

論文内容の要旨

論文題目

膵癌細胞における転写因子 NF- κ B の恒常的活性化の分子機構とそのがん悪性化での役割

氏名 仁科 隆史

膵癌は悪性度が高く、非常に予後の悪い癌である。このことから、癌悪性化に関与する機構を分子レベルで明らかにすることは、治療法創出の観点から非常に重要である。

過去の報告から膵癌細胞において、様々な細胞内シグナル伝達経路の異常が、癌悪性化を促進していることが知られており、その1つに転写因子 NF- κ B 活性化経路がある。NF- κ B は(p105/p50, p100/p52, p65, c-Rel, RelB)からなるファミリータンパク質で、ホモあるいはヘテロ二量体を形成して機能する。通常の細胞で、NF- κ B は I κ B と結合し細胞質に局在する結果、不活性化されている。しかし、細胞外から活性化シグナルにより、I κ B が IKK 複合体によってリン酸化、プロテアソームにより分解されると、NF- κ B は核移行し、標的遺伝子の発現を誘導する。NF- κ B の活性化分子機構には主に2つの経路があり、1つは古典的経路、もう1つは近年存在が明らかとなった非古典的経路がある。古典的経路は主に、p65-p50 の活性化を誘導する経路である。また、非古典的経路は、p100 の部分分解の誘導、不活性型の p100-RelB を、活性型の p52-RelB とする経路である。

通常の細胞では、様々な刺激によって NF- κ B の活性化は一過性になるよう制御されているが、膵癌細胞では恒常的に活性化している。そして膵癌細胞における NF- κ B の恒常的活性化は、血管新生、癌細胞の浸潤、化学療法耐性などの癌悪性化に関与しているといわれている。また、通常の細胞で非古典的経路により活性化される RelB を一部の膵癌細胞株において、RNA 干渉法により発現抑制すると、細胞増殖が抑制されることが報告されている。このことから膵癌細胞において、非古典的経路を介して NF- κ B が活性化されているならば、この活性化分子機構を抑制することは、非常に重要であると考えられる。しかしながら NF- κ B の非古典的経路が、膵癌細胞内で恒常的に活性化しているのか、また悪性化に寄与しているのかは明らかになっていない。

そこで本研究は、未だ明らかにされていない膵癌細胞における NF- κ B 非古典的経路の恒常的活性化の有無を検証し、その活性化の分子機構と悪性化への関与を究明することを目的とした。

膵癌細胞において NF- κ B 非古典的経路は恒常的活性化している

まず膵癌細胞において、NF- κ B 非古典的経路が恒常的に活性化しているのかを明らかにするために、膵癌細胞株8種 (QGP-1, PANC-1, PK-1, PK-45P, PK-45H, PK-59, KP-1N, KP-2) を用いるこ

とにした。非古典的経路が活性化すると、p52 の産出、p52 と RelB の核移行が細胞内で起こることから、これらを指標にすることにより、非古典的経路の恒常的活性化を明らかにすることにした。NF- κ B の局在を明らかにするために、膵癌細胞を分画し、細胞質画分と核画分とに分け、p52 の産出と p52、RelB の発現を調べた。その結果、程度に差はあるがすべての細胞株において、細胞質、核画分で p52 の発現が見られた。また、すべての細胞の核画分に RelB が局在していることがわかった。これらのことから、膵癌細胞において非古典的経路が恒常的に活性化していることが明らかとなった。またこの際、8 種の細胞株のうち PANC-1、PK-1、KP-1N において比較的 RelB、p52 が多く核に局在していることがわかった。

NF- κ B inducing kinase (NIK) の mRNA 発現量とタンパク質量は p52 と RelB の核内存在量と相関する

次に、非古典的経路の恒常的活性化分子機構を解析するために、非古典的経路の活性化に必要であると考えられている NIK に着目した。NIK は細胞外からの刺激がない状況では、ユビキチン化を受け、プロテアソームにより分解され不活化された状態になっている。しかしながら、受容体を介して細胞に刺激が入ると NIK は、ユビキチン化を受けなくなり、安定化する。そして NIK は、下流の IKK α を活性化、p100 の部分分解を誘導し、非古典的経路を活性化させると考えられている。

また、多発性骨髄腫細胞株では NIK 抑制分子群に機能欠損を誘引する遺伝子変異が起きている結果、NIK が安定化し NF- κ B の恒常的活性化が起きていることが報告されている。そして、成人 T 細胞白血病細胞においては NIK 遺伝子の過剰発現が原因で、NF- κ B の恒常的活性化が引き起こされ、悪性化に関与していることが報告されている。これらの報告から、膵癌細胞株においても、NIK の異常な活性化が、NF- κ B の恒常的な活性化、癌悪性化を促進しているのではないかと考えた。

