

平成21年5月28日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590371
 研究課題名（和文） 膵臓癌の浸潤・転移におけるヘッジホッグシグナルの役割
 研究課題名（英文） Roles of the Hedgehog signaling in invasion and metastasis of pancreatic cancer
 研究代表者
 笠井 謙次（KASAI KENJI）
 愛知医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：70242857

研究成果の概要：

ヘッジホッグシグナル系転写因子 GLI1 は、新たに GLI1 標的遺伝子として同定した粘液基質 MUC5AC を介して膵臓癌細胞の浸潤・運動能を亢進させることを明らかにした。また癌細胞での GLI1 機能活性化には、細胞質蛋白 SCL/TAL1 Interrupting Locus (SIL) が GLI1 制御因子 Suppressor-of-Fused (SUFU) と結合しその機能を阻害することが必要であることも解明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：分子病理 膵臓癌 シグナル伝達 ヘッジホッグ 浸潤 転移

1. 研究開始当初の背景

(1) 胃癌・大腸癌などの消化管癌は早期診断・早期治療による根治が可能となっている一方、膵臓癌は依然低い生存率しか得られない難治性癌の代表である。膵臓癌の難治性の原因の一つは、病早期から浸潤・転移を起こすことである。膵臓癌発生に関わる遺伝子異常として、*K-RAS*や*P53*変異、*c-erbB2*過剰発現などが知られているが、これらの分子異常のみからでは浸潤・転移能亢進などの細胞動

態を説明できず、膵臓癌進展の分子機構が十分理解されているとは言い難い。

(2) 形態形成因子として知られる分泌型糖蛋白 Sonic hedgehog (SHH) などヘッジホッグ蛋白が膵臓癌の75%以上の症例で過剰発現していることが報告され、注目されている。しかし癌の浸潤とヘッジホッグとの関係については、ヘッジホッグ過剰発現が癌の浸潤を促進するという限定的な報告があるものの、ヘッジホッグシグナル因子群との関係など詳細な

分子生物学的・病理学的解析は未だなされてい

（3）研究代表者らは従来よりヘッジホッグシグナル伝達機構に関する分子生物学的解析を進めていた。その結果、種々の癌細胞がヘッジホッグを過剰発現し、かつヘッジホッグ依存性増殖を起こしていることを見いだしてきた

(Haruaki Nishimaki, Kenji Kasai, et al. Biochem Biophys Res Commun 2004)。

またヘッジホッグ刺激による細胞内伝達系の詳細についても解析を行ない、ヘッジホッグ刺激は7回膜貫通型蛋白 Smoothed (SMO) を介し三量体G蛋白 G12 を経て small GTPase の一つ RhoA および Rho-kinase を活性化すること、この SMO/G12/RhoA/Rho-kinase 経路活性化により、zinc-finger 転写因子の一つ GLI3 が細胞質から核に移行して種々の GLI3 標的遺伝子（例えば GLI1）を転写活性化すること、またこの SMO/G12/RhoA/Rho-kinase 経路はマウス胎児神経管での SHH 依存性運動ニューロン発生に必要であることを見いだしてきた

(Kenji Kasai, et al. Genes Cells 2004)。

（4）以上のようなヘッジホッグシグナル伝達機構の研究過程で蓄積した知見や研究資材を用いて、研究代表者らは膵臓癌の浸潤・転移におけるヘッジホッグシグナル因子群の役割について解析を開始し得る状況にあった。

2. 研究の目的

膵臓癌の浸潤・転移における、ヘッジホッグシグナル因子群、特に GLI1 の機能活性化機構と、GLI1 および GLI1 標的遺伝子の浸潤・運動能、転移能への関与を分子細胞学および病理組織学的に解明しようとするものである。

3. 研究の方法

（1）GLI1 標的遺伝子に関する分子細胞学的解析：公的細胞バンクより入手した多数のヒト膵臓癌細胞株を用いて、ヘッジホッグシグナル因子群の発現状況とこれら癌細胞株のマトリゲルでの浸潤能、wound healing assay による運動能及びマウス移植系での転移能との関係を比較検討した。解析した細胞株の一つ KP1N 細胞株を基に、GLI1 DNA 結合領域 (zinc-finger domain) と estrogen receptor (ER) の癒合遺伝子 (GLI1ER)

を安定導入し estrogen 刺激により GLI1 標的遺伝子を転写活性化し得る安定細胞株 KP1NGLIER を作成した。この細胞株を用いて、estrogen 刺激後早期（3時間後）から転写活性化する遺伝子群を cDNA microarray により網羅的に検索し、さらにそのうち GLI1 および GLI2 の siRNA 導入により発現抑制されるものを GLI1 標的遺伝子としてリストアップした。また tetracyclin 依存性に GLI1 を過剰発現する安定細胞株 KP1NtetGLI1 を別途作成し、GLI1 過剰発現による浸潤・運動能を解析するとともに、上記 GLI1 標的遺伝子に対する siRNA を併用することで GLI1 依存性浸潤・運動能亢進が、GLI1 標的遺伝子活性化に依存しているかを検討した。さらに GLI1 過剰発現により、MMP など癌浸潤に関与するマトリックスプロテアーゼが発現亢進するかについて解析した。

（2）SIL 機能に関する分子生物学的解析解析：細胞質蛋白 SCL/TAL1

Interrupting Locus (SIL) の発現遺伝子ベクターを作成し、GLI 制御因子 Suppressor-of-Fused (SUFU) との免疫沈降実験、発現細胞での細胞内局在解析、siRNA を用いた遺伝子解析などを行ない、GLI1 が SIL 過剰発現により SUFU 依存性制御から離脱する分子機構を解析した。

（3）病理組織学的解析：ヘッジホッグシグナル因子および GLI1 標的遺伝子産物に対する市販抗体および研究代表者が作成したウサギ抗 SIL 抗体を用いてヒト担癌膵臓組織の免疫組織学的解析を行ない、膵臓癌の発生・浸潤転移とこれらヘッジホッグシグナル因子などとの関係を病理組織学的に検討した。

4. 研究成果

ヘッジホッグ刺激による細胞動態の変化は、膜貫通型蛋白 SMO を介する三量体G蛋白経路活性化を経て、GLI1 による標的遺伝子活性化によりもたらされると考えられていた。しかし正常細胞のみならず、癌細胞においても GLI 制御因子である SUFU が発現しており、そのため効果的な GLI1 機能活性化には GLI1 が SUFU 依存性制御から離脱する必要があると予想されていたが、その分子機序は不明であった。

（1）本研究において、ヒト膵臓癌細胞株の浸潤・運動能と GLI1 mRNA・蛋白の発現量とは必ずしも相関しないことが

判明した。そこで研究代表者らは、膵臓癌などGLI1機能が活性化している癌細胞ではSUFU機能を抑制する因子が存在すると想定し解析を進めた結果、細胞質蛋白SILが癌細胞で発現上昇していること、培養細胞による過剰発現実験ではSILがSUFUと結合すること、SIL-SUFU結合は変異型K-RASシグナルにより増強されること、SIL過剰発現によりGLI1がSUFU結合から離脱し、核移行と標的遺伝子転写活性化能を獲得することを明らかにした (Kenji Kasai, et al. *Cancer Res* 68:7723-7729(2008))。

また膵臓癌前癌状態であるPancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) の初期病変 (PanIN-1A) からSILが発現上昇していることを明らかにした。

これらの成果は、三量体G蛋白シグナルを経てGLI1に至るヘッジホッグシグナル伝達は、K-RASシグナルやSIL・SUFUなど多くの因子により複雑に制御されていること、膵臓癌の発生や浸潤・転移などに対するSHH-GLI1の役割を解析するには、単純にこれらSHHおよびヘッジホッグシグナル因子の発現量のみを比較するのでは不十分であることを示唆している。

(2) 膵臓癌の浸潤・転移能をGLI1の機能亢進という観点から再度検証するため、収集したヒト膵臓癌細胞株のなかで中等度の浸潤・運動能を示す細胞株KP1Nを基にtetracyclinおよびestrogen依存性にそれぞれGLI1およびGLI1標的遺伝子を過剰発現させる細胞株

(KP1NtetGLI1およびKP1NGLIER) を作成した。その理由はSIL-SUFUなど内在性調節機構を越える量のGLI1蛋白を過剰発現させることによりGLI1機能を顕在化させ浸潤・転移への関与を明らかにするためである。

