

学 位 論 文 題 名

膵癌細胞において低酸素・低グルコース下で
発現亢進する遺伝子

－ BCL 6 を中心に －

学位論文内容の要旨

【目的と背景】

生体内における腫瘍微小環境は低酸素であると同時に低栄養下にあり、低酸素・低栄養状態が血管新生の誘導などを介して腫瘍の増殖・進展に深く関与すると考えられる。低酸素に対する適応応答に重要な制御因子は転写因子 hypoxia-inducible factor (HIF-1) であり、低酸素下で HIF-1 は血管新生、解糖系、糖輸送などに関与する様々な遺伝子の発現を亢進させている。

膵癌は化学療法、放射線療法に抵抗性であり、いまだ満足できる治療成績が得られていない極めて予後不良な悪性腫瘍の一つである。低酸素環境下にある癌細胞は化学療法、放射線療法抵抗性であり、HIF-1 α の発現が高い腫瘍ほど悪性度が高く、予後不良であることが数多く報告されている。膵癌組織は、血管造影などの検査上腫瘍血管が少ないことが知られており、厳しい低酸素・低栄養状態下にあると考えられる。事実多くの膵癌細胞が HIF-1 α を恒常的に過剰発現していることが報告されている。したがって、膵癌において低酸素・低栄養環境下で誘導される遺伝子を探索することによって、生体内における低酸素・低栄養適応応答や低酸素・低栄養によって誘導される治療抵抗性において重要な働きをしている遺伝子を同定できる可能性があると考えた。

【材料と方法】

膵癌細胞株 MiaPaCa-2 を用いて、DNA マイクロアレイ法で低酸素・低栄養条件下で発現が亢進する遺伝子を探索した。得られた遺伝子の中で、BCL6 (B-cell lymphoma 6) 遺伝子に着目し、リアルタイム PCR 法およびウエスタンブロッティングにより、低酸素・低グルコース環境下における BCL6 の発現を調べた。次に siRNA 導入により BCL6 発現を抑制し、細胞増殖に対する影響をトリパンブルー染色による細胞数計測及び MTS アッセイにより検討した。また、BCL6 に対する siRNA を導入した膵癌細胞を Gemcitabine で処理し、抗癌剤感受性に対する影響を MTS アッセイにて検討した。さらに BCL6 発現における転写因子 HIF-1 の関与を調べる目的で、HIF-1 に対する siRNA を導入後の BCL6 発現量の変化をリアルタイム PCR 法及びウエスタンブロッティングにより検討した。

【結果】

1. DNA マイクロアレイ法により、低酸素・低栄養条件下で発現亢進する遺伝子として BCL6 を含め十数個同定した。2. BCL6 の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により検討し、低酸素、低グルコース条件下で発現亢進することを確認した。3. ウエスタンブロッティングにより BCL6 蛋白が低酸素条件下で発現亢進することを確認した。4. BCL6 に

対する siRNA の導入により BCL6 の発現は抑制され、BCL6 の発現抑制によって正常酸素分圧下および低酸素下における MiaPaCa-2 細胞の増殖が抑制された。5. BCL6 に対する siRNA の導入により BCL6 発現を抑制した結果、正常酸素分圧下および低酸素下において、MiaPaCa-2 細胞の Gemcitabine に対する感受性の上昇を認めた。6. HIF-1 α に対する siRNA 導入によって低酸素下での HIF-1 α の発現は抑制されたが、BCL6 の mRNA 発現と蛋白発現に影響を認めなかった。

