

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570124
 研究課題名（和文）肝細胞増殖因子が有する癌細胞増殖抑制作用のシグナル伝達の分子機構
 研究課題名（英文）Signaling mechanism of antiproliferative effect of HGF on carcinoma cells
 研究代表者
 田中 利明（TANAKA TOSHIAKI）
 東京工業大学・大学院理工学研究科・助教
 研究者番号：40263446

研究成果の概要：

HGF による肝癌細胞株 HepG2 の増殖抑制の鍵となる Erk の強活性化には、HGF 受容体 c-Met にアダプター因子 Grb2 と Gab1 が結合することが必要であることを明らかにした。また、HGF 刺激により転写制御因子 Id1 の発現量が減少し、それにより癌抑制因子 p16 が発現上昇することを見出した。Id1 と p16 は不可逆的細胞変化である細胞老化に係わることから、HGF 刺激が不可逆的増殖停止を誘導する可能性を検討した結果、48 時間以上の HGF 刺激により HepG2 細胞の増殖停止が不可逆的になることを見出した。この結果は、HGF 刺激により癌細胞が癌細胞でなくなることを示す重大な発見となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：肝細胞増殖因子、癌、HepG2、癌抑制因子、p16、Id1、不可逆的増殖停止

1. 研究開始当初の背景

肝細胞増殖因子(HGF)は、正常肝細胞及び一部の癌細胞株の増殖を促進する一方、他多数の癌細胞株に対しては増殖を抑制する。HGF の受容体 c-Met は共通である為、これら相反

する作用は細胞内シグナルの違いに由来すると考えられるが、その分子機構を調べた例はほとんどない。一方、c-Met 細胞内部位の変異が癌を誘導すること、また、HGF の癌細胞増殖抑制作用により癌を抑制する治験に

において HGF の細胞増殖促進作用が障害となることから、HGF/c-Met による細胞増殖制御の分子機構を明らかにすることが必要となっている。

本研究に至る研究により、HGF が有する肝癌細胞株 HepG2 に対する細胞増殖抑制作用には、HGF による Erk の強活性化が必要であることが示された。研究代表者の専門である癌抑制遺伝子と細胞周期制御の研究視点からさらに研究を進展させた結果、HGF 刺激による Erk 強活性化が癌抑制遺伝子 p16INK4a の発現量を急増させ (Erk-p16 経路)、HepG2 細胞の細胞周期を G1 期に停止させることを明らかにした。そこで、HGF による癌細胞増殖抑制の鍵となる Erk-p16 経路の分子制御の機構解明が急がれた。

2. 研究の目的

(1) HGF による癌細胞の増殖抑制においては Erk-p16 経路が鍵となることから、Erk-p16 経路における Erk 強活性化の制御機構の解明を第一の目的とした。

(2) HGF による癌細胞の増殖抑制において鍵となる Erk-p16 経路において、HGF により p16 の発現量が上昇する分子機構の解明を第二の目的とした。

(3) 近年、p16 の発現上昇は細胞老化を誘導すること、また、細胞老化が細胞の癌化を抑制する生体防御機構の 1 つであることが示された。これらの知見を元に、HGF 刺激が癌細胞に与える変化を細胞老化との関連から明らかにし、HGF による癌の増殖抑制法開発に資する情報を得ることを第三の目的とした。

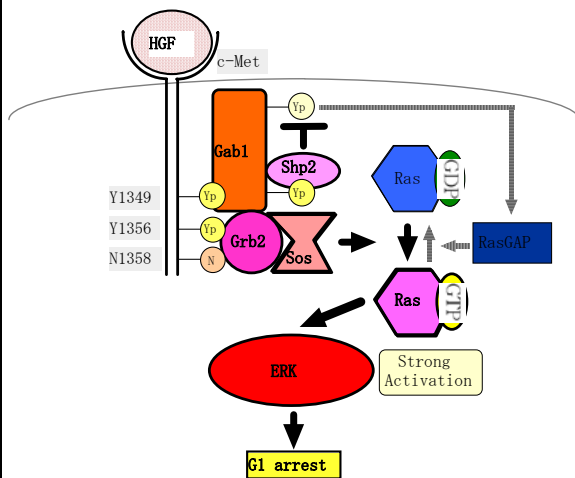
3. 研究の方法

肝癌細胞株 HepG2 をモデルとして用い、HGF による癌細胞増殖抑制において鍵となる Erk 強活性化と、Erk 強活性化による p16 発現制御の分子機構を調べた。前者に関しては、HGF 受容体 c-Met に結合するアダプター因子に着目し、HGF 刺激による蛋白質複合体形成の様子を調べた。後者に関しては、これまでに、HepG2 細胞における HGF による p16 の発現上昇には転写因子 Ets が係わる結果を得ていることから、HGF による Ets 活性の制御機構の解析を行った。さらに、近年、p16 の発現上昇は細胞老化を誘導すること、および細胞老化が細胞の癌化を抑制する生体防御機構の 1 つである証拠が蓄積されつつあることから、HGF による癌抑圧法開発への応用を目指し、HGF が細胞老化を誘導する可能性の検討を行った。HGF が細胞老化の特徴の 1 つである不可逆的増殖停止を誘導するかどうかにか