作成した細胞株の一つ KP1NGLIERを用いたcDNA microarrayによる網羅的遺伝子検索から、GLI1により転写活性化される遺伝子として種々のbHLH型転写抑制因子の他に、gel-forming mucinの一つ MUC5ACを見いだした。GLI1およびGLI2のsiRNAによりKP1N (内在性GLI1陽性) での内在性MUC5AC発現が抑制されること、MUC5AC遺伝子の転写調節領域にGLI結合配列が存在することなどから、MUC5ACが新規GLI1標的遺伝子であることが明らかとなった。ヒト担癌膵臓組織を用いた免疫組織染色でも、GLI1発現亢

進が起こるPanIN段階からMUC5ACの発現が亢進しており、MUC5ACがGLI1標的遺伝子であることが病理組織学的にも確認できた。

(3) 細胞株 KP1NtetGLI1において、GLI1発現誘導により亢進したマトリゲル浸潤能やwound healing assayによる細胞移動能は、MUC5ACに対するsiRNA導入により有意に減弱した。一方GLI1依存性にMMP7・MMP9発現も軽度増加した。しかしMUC5AC siRNAによるこれらMMP発現の減弱は明らかではなかった。この結果は転写因子GLI1による細胞外環境(粘液基質)の変化(inside-out)が、さらに細胞内環境を変化させ(outside-in)、浸潤・運動能を亢進させていることを示している。現在GLI1により発現増加した細胞外MUC5AC蛋白が、E-cadherinのhomophilic interactionを阻害する可能性について検討を進めている。

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 Kenji Kasai, Shingo Inaguma, Akiko Yoneyama, Kazuhiro Yoshikawa, Hiroshi Ikeda: “SCL/TAL1 Interrupting Locus derepresses GLI1 from the negative control of Suppressor-of-Fused in pancreatic cancer cell” *Cancer Research* 68:7723-7729 (2008) (査読有)

② Akiko Ohno-Jinno, Zenzo Isogai, Masahiko Yoneda, Kenji Kasai, Osamu Miyaishi, Yoko Inoue, Takuya Kataoka, Jing-Song Zhao, Huili Li, Masayuki Takeyama, Douglas R. Keene, Lynn Y. Sakai, Koji Kimata, Masayoshi Iwaki, Masahiro Zako: “Versican and Fibrillin-1 form a major Hyaluronan-binding complex in the ciliary body” *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49:2870-2877 (2008) (査読有)

③ Miwako Kado, Jong-Kook Lee, Kyoko Hidaka, Keiko Miwa, Toyooki Murohara, Kenji Kasai, Shinsuke Saga, Takayuki Morisaki, Yuichi Ueda, Itsuo Koodama: “Paracrine factors of vascular endothelial cells facilitate cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377:413-418 (2008) (査読有)

[学会発表] (計4件)

① 笠井謙次、稲熊真悟、米山亜紀子、池田洋：「膵臓癌における Hedgehog シグナル系転写因子 GLI1 の SUFU 依存性制御からの離脱機構」第97回日本病理学会総会（2008年5月17日）金沢市

② 稲熊真悟、笠井謙次、米山亜紀子、池田洋：「膵前癌病変における Shh-GLI1 標的遺伝子 MUC5AC の発現解析」第97回日本病理学会総会（2008年5月17日）金沢市

③ 笠井謙次、稲熊真悟、池田洋：「SILによる GLI1 の SUFU 依存性制御からの離脱機構」第67回日本癌学会学術総会（2008年10月29日）名古屋市

④ 稲熊真悟、笠井謙次、池田洋：「がん細胞において転写因子 GLI1 は bHLH 型転写抑制因子 DEC2、HES1 の発現を直接誘導する」第67回日本癌学会学術総会（2008年10月29日）名古屋市

[その他]

新聞報道 (計2件)

① 中日新聞「研究室発：がん細胞の因子解明へ」（2008年5月27日朝刊）（笠井謙次紹介記事）

② 中日新聞「難治性癌治療に期待、細胞増殖の仕組み解明、愛知医大グループ」（2008年10月28日夕刊）（笠井謙次研究成果報道）

ホームページ

<http://www.aichi-med-u.ac.jp/univ/medic/lecture2/10.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠井 謙次 (KASAI KENJI)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70242857

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

池田 洋 (IKEDA HIROSHI)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：00131219

稲熊 真悟 (INAGUMA SHINGO)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：80410786