【考察】

今回の研究では低グルコース環境を低栄養環境として、低酸素及び低栄養環境下で発現が亢進する十数個の遺伝子を同定した。同定された遺伝子の中で、BCL6 遺伝子の mRNA 発現が低酸素・低栄養環境下で亢進することが多くの細胞株で確認された。さらに蛋白レベルでも発現亢進することが確認された。BCL6 は胚中心 B 細胞に特異的に発現し、B 細胞の分化や B 細胞性悪性リンパ腫の発症に関与していることが報告されている。本研究では BCL6 が B 細胞性腫瘍ばかりでなく固形腫瘍においても発現しており、さらに低酸素・低栄養環境下ではその発現が亢進してくることを明らかにした。こうした低酸素・低栄養環境下で発現亢進してくる遺伝子産物は腫瘍の生体内生存、増殖にとって重要で必須な働きをしていると考えられ、実際 BCL6 遺伝子のノックダウンによって膵癌細胞株の増殖が抑制され、さらに抗癌剤誘導アポトーシスに感受性となることが示された。このことから BCL6 は膵癌細胞の生存、とりわけ抗癌剤などのストレス誘導アポトーシスに対する耐性機構に関与している可能性が示唆された。しかしそのメカニズムに関しては、明確な結論を得るにはいたっていない。siRNA を用いた BCL6 のノックダウンによって p21 や p27 の蛋白発現亢進が認められ、細胞周期停止に関与している可能性が示唆されたが、今後の詳細な検討が必要と思われる。

また低酸素環境にて BCL6 の発現が亢進していることから、HIF-1 による BCL6 の転写活性化の可能性について検討したが、低酸素環境下で HIF-1 の発現亢進を siRNA にて抑制しても、BCL6 mRNA 発現は抑制されなかった。この結果から、低酸素による BCL6 発現亢進は HIF-1 非依存性の機序による可能性が示唆された。

すでに膵癌細胞において、低酸素・低栄養環境下でアドレノメジュリン、VEGF、GLUT-1、GLUT-3、hexokinase 2 の発現が低酸素環境下よりも亢進していることを報告しており、これらの遺伝子発現亢進により、腫瘍細胞が低酸素・低栄養環境下でも低酸素環境下と同様に血管新生や嫌気性代謝の活性化を介して腫瘍環境に対して適応しているという仮説を提起している。本研究は、低酸素・低栄養環境下においてこうした既知の適応応答機構に加えて BCL6 を介する新しい適応応答機構が存在することをはじめて示した。

【結語】

1. 膵癌細胞株における低酸素・低栄養誘導遺伝子として BCL6 が同定され、BCL6 は膵癌における低酸素・低栄養環境に対する適応応答を担っていると考えられた。2. 低酸素・低栄養による BCL6 発現亢進は HIF-1 非依存性であることが示唆された。3. BCL6 は膵癌において増殖・抗癌剤耐性に関与しており、新たな治療の標的となりうる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 准教授 田 中 淳 司

学 位 論 文 題 名

膵癌細胞において低酸素・低グルコース下で 発現亢進する遺伝子

－ BCL 6 を中心に －

生体内における腫瘍微小環境は低酸素であると同時に低栄養下にあると考えられている。低酸素適応応答に最も重要な制御因子は転写因子 hypoxia-inducible factor (HIF-1) であり、低酸素下で血管新生、解糖系、糖輸送などに関与する様々な遺伝子の発現を亢進させている。低酸素環境下にある癌細胞は化学療法、放射線療法抵抗性であり、HIF-1 の発現が高い腫瘍ほど悪性度が高く、予後不良であることが数多く報告されている。膵癌は血流の不足から厳しい低酸素・低栄養状態下にあると考えられ、事実多くの膵癌細胞が HIF-1 α を恒常的に過剰発現している。このため膵癌において低酸素・低栄養環境下で誘導される遺伝子を探索することで、生体内における低酸素・低栄養適応応答や誘導される治療抵抗性において重要な遺伝子を同定できる可能性があると考えた。

