

学位論文題名

膵癌細胞株 (SUIT-2) の肝細胞増殖因子 (HGF)
による HOX 遺伝子発現の変化

学位論文内容の要旨

背景

癌の浸潤・転移を発生生物学的に考えると、細胞のもつ空間的位置情報が破綻した現象と捉えることができる。胎生期において形態情報を位置情報に変換し、形態形成プログラムを実行するマスター遺伝子に HOX 遺伝子があり、現在 39 個が同定されている。A, B, C 及び D の 4 つの遺伝子集合体 (クラスター) を形成し、それぞれ、第 7, 17, 12 及び 2 番染色体上に位置している。HOX 遺伝子は、出生後も臓器組織特異的な発現パターンがみられ、組織の再生、恒常性維持に重要な役割を演じている。癌組織及び癌細胞においても HOX 遺伝子の発現異常が指摘され、発癌や浸潤・転移との関連について報告されてきている。

一方、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor, HGF) は、培養肝細胞の増殖を促進する因子として最初に単離されたが、他の上皮系細胞においても、その受容体である Met の活性化を通して、細胞増殖、細胞分散、細胞運動や管腔形成の促進に関与し、さらには血管新生因子あるいは胎生期には器官形成のメディエーターとして働くことが知られている。癌においては、転移・浸潤促進因子として捉えられている。

HOX 遺伝子と HGF はともに形態形成過程において極めて重要な役割を演じている。これらの発現あるいは機能の異常が癌化や転移・浸潤に深く関与していることも確かである。しかし、両者の関係については不明である。本研究では、ヒト膵癌細胞株を用いて、HGF による HOX 遺伝子発現の変化とその変化を引き起す細胞内情報伝達経路について検討した。

方法と結果

1 SUIT-2 細胞における HOX 遺伝子発現と HGF 刺激による経時的変化

ヒト膵癌 SUIT-2 細胞における HOX 遺伝子 39 個の発現を定量的 RT-PCR 法で解析した。クラスター A の HOX 遺伝子では、A1, A2, A3, A9 および A13 の発現が認められた。クラスター B では、B3, B5, B6, B7, B9 および B13 遺伝子が発現しており、特に B6, B7 および B9 の発現が高かった。一方、クラスター C および D に属する HOX 遺伝子は、ほとんどが発現しておらず、C6, C8 および C9 が低レベルの発現を示した。

HGF 添加 120 時間後までの HOX 遺伝子発現の変化を 24 時間毎に検討した。血清非存在下で 24 時間培養すると、すべての HOX 遺伝子の発現が低下した。その後、HOXB3 遺伝子の発現のみが HGF 処理の時間および濃度依存的に亢進し、他の HOX 遺伝子の発現に変化は認められなかった。

2 SUIT-2 細胞の増殖能と細胞分散 (cell scattering)

Crystal violet を用いた細胞数測定法にて細胞播種後 120 時間について細胞増殖能を検討した。SUIT-2 細胞は血清非存在下でも緩やかな増殖を示した。また、HGF の有無は増殖性に関与しなかった。

HGF 刺激による細胞分散について検討した。HGF 刺激 24 時間後、細胞間の間隙が開き、細胞は分散した。一方、HGF 未処理では細胞分散は見られなかった。

3 HGF 刺激による β -カテニンと E-カドヘリンの細胞内局在の変化

HGF 刺激による HOXB3 の発現亢進に細胞間接着の解離が関与する可能性を考え、E-カドヘリンおよび β -カテニンの動態について間接蛍光抗体法にて検討した。

β -カテニン、E-カドヘリンともに HGF 未処理の状態では細胞膜に認められたが、HGF で処理すると、 β -カテニンは処理後 24 時間でほぼ半数の細胞の核内に存在し、96 時間後にはほとんどの細胞で核内移行が認められた。一方、E-カドヘリンは HGF 処理により細胞膜上から解離し、細胞質内全般への移行が認められた。

