

論文の内容の要旨

論文題目 胃癌におけるApoptosis Signal-regulating Kinase 1の役割

指導教員 小池和彦教授

東京大学大学院医学系研究科

平成18年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 早河 翼

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路は発癌・細胞増殖などに重要な役割を果たしており、胃癌においても活性化が認められている。Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1) は生体内で様々な機能を持つMAPKKKの一つであり、消化器領域においては肝細胞障害や大腸炎などの疾患で重要であることを報告してきた。本研究では、胃癌におけるASK1の役割を検討した。

ヒト臨床検体を用いた解析の結果、健常者と比較して *Helicobacter* 陽性胃炎ではASK1の蛋白発現量が増加しており、胃癌ではさらに増加していた。発癌剤MNUを経口投与し、40週後の胃発癌を比較するマウスモデルの解析では、野生型マウスの腫瘍部でASK1の増加がみられ、ASK1ノックアウトマウスでは野生型マウスに比し腫瘍数・腫瘍サイズの減少が認められた。胃癌細胞株を用いた検討では、特異的siRNAによるASK1の阻害により細胞増殖が抑制された。細胞増殖に関連するリアルタイムPCRアレイの結果、ASK1の阻害によりサイクリンD1の発現が抑制されることが示された。ASK1をプラスミドおよびアデノウイルスベクターを用いて過剰発現する系の検討では、反対にサイクリンD1の発現は増加したが、キナーゼ能欠損型ASK1発現ベクターのトランスフェクションではASK1の発現量は増加せず、ASK1によるサイクリンD1の制御はリン酸化能依存的であると考えられた。ルシフェラーゼアッセイを用いた検討により、転写レベルでのASK1によるサイクリンD1の調節が認められた。サイクリンD1のプロモーター領域中のAP-1結合部位に変異を持つプラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイにより、これらの調節機構はAP-1サイトを介して行われていることがわかった。

次に、*H.pylori*とASK1の関連について検討を行った。胃癌細胞株を*H.pylori*で刺激すると、ASK1のリン酸化が認められ、*H.pylori*によりASK1が活性化することがわかった。ASK1特異的siRNAをトランスフェクションした細胞では、下流のc-Jun-N-terminal Kinase (JNK)のリン酸化が減弱しており、この減弱は刺激後2-6時間経過した遅延相のみで認められた。*H.pylori*に

よるアポトーシスをカスパーゼ 3 の分割で観察したところ、ASK1 のノックダウン・JNK 阻害剤投与により細胞死が抑制されたことから、ASK1-JNK 経路は *H.pylori* によるアポトーシスに関与していると考えられた。

これまで、サイクリン D1 の標的転写因子の一つである E2F のターゲットとして ASK1 が存在していることが報告されている。Epidermal Growth Factor (EGF) や *H.pylori* による刺激は ASK1 を活性化と下流の JNK の活性化を通じサイクリン D1 の発現を誘導するが、引き続き ASK1 自体の発現も増加が認められた。この ASK1 の誘導は、サイクリン D1 の特異的 siRNA をトランスフェクションした細胞では認められなかった。サイクリン D1 をプラスミドベクターにより過剰発現させた細胞では、ASK1 蛋白が増加した。恒常的活性化能を持つ変異型 ASK1 を過剰発現させた細胞では、サイクリン D1 の誘導を介して内因性 ASK1 の誘導が認められた。

ASK1 はサイクリン D1 の発現を介して癌細胞の増殖に関与しているだけでなく、auto-regulation により ASK1 自体の発現を増加させていた。また、ASK1-JNK 経路は *H.pylori* によるアポトーシスにも必要な経路であった。ASK1 は胃上皮細胞において、細胞増殖・アポトーシスを制御するきわめて重要な分子であると考えられる。