本研究では膵癌細胞株 MiaPaCa-2 を用い、低グルコース環境を低栄養環境として検討を行った。網羅的探索の結果、十数個の低酸素・低グルコース誘導遺伝子が新たに同定された。その中で BCL6 (B-cell lymphoma 6) 遺伝子に着目し、低酸素・低グルコース環境下における BCL6 の mRNA および蛋白レベルでの発現亢進を確認した。膵癌細胞で BCL6 を抑制した結果、正常酸素分圧下および低酸素下において細胞増殖が抑制され、Gemcitabine に対する抗癌剤感受性の増加を認めた。BCL6 の発現量は HIF-1 α の抑制による影響を認めなかった。

BCL6 は胚中心 B 細胞に特異的に発現し、B 細胞の分化や B 細胞性悪性リンパ腫の発症への関与が報告されているが、本研究では BCL6 が固形腫瘍においても発現し、低酸素・低栄養環境下ではその発現が亢進していることを明らかにした。また BCL6 が膵癌細胞の増殖、抗癌剤などのストレス誘導アポトーシスに対する耐性機構に関与していることを示し、新たな治療標的となりうる可能性を示唆した。さらに低酸素・低栄養環境による BCL6 発現亢進は HIF-1 非依存性と考えられ、低酸素・低栄養環境下において BCL6 を介する新たな適応応答機構が存在することを初めて示した。

公開発表では、学位論文内容の発表の後、副査畠山鎮次教授より、膵癌における HIF-1 の発現機序、BCL6 が関与する悪性リンパ腫の発症機序および BCL6 の制御機構についての質問があった。

申請者はこれに対し、膵癌においては VHL に関する報告はなく、血流の不足により癌の中でも特に低酸素・低栄養環境にさらされることにより HIF-1 が発現していると考えられると回答した。悪性リンパ種の発症機序については、染色体転座によるプロモーター

置換により BCL6 の脱制御が起こるためと考えられていると述べた。低酸素における BCL6 の制御機構としては、プロモーター領域に転写因子 AP-1 の結合部位が報告されていることからその関与の可能性、また転写制御だけではなく unfolded protein response の関与の可能性についても言及した。畠山教授からは BCL6 と Cullin3 の関係について研究を進めてほしいとのコメントがあった。

次いで副査田中淳司准教授から BCL6 に着目した理由および膵癌組織における BCL6 の発現、染色体異常についての質問があった。また実験結果で正常酸素と低酸素下で同様の結果が得られたことの解釈についての質問があった。

申請者はこれに対し、BCL6 が血液疾患では重要な遺伝子の一つとして知られているが、固形癌における働きが未知であることから着目したと回答した。また、膵癌組織では BCL6 の発現、3q27 の遺伝子増幅が報告されているが、染色体転座の有無は不明であると回答した。正常酸素、低酸素下で同様の結果が得られたことについては、BCL6 が膵癌細胞において正常酸素でも発現し、低酸素下では発現量が増加することでその働きが増強するためと考えられると回答した。

主査浅香正博教授からは他の固形癌における BCL6 発現についての質問があった。また BCL6 の抑制方法、マウスを用いた動物実験および臨床応用についての質問があった。

申請者はこれに対し、食道癌細胞株でも同様に BCL6 発現亢進を認めたこと、組織では膵癌に加え乳癌、悪性黒色腫、膀胱移行上皮癌の報告があることを述べた。BCL6 の抑制方法については良好な結果が得られたため siRNA を用いたと回答した。動物実験については今後行う予定であり、ノックアウトマウスでは脾臓の胚中心形成が障害されること、トランスジェニックマウスでは悪性リンパ腫を発症したが、固形癌の発症に関する報告はされていないと回答した。また BCL6 を特異的ペプチドおよびアセチル化により抑制する報告がなされており、海外では悪性リンパ腫を対象とした新たな治療法としての開発が進んでいることについても言及した。

本研究は、膵癌において低酸素・低栄養環境下で HIF-1 非依存的に BCL6 を介する適応応答が存在することをはじめて示し、治療抵抗性で予後不良な膵癌において新たな治療標的となりうる可能性を示唆したものであり、今後の発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。