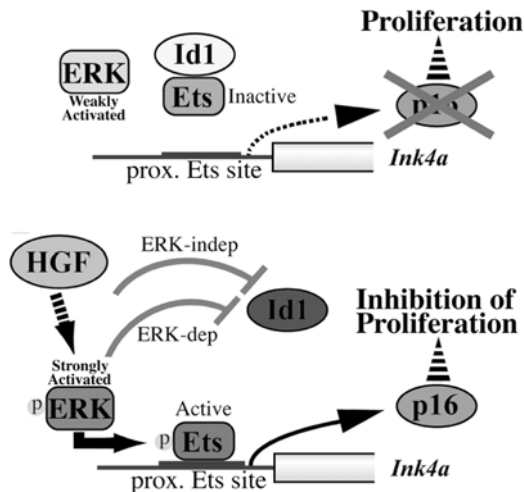
については、HGF 刺激後、経時的に HGF 除いた上で細胞増殖の様子を調べた。また、HGF により細胞老化が誘導される可能性については、細胞老化マーカーの発現の様子を調べることにより検討を行った。

4. 研究成果

(1) HGF による癌細胞増殖抑制の第一の鍵である Erk 強活性化の分子機構を調べた結果、HGF 受容体 c-Met の活性化によりアダプター因子 Grb2 と Gab1 が c-Met にリクルートされることを見出した。これら蛋白質複合体により、より強く Ras が活性化され、その結果として Erk が強活性化されることを明らかとした (下図)。



(2) HGF による癌細胞増殖抑制の鍵となる癌抑制因子 p16 の発現上昇に着目し、p16 の発現制御に直接係わる転写因子 Ets の活性調節機構の解析に取り組んだ。その結果、以下のことを新たに見出した。(i) Ets 活性を抑制する制御因子 Id1 の発現量が、HGF 刺激により mRNA 及び蛋白質レベルで急激に減少すること、(ii) Id1 蛋白質は常に ubiquitin-proteasome 系による分解を受けているが、その分解速度は HGF 刺激で変化しないこと、(iii) HGF 刺激による Id1 の減少は、細胞内シグナル因子である Erk に依存的、及び Erk に非依存的な経路により制御を受けるが、一方で、PI3K 経路による制御は受けないこと、(iv) Id1 の過剰発現は、HGF による p16 の発現上昇を抑制すること、(v) Id1 の過剰発現は、Ets により制御される p16 遺伝子プロモーターの活性を抑制すること、(vi) Id1 ノックダウンによる発現抑制は、ERK 活性と協調的に p16 遺伝子プロモーターを活性化させること。これらの結果により、HGF 刺激による Id1 の減少が、HGF による HepG2 細胞の増殖抑制において重要な役割を持つことを明らかにした。(下図)。



(3) Id1 は p16 と共に細胞老化に係わること、また、不可逆的細胞変化である細胞老化は生体における癌化の抑制機構であることから、HGF が細胞老化を誘導する可能性を検討した。その結果、HGF による HepG2 細胞の増殖停止は、一定時間の HGF 刺激後に培地から HGF を除去しても戻ることなく不可逆的であること、また、この不可逆的増殖停止に至るために必要な HGF 刺激の継続時間は 48 時間であることを明らかにした。これらの事実は、肝癌細胞株 HepG2 を HGF により 48 時間処理することで癌細胞ではなくすることが可能であるという、HGF による癌の抑圧法開発に関して重大な発見となった。

一方、各種細胞老化マーカーの発現の様子からは、HGF により細胞老化が誘導された明確な証拠は得られなかった為、HGF による HepG2 細胞の不可逆的増殖停止は細胞老化以外の現象である可能性が残された。HGF による不可逆的細胞増殖停止の分子機構解明は、HGF による癌の抑圧法の開発に直接つながる可能性が高いことからさらなる解析が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① K.Ushio, T.Hashimoto, N.Kitamura and **T. Tanaka***. Id1 is downregulated by hepatocyte growth factor via ERK-dependent and -independent signaling

pathways, leading to increased expression of p16INK4a in hepatoma cells. Mol.Cancer Res., in press. 査読有り

***Corresponding Author**

② E. Shirako, N. Hirayama, Y. Tsukada, **T. Tanaka*** and N. Kitamura*.

Up-regulation of p21^{CIP1} expression mediated by ERK-dependent and -independent pathways contributes to hepatocyte growth factor induced inhibition of HepG2 hepatoma cell proliferation. J. Cell. Biochem. 104, 176-188, 2008. 査読有り

***Shared Corresponding Author**

③ A. Kondo, N. Hirayama, Y. Sugito, M. Shono, **T. Tanaka** and N. Kitamura.

Coupling of Grb2 to Gab1 mediates hepatocyte growth factor-induced high intensity ERK signal required for inhibition of HepG2 hepatoma cell proliferation. J. Biol. Chem. 283, 1428-1436, 2008. 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

① 潮和敬、喜多村直実、**田中利明**. 肝癌細胞株 HepG2 における肝細胞増殖因子 HGF による p16^{INK4a} 発現制御の分子機構. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、2007 年 12 月 11 日. 於: パシフィコ横浜、ヨコハマグランドインターコンチネンタルホテル.

② Kazutaka Ushio, Naomi Kitamura and **Toshiaki Tanaka**. "Mechanism of HGF-induced upregulation of p16INK4a in HepG2 hepatoma cells." The Toin

International Symposium on Biomedical
Engineering 2007. 2007年11月2日. 於：
桐蔭横浜大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 利明 (TANAKA TOSHIAKI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号： 4 0 2 6 3 4 4 6

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし