcl-2 ファミリー蛋白質群の内在性発現レベルとそれらの蛋白質相互作用、および予後との関連を明らかにする必要があると考えた。さらに Mcl-1 と Bcl-xL の両者が膵臓癌のアポトーシス抵抗性において重要な影響を及ぼしており、この両者を同時に特異的に抑制することが膵臓癌治療法における breakthrough になるのではないかと考え、これを in vitro および in vivo の実験系で証明することを目的とした。

3. 研究の方法

・当科での膵臓手術症例の臨床検体を用いて免疫染色を行い、内因性発現を検討する。
・6種類の膵臓癌細胞株 (AsPC-1, BxPC-3, Capan-2, HPAF-II, MIA PaCa-2, Panc-1) を用いて内在性レベルの Bcl-2 ファミリー蛋白質 (Bcl-2, Bcl-xL,

Mcl-1, Bax, Bak, Bad, Bim, Bid, PUMA, Noxa) の発現程度を Western blot にて検討する。

・細胞を細胞質・ミトコンドリアに分離し、この蛋白質群の細胞内の局在について検索する。さらに免疫沈降を行い、これらの蛋白質群の相互作用を検索する。

・Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 およびこれらのコンビネーション (Bcl-2+Bcl-xL, Bcl-2+Mcl-1, Bcl-xL+Mcl-1) を RNA 干渉により抑制し、アポトーシスへの影響を検討する。アポトーシスについては Roche 社の Cell death ELISA kit を用いて検討する。さらに核の形態学的変化は Hoechst 33258 を用いた蛍光染色で検討する。)

・アポトーシス亢進の分子生物学的なメカニズムを検討する。具体的にはカスパーゼ活性、チトクローム C の細胞質への流出の有無、Bak/Bax 活性の変化、BH-3 only 蛋白質の局在・蛋白質-蛋白質の相互作用の変化につき検索する。

・ヌードマウス膵臓皮下移植モデルを作成し、Bcl-xL/Mcl-1 siRNA とアテロコラーゲン complex を腫瘍内に 1 回/週の間隔で局所注入し、その抗腫瘍効果を検討する。適宜腫瘍のサイズを計測し、4-6 週間後に腫瘍を摘出し、分子生物学的手法を用いてアポトーシスの程度・メカニズムを検討する。

4. 研究成果

・当科での手術症例の臨床検体を用いて免疫染色を行った結果、膵臓部位に Bcl-xL と Mcl-1 の強発現を認めるが、非癌部での発現は非常に弱いことが判明した。

・6種類の膵臓癌細胞株を用いて内在性レベルの Anti-apoptotic Bcl-2 family protein の発現程度を Western blot にて検討した結果、Bcl-xL と Mcl-1 はほとんどの細胞株に発現しているが Bcl-2 は 2 種類の細胞株にしか発現していないことが判明した。これらの Anti-apoptotic Bcl-2 family protein は主にミトコンドリアに局在にしていることが判明した。

・免疫沈降を行った結果、Anti-apoptotic Bcl-2 family protein が Pro-apoptotic protein である Bak や Bax、Bim などと関連があることを確認できた。

・RNA 干渉による Bcl-2 ファミリー蛋白質の抑制が膵臓癌に及ぼす影響について Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 およびこれらのコンビネーション (Bcl-2+Bcl-xL, Bcl-2+Mcl-1, Bcl-xL+Mcl-1) を RNA 干渉により抑制し、アポトーシスへの影響を検討した。その結果、Bcl-xL と Mcl-1 を knock down した際に非常に強いアポトーシス誘導効果が認められることが判明した。

・またこの効果はチトクローム C の細胞質への流出、Bax 活性化、カスパーゼカスケードによって仲介されていることが判明した。

・ヌードマウス膵臓皮下移植モデルを作成し、Bcl-xL/Mcl-1 siRNA とアテロコラーゲン complex を腫瘍内に 1 回/週の間隔で局所注入し、その抗腫瘍効果を検討した。その結果大きな副作用は認めず、両群間に生育の差は認めなかった。適宜腫瘍のサイズを計測し、6 週間後に腫瘍を摘出し腫瘍の重量を計測した結果、Bcl-xL/Mcl-1 siRNA 群で優位に腫瘍の増殖抑制効果が認められた。

・ヌードマウス膵癌皮下移植モデルにおいて、Bcl-xL/Mcl-1 siRNA 投与が腫瘍縮小効果に及ぼした影響を分子生物学的に検討した結果以下の結論が見いだされた。

- (1) アポトーシスが更新していることをタネル assay で確認した。
- (2) 膵癌細胞株と同様にカスパーゼカスケードを経由して腫瘍にアポトーシスを誘導していることを western blot で確認した。

以上の結果から Bcl-xL と Mcl-1 をターゲットとした膵癌治療戦略は当初の予想通り非常に大きな効果があると考えられ、今後臨床応用を目指して更なる検討を進める予定である。

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 9 件)

Mizoguchi K, Ishiguro H, Kimura M, Takahashi H, Sakamoto N, Tanaka T, Takeyama H. Induction of apoptosis by eicosapentaenoic Acid in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, peer reviewed, 34, 2014, 7145-50

Nagasaki T, Hara M, Shiga K, Takeyama H. Relationship between inflammation and cancer progression: review of the recent advances in interleukin-6 signaling and its blockage in cancer therapy. *Rec & Clin Invest*, peer reviewed, 1, 2014, 264-70

Shamoto T, Matsuo Y, Shibata T, Tsuboi K, Nagasaki T, Takahashi H, Funahashi H, Okada Y, Takeyama H. Zerubone inhibits angiogenesis by blocking NF- κ B activity in pancreatic cancer. *Pancreas*, peer reviewed, 43, 2014, 396-404

DOI: 10.1097/MPA.000000000000039
Takahashi H, Chen MC, Pham H, Matsuo Y, Ishiguro H, Reber HA, Takeyama H, Hines OJ, Eibl G. Simultaneous knock-down of Bcl-xL and Mcl-1 induces apoptosis through Bax activation in pancreatic cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, peer reviewed, 1833, 2013, 2980-7

DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.08.006
Shibata T, Matsuo Y, Shamoto T, Hirokawa T, Tsuboi K, Takahashi H, Ishiguro H, Kimura M, Takeyama H, Inagaki H. Girdin, a regulator of cell motility, is a potential prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, peer reviewed, 29, 2013, 2127-32

DOI: 10.3892/or.2013.2406
Tsuboi K, Matsuo Y, Shamoto T, Shibata T, Koide S, Morimoto M, Guha S, Sung B, Aggarwal BB, Takahashi H, Takeyama H. Zerubone inhibits tumor angiogenesis via NF- κ B in gastric cancer. *Oncol Rep*, peer reviewed, 2013, 31, 51-64

DOI: 10.3892/or.2013.2842

Koide S, Matsuo Y, Ochi N, Takahashi H, Funahashi H, Sato M, Okada Y, Takeyama H. HGF derived from stromal cells enhances angiogenesis in human colon cancer cell lines. *Nagoya Med J*, peer reviewed, 52, 2012, 217-32

http://ci.nii.ac.jp/vol_issue/nels/AA00750902_jp.html

社本智也、松尾洋一、竹山廣光、【臨床栄養トピックス 2012】(Part-2)臨床栄養学 EPA とレゾルピン、臨床栄養トピックス、査読無、41 巻、2012、494-8
<https://www.ishiyaku.co.jp/magazines/eiyo/EiyoBookDetail.aspx?BC=740810>

Pham H, Chen M, Takahashi H, King J, Reber HA, Hines OJ, Pandol S, Eibl G. Apigenin inhibits NNK-induced focal adhesion kinase activation in pancreatic cancer cells. *Pancreas*, peer reviewed, 41, 2012, 1306-15

DOI: 10.1097/MPA.0b013e31824d64d9

[学会発表](計 19 件)

松尾洋一、柴田孝弥、坪井 謙、社本智也、森本 守、佐藤崇文、高橋広城、石黒秀行、若杉健弘、木村昌弘、竹山廣光、第 56 回日本消化器病学会大会、2014 年 10 月 23 ~ 26 日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

松尾洋一、柴田孝弥、社本智也、坪井 謙、森本 守、佐藤崇文、高橋広城、石黒秀行、竹山廣光、膵癌ゲムシタピン耐性に関わるケモカインシグナルの役割、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25 ~ 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
社本智也、松尾洋一、溝口公士、柴田孝弥、坪井 謙、森本 守、坂本宣弘、高橋広城、木村昌弘、竹山廣光、natural product が膵癌血管新生および浸潤に及ぼす効果の検討、第 45 回日本膵臓学会大会、2014 年 7 月 11 ~ 12 日、北九州国際会議場(福岡県・北九州市)

社本智也、松尾洋一、今神 透、溝口公士、坪井 謙、柴田孝弥、森本 守、高橋広城、竹山廣光、膵癌における natural product の効果の検討、第 26 回日本肝胆膵外科学会学術集会、2014 年 6 月 11 ~ 13 日、和歌山県民文化会館(和歌山県・和歌山市)

長崎高也、原 賢康、高橋広城、佐藤幹則、竹山廣光、遠隔転移を有する大腸癌の予後と Bevacizumab 感受性に関わる因子について比較検討、第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014 年 4 月 3 ~ 5 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

社本智也、松尾洋一、長崎高也、齋藤慎一郎、溝口公士、坪井 謙、柴田孝弥、森本守、高橋広城、木村昌弘、竹山廣光、キサントフォームの膵癌血管新生抑制効果の

検討、第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014 年 4 月 3～5 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

坪井 謙、松尾洋一、社本智也、柴田孝弥、森本 守、高橋広城、若杉健弘、石黒秀行、舟橋 整、木村昌弘、竹山廣光、胃癌に対する PKD 阻害剤の可能性、第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014 年 4 月 3～5 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)
高橋広城、松尾洋一、木村昌弘、竹山廣光、植物由来ポリフェノール Baicalein の膵癌細胞株に対する抗腫瘍効果は内因性 NF B 活性に依存する、第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014 年 4 月 3～5 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

Shamoto T, Matsuo Y, Shibata T, Tsuboi K, Takahashi H, Funahashi H, Okada Y, Takeyama H. Xanthohumol inhibits angiogenesis through VEGF and IL-8 in pancreatic cancer. IAP&KPBA 2013, Sep 4-7, 2013, Sheraton Grande Walkerhill Hotel(Seoul, Korea)

松尾洋一、柴田孝弥、坪井 謙、社本智也、長崎高也、高橋広城、舟橋 整、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、膵癌血管新生シグナルにおける PTEN の役割、2013 年 7 月 11～12 日、ホテルブエナビスタ松本(長野県・松本市)

松尾洋一、柴田孝弥、坪井 謙、社本智也、長崎高也、高橋広城、舟橋 整、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、消化器癌血管新生における cytokine network の役割と HGF の関与、第 68 回日本消化器外科学会総会、2013 年 7 月 17～19 日、シーガイアコンベンションセンター(宮崎県・宮崎市)

高橋広城、坪井 謙、松尾洋一、岡田祐二、竹山廣光、Simultaneous knockdown of BclxL and Mcl1 induces pancreatic cancer apoptosis in vitro and in vivo. 第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 11～13 日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
岡田祐二、松尾洋一、林 祐一、宮井博隆、小川 了、坂本雅樹、安藤拓也、高橋広城、若杉健弘、石黒秀行、高山 悟、舟橋 整、木村昌弘、佐藤幹則、竹山廣光、膵頭十二指腸切除後の合併症、特に膵液漏の発生とその治療、2012 年 11 月 29～1 日、京王プラザ(東京都)

松尾洋一、越智靖夫、高橋広城、石黒秀行、若杉健弘、舟橋 整、木村昌弘、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、大腸癌血管新生における癌-間質相互作用の役割と HGF の関与、第 67 回日本消化器外科学会総会、2012 年 7 月 18～20 日、富山国際会議場(富山県・富山市)

坪井 謙、松尾洋一、社本智也、柴田孝弥、小出修司、高橋広城、若杉健弘、舟橋 整、木村昌弘、竹山廣光、亜熱帯性ハナショウガの成分、Zerumbone は胃癌細胞株 AGS の血管新生を抑制する、第 67 回日本消化

器外科学会総会、2012 年 7 月 18～20 日、富山国際会議場(富山県・富山市)
高橋広城、松尾洋一、石黒秀行、舟橋 整、木村昌弘、竹山廣光、植物由来ポリフェノール baicalein は EPA の抗腫瘍効果を増強する、日本外科代謝栄養学会第 49 回学術集会、2012 年 7 月 5～6 日、シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル(東京都)

高橋広城、松尾洋一、舟橋 整、岡田祐二、竹山廣光、Bcl-xL と Mcl-1 は Gemcitabine 抵抗性膵癌における治療ターゲットとなりうる、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012 年 4 月 12～14 日、幕張メッセ(千葉県・千葉市)

社本智也、松尾洋一、長崎高也、柴田孝弥、小出修司、越智靖夫、高橋広城、舟橋 整、岡田祐二、竹山廣光、膵癌細胞における zerumbone の VEGF・IL-8 分泌抑制による血管新生抑制効果の検討、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012 年 4 月 12～14 日、幕張メッセ(千葉県・千葉市)

松尾洋一、越智靖夫、小出修司、坪井 謙、社本智也、柴田孝弥、高橋広城、舟橋 整、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、Guha S、膵癌におけるサイトカインネットワークの解明と分子標的治療への応用、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012 年 4 月 12～14 日、幕張メッセ(千葉県・千葉市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 広城 (TAKAHASHI Hiroki)
名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
研究者番号: 30381792

(2) 研究分担者

松尾 洋一 (MATSUO Yoichi)
名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授
研究者番号: 40381800

原 賢康 (HARA Masayasu)
名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
研究者番号: 80528860

佐藤 幹則 (SATO Mikinori)
名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
研究者番号: 20305551