

## 論文の内容の要旨

論文題目 消化器癌における mitogen-activated protein kinase カスケードを介した hedgehog シグナルの活性調節機構についての検討

指導教員 小俣政男教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

瀬戸元子

### 【研究の背景と目的】

Hedgehog (HH)シグナルは、胚発生における形態形成において重要な役割を果たしている。このシグナル経路の制御の異常が様々な先天奇形や腫瘍化を引き起こす要因となり、消化器癌を含む様々な癌において、腫瘍の発生あるいは維持に HH シグナルの活性化が重要な役割を果たすという報告が近年相次いでいる。しかしながら、消化器領域での HH シグナル構成分子そのものの遺伝子異常については報告が少なく、その恒常的なシグナル活性上昇のメカニズムは不明である。

これまで消化器癌において、RAS/mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナルや phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT シグナルといった、増殖・分化・生存に重要な役割を果たしているシグナル群の異常が報告されてきた。これらのシグナル経路は epidermal growth factor (EGF)をはじめとした増殖因子によって活性化される。近年、HH シグナルが、EGF などの増殖因子によって引き起こされる他の細胞内シグナル伝達系の活性化によって影響を受けることが報告されている。また、最近 PI3K/AKT や PKC $\delta$ /MEK1 の活性化が HH シグナルの活性化に必要であるという報告もあるが、それらのシグナル伝達経路による HH シグナルの調節機構の詳細については依然はっきりしておらず、また癌における検討はなされていない。消化器領域の腫瘍においてみられる HH シグナルの恒常活性のメカニズムを解明する

ため、本研究ではこういった消化器領域での基本的な増殖シグナルの刺激が HH シグナルに与える影響について検討した。

## 【方法】

細胞は、ヒト胃癌細胞株 5 種 (AGS, MKN1, MKN45, MKN74, SH101-P4)、ヒト胎児腎細胞株 HEK 293T を用いた。ヒト胃組織検体は、胃切除手術を施行された 17 人の胃癌患者より得られた組織検体を使用した。ヒト上皮細胞成長因子 EGF リコンビナント、MEK1/2 特異的阻害剤 U0126 を使用した。ヒト GLI1、SUFU、恒常活性型 p110 $\alpha$ 、KRAS、BRAF、MEK1 の発現プラスミドを使用した。プロモーター領域に GLI binding site を組み込んだ GLI レポータープラスミド、Renilla ルシフェラーゼ レポーターを使用した。抗体は、抗 ERK1/2 抗体、抗リン酸化 ERK1/2 抗体、抗 AKT 抗体、抗リン酸化 AKT 抗体、抗 PTCH 抗体および抗 Flag 抗体を使用した。

mRNA 発現量は定量的 RT-PCR を用いて定量した。GLI 転写活性はレポーター アッセイで評価した。タンパク発現は、ウェスタンブロット、免疫組織化学で評価した。

## 【結果】

最初に EGF が HH シグナルの活性に与える影響について検討した。AGS 細胞に EGF を添加し、GLI のレポータープラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。EGF 刺激により GLI のレポーター活性は有意に上昇した。次に、EGF 刺激が HH シグナルの標的遺伝子の発現に与える影響について検討するため、AGS 細胞に EGF を添加し、GLI1、PTCH および BCL2 の発現量を定量的 RT-PCR で測定した。EGF 刺激により、GLI1、PTCH、BCL2 の mRNA 発現増加を認めた。これらの結果から胃癌細胞株 AGS への EGF 刺激により、GLI 転写活性が増強すると推察した。

EGF シグナルの下流である MAPK シグナルと PI3K-AKT シグナルの GLI 活性調節への関与について検討を重ねた。恒常活性型 KRAS、p110 $\alpha$  の発現プラスミドを AGS 細胞にトランスフェクションし、GLI レポーター活性を測定した。KRAS による刺激では GLI のレポーター活性は上昇したが、一方で p110 $\alpha$  刺激においては上昇しなかった。さらに、KRAS 刺激と同様に BRAF および MEK1 による刺激でも GLI レポーター活性は上昇し、その活性上昇は MEK1/2 阻害剤の投与により完全に解除された。この KRAS-MEK1 による GLI 活性調節は検討した 5 種全ての胃癌細胞株で観察された。これらの結果より、EGF 刺激による HH シグナルの活性化は、KRAS-MAPK カスケードを介しており、一方で PI3K-AKT シグナルは GLI の活性調節に影響を及ぼしていないと考えられた。