まず、膵癌細胞内での NIK の発現を、ウェスタンブローディングにより確認した。その結果、プロテアソームを阻害する薬剤を用いて検出を行なった際、調べた全ての細胞株で発現が確認できた。また、PANC-1、PK-1、KP-1N において NIK の蓄積レベルは高かった。そして NIK 蓄積量の違いの原因を調べるために、NIK mRNA 量を調べた。その結果、他の癌細胞株と比較して、PANC-1、PK-1、KP-1N において、比較的高く NIK mRNA が発現していた。このことから NIK のタンパク質量は、NIK mRNA 量により規定されていると考えられた。そして NF- κ B の核移行を指標とした際に、NIK mRNA 量は非古典的経路の活性化と相関することが分かった。このことから、私は膵癌細胞において比較的高く NIK が発現している結果、膵癌細胞において NF- κ B の非古典的経路の恒常的活性化が誘導されているのではないかと考えた。

膵癌細胞において、NIK は NF- κ B 非古典的経路の恒常的活性化を関与している

膵癌細胞において、NIK が非古典的経路の恒常的活性化に寄与しているかを明らかにするため

に、siRNA を用いて NIK の発現を抑制し、その影響を調べた。通常の細胞では、NIK は IKK α を介して、p100 のリン酸化、p100 の部分分解を誘導し p52 とする。p52 は続いて RelB とともに核移行し、標的遺伝子の発現を誘導する。まず NIK siRNA を処理した膀胱癌細胞株 2 種を用いてウェスタンブロットングにより p100 のリン酸量を測定した。その結果、両細胞株においてコントロール群と比較して著しい p100 のリン酸化の減少がみられた。また、siRNA 処理群では、p52 の産出量も減少していることがわかった。次に、NIK siRNA 処理をした膀胱癌細胞を細胞分画し、核画分に存在する p52、RelB の量をウェスタンブロットングにより調べた。その結果、siRNA 処理依存的に p52、RelB の核への局在が減少していることが分かった。これらのことから私は、膀胱癌細胞において、NIK の発現が NF- κ B 非古典的経路の恒常的活性化に関与していることを明らかにした。

NIK の活性化は膀胱癌細胞の細胞増殖を促進する

次に癌悪性化への関与の 1 つとして、NIK が膀胱癌細胞の増殖機構に関与しているかを調べた。そのために、siRNA を用いて膀胱癌細胞株の NIK の発現抑制し、その影響を調べることにした。その際、siRNA による影響が、標的分子以外の遺伝子発現抑制による効果であることを否定するために、2 種の膀胱癌細胞株を用いて siRNA の標的塩基配列に siRNA に耐性になるようサイレント変異を加えた変異型の NIK を安定発現させた細胞株と野生型の NIK を発現させた細胞株を樹立した。そして、これらの細胞株に siRNA 処理をし、6 日後に生細胞数を計測した。その結果、空ベクターを発現させた細胞株や NIK の野生型を発現させた細胞株では、NIK の発現抑制により細胞増殖率の減少がみられたが、変異型の NIK を発現させた膀胱癌細胞株ではその影響はみられなかった。また、NIK を安定発現させている細胞では、発現させていない細胞に比べて細胞増殖率が亢進している傾向がみられた。これらの結果から、膀胱癌細胞において NIK は細胞増殖に関与していることがわかった。

まとめと考察

本研究において、膀胱癌細胞における NF- κ B の恒常的活性化分子機構に焦点をあて、NIK 発現依存的に NF- κ B 非古典的経路が恒常的活性化していることを明らかとした。

この恒常的な活性化の原因として私は、膀胱癌細胞において、NIK はタンパク質として分解されていることから、NIK 抑制分子の遺伝子変異が恒常的活性化の原因ではなく、NIK の発現量亢進が原因のひとつではないかと考えている。また、非古典的経路の活性化に重要な RelB や p100 は、膀胱癌細胞でも恒常的に活性化している NF- κ B 古典的経路や Notch カスケードの標的遺伝子であることから、NIK だけでなく RelB や p100 の発現亢進も非古典的経路の恒常的活性化の原因ではないかと考えている。

そして膀胱癌細胞において、NIK が細胞増殖機構に関与していることが分かった。このことから、NIK を介する非古典的経路の恒常的活性化が、細胞増殖を促進することによって、癌悪性化に寄与していると考えられる。しかしながら、依然として膀胱癌細胞において非古典的経路の活性化が

細胞増殖以外に、どのような悪性化に寄与しているかは不明である。このことから、膵癌細胞において、この経路の活性化分子機構と、悪性化への寄与を詳細に解析することは、新規治療法の開発が待たれる膵癌治療において重要であると考えており、今後の研究課題であると考えている。