4 HGF によって転写活性化される HOXB3 遺伝子の転写制御領域の解析

転写開始点の上流のプロモーター領域 (P1) とイントロン 2 領域 (P2) をルシフェラーゼ遺伝子 (pGL3-TK) の上流に組み込んだレポータープラスミドを SUIT-2 細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイを施行した。P1 を連結したレポーターを導入した場合、HGF の濃度に依存してルシフェラーゼ活性は上昇した。一方、P2 の場合では、HGF 刺激の有無にかかわらず、ルシフェラーゼ活性の変化は認められなかった。

考察

今回、ヒト膀胱癌細胞株 SUIT-2 において HGF が HOXB3 遺伝子の発現を亢進することを見出した。これまで、BMP シグナルの抑制が HoxC13 の発現を低下させることや FGF-2 が Hoxa11 の発現を誘導することなど、形態形成に関与するいくつかの液性因子が HOX 遺伝子の発現を制御することが報告されてきた。これらの液性因子で発現の変化した HOX 遺伝子は、その下位にある標的遺伝子の発現を制御しながら、細胞の分化・成熟を進めていくと考えられる。HGF による HOXB3 遺伝子の発現亢進も、おそらく発生や再生などの過程で実行されるプログラムの一部である可能性がある。癌細胞はこのプログラムを誤った方法で実行している可能性が考えられる。

SUIT-2 細胞は繊維芽細胞との共培養や HGF 刺激によって転移・浸潤能が増強されることから、HGF 刺激は転移関連遺伝子の発現を転移促進方向に変化させていると考えられる。HOXB3 遺伝子は転写因子であるため、HGF によるその発現亢進はこの過程に介在している可能性が考えられる。現在のところ HGF 刺激を受けた SUIT-2 細胞において発現の亢進した HOXB3 遺伝子産物がどのような標的遺伝子の転写を制御しているのかについては明らかではなく、その生物学的意義についての検討は、今後の重要な課題のひとつである。

HOXB3 遺伝子発現亢進における細胞内情報伝達経路については、HGF 刺激後、活性化した Met によって E-カドヘリン・ β -カテニン複合体が解離し、E-カドヘリンを介した細胞-細胞間接着が消失し、解離した β -カテニンが核内に移行すること、HOXB3 遺伝子のプロモーター (P1) 領域には β -カテニンと Tcf (T cell factor)/Lef1 (Lymphoid enhancer binding factor1) ファミリーの転写因子との複合体が結合しうる複数のコンセンサス配列が存在すること、今回のレポーターアッセイの結果は P1 領域に HGF で誘導される HOXB3 遺伝子の転写活性化能があることから、HGF 刺激によって核内移行した β -カテニンが、Tcf/Lef1 転写因子と複合体を形成して HOXB3 のプロモーター領域に結合し、HOXB3 の転写活性化を促すものと考えられる。

結語

膀胱癌細胞株 SUIT-2 において、HGF により HOXB3 遺伝子の mRNA 発現が亢進することが明らかとなった。HGF により細胞分散がおこり、その結果として、細胞間接着に関与していた E-カドヘリンの裏打ち蛋白である β -カテニンが核内へと移行し、HOXB3 遺伝子のプロモーター領域を介して HOXB3 遺伝子発現を亢進する可能性が示唆された。

詳細なシグナル伝達機構の解析および、HOXB3 遺伝子の役割について今後検討する予定である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学 位 論 文 題 名

膵癌細胞株 (SUIT-2) の肝細胞増殖因子 (HGF) による HOX 遺伝子発現の変化

癌の浸潤・転移を細胞のもつ空間的位置情報が破綻した現象と捉えることができる。形態形成プログラムを実行するマスター遺伝子である HOX 遺伝子は、組織の再生、恒常性維持に重要な役割を演じているが、癌組織及び癌細胞においても発現異常が指摘され、発癌や浸潤・転移との関連について報告されてきている。

一方、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor, HGF) は、上皮系細胞において形態形成のメディエーターとして働くことが知られ、癌においては、転移・浸潤促進因子として捉えられている。

HGF によって転移・浸潤能が亢進する膵癌細胞において HGF による転移・浸潤能の亢進に HOX 遺伝子の発現変化が関与しているのではないかと仮説を立て、本研究では、ヒト膵癌細胞株 (SUIT-2) を用いて、HGF による HOX 遺伝子発現の変化とその変化を引き起す細胞内情報伝達経路について検討した。

ヒト膵癌 SUIT-2 細胞における HOX 遺伝子 39 個の発現を定量的 RT-PCR 法で解析した。HGF 刺激 120 時間後までの HOX 遺伝子発現の変化を検討した結果、HOXB3 遺伝子の発現のみが HGF 刺激の時間および濃度依存的に亢進することが明らかとなった。

HGF による HOXB3 遺伝子の発現亢進が刺激後 24 時間目から見られ、HGF 刺激の 24 時間後に細胞分散を示すことから、発現亢進に細胞分散が関与している可能性が考えられた。

HGF 刺激による β -カテニンと E-カドヘリンの細胞内局在の変化について間接蛍光抗体法にて検討したところ、HGF で刺激すると、 β -カテニンは刺激後 24 時間で半数以上の細胞の核内に存在し、96 時間後にはほとんどの細胞で核内移行が認められた。

HOXB3 遺伝子の転写開始点の上流のプロモーター領域 (P1) を組み込んだレポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイを施行した結果、P1 領域に HGF で誘導される HOXB3 遺伝子の転写活性化能があることが明らかとなった。

HOXB3 遺伝子のプロモーター (P1) 領域には β -カテニンと Tcf (T cell factor)/Lef1 (Lymphoid enhancer binding factor1) ファミリーの転写因子との複合体が結合しうる複数のコンセンサス配列が存在することから、HGF 刺激によって核内移行した β -カテニンが、Tcf/Lef1 転写因子と複合体を形成して HOXB3 のプロモーター領域に結合し、HOXB3 の転写活性化を促すものと考えられた。

今回、ヒト膵癌細胞株 SUIT-2 において HGF が HOXB3 遺伝子の発現を亢進することを見出した。現在のところ HGF 刺激を受けた SUIT-2 細胞において発現の亢進した HOXB3 遺

伝子産物がどのような標的遺伝子の転写を制御しているのかについては明らかではなく、その生物学的意義についての検討は、今後の重要な課題であると考えられた。

口頭発表に際し、副査の守内教授より、HOXB3 遺伝子の下流に位置する遺伝子について質問があった。申請者は、HOXB3 遺伝子が、甲状腺の発生分化に関与して thyroid transcription factor-1 (TF-1) をそのプロモーター領域を介して活性化させることなどが報告されているが、不明の点が多いと回答した。

次に副査の秋田教授より、HOXB3 遺伝子発現亢進のシグナル伝達に関して、プロモーター領域の結合部位同定について及び、HOXB3 遺伝子の機能についての解析についての今後の展望についての質問があった。申請者は、現時点では詳細なプロモーターアッセイは終了していませんが、今後、P1 領域についての詳細なルシフェラーゼアッセイやゲルシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降法を用いて結合部位を同定する必要があること、また HOXB3 遺伝子の過剰発現系を樹立すべく発現ベクターを構築しており、現在検討中であることを回答した。

最後に、主査の浅香教授より、他の膀胱癌細胞株についての検討の有無と HGF と HOXB3 遺伝子の関係についての今後の研究の展望について質問があった。申請者は、他の膀胱癌細胞株については未検討であるため、今後検討する予定であること、また、ヌードマウスを用いた *in vivo* における転移モデルにおいて、HGF の発現と HOXB3 遺伝子発現の亢進について検討する必要があることを回答した。

本研究は転写因子として様々な遺伝子の上位に位置する HOX 遺伝子群において、HOXB3 遺伝子の発現が HGF により調節されることを見だし、その転写調節機構について、細胞分散に引き続く β -カテニンの核内移行の関与を証明した点から高く評価された。

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単位所得なども併せ、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断した。