次に、組織検体において MAPK カスケードと HH シグナルの活性について、胃癌にて手術を施行された 17 症例より得られた手術検体を用いて、リン酸化 ERK および HH シグナルの特異的な標的分子である PTCH の免疫組織化学を行い検討した。リ

ン酸化 ERK の発現は 17 例中 3 例、PTCH の発現は 17 例中 10 例で観察された。PTCH 高発現の 5 例のうち 3 例では ERK のリン酸化が確認された。一方で、PTCH 高発現のみられない 12 例においては ERK のリン酸化は確認できなかった。

EGF-MAPK カスケードによる HH シグナルの活性調節の機序について、GLI1 の関与について検討するため、GLI1 強制発現系で実験を行った。強制発現させた GLI1 においても、GLI レポーター活性は、MEK1/2 阻害剤によって抑制され、また恒常活性型 MEK1 とのコトランスフェクションで GLI1 単独でのトランスフェクションに比べ、さらに上昇した。GLI1 タンパク発現量への影響の有無をウェスタンブロットで検討したところ、GLI1 単独と MEK1 とのコトランスフェクションで GLI1 の発現量の違いはみられなかった。これらの結果から、MEK1 は導入された GLI1 に対してもその活性増強に寄与するが、この現象は GLI1 タンパク量の調節によるものではないと推察された。

MEK1 による GLI 転写活性の調節が、GLI1 のどの領域を介しているのかについて検討を進めた。GLI1 の N 末端の deletion コンストラクトを作成し、MEK1 刺激に対する GLI レポーター活性について検討した。MEK1 刺激なしでは、GLI のレポーター活性は GLI1 の野生株と deletion コンストラクトで違いはみられなかったが、MEK1 刺激によって、deletion コンストラクトでは野生株の GLI1 に比べ活性上昇は軽微であった。このことから、GLI1 の N 末端領域が MEK1 による GLI の転写活性調節に重要であると考えられた。

GLI1 の N 末端領域には、このシグナルを負に制御する因子である SUFU の結合領域が最もよく知られている。MAPK カスケードが SUFU の機能を抑制することによって、GLI の転写活性を増強している可能性について検討した。KRAS や MEK1 を強制発現させた状態で、SUFU が GLI レポーター活性へ与える影響について解析した。KRAS と MEK1 による GLI 転写活性の上昇は SUFU によって抑制され、MAPK カスケードによる HH シグナルの活性増強は、少なくとも SUFU による GLI1 の抑制機能を阻害することによるものではないことが推察された。そこで、GLI1 の N 末端領域について ERK が直接インタラクトする可能性について検討した。インターネットサイトを利用して、GLI1 の N 末端において ERK による結合あるいはリン酸化を受ける可能性のある配列を予測し、それらの部位に変異を導入したコンストラクトを作成した。これらのコンストラクトを用い、MEK1 刺激を加え GLI レポーター活性を測定した。GLI1 の野生株と変異体のいずれにおいても、MEK1 刺激による GLI のレポーター活性の上昇に違いはみられなかった。このことから、GLI1 の N 末端領域が MAPK カスケードによる活性調節に重要であるが、GLI1 に ERK が直接結合あるいはリン酸化する可能性については示せなかった。

## 【結論】

胃癌細胞において EGF 刺激によって HH シグナルの活性が上昇した。この EGF

刺激による HH シグナルの活性上昇は RAS-RAF-MEK を介していることが明らかとなった。MAPK カスケードによる HH シグナルの活性調節には GLI1 の N 末端領域が重要であり、SUFU による GLI 活性抑制機構を介さない機序で作用していると考えられた。