

平成 22 年 05 月 20 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790304

研究課題名（和文）

LKB1 欠失による肝癌発症の分子機序の解析

研究課題名（英文）

The mechanisms of hepatocarcinogenesis by loss of LKB1

研究代表者

出口 敦子 (DEGUCHI ATSUKO)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：10422932

研究成果の概要（和文）：

セリン・スレオニンキナーゼをコードする *LKB1* 遺伝子は Peutz-Jeghers 症候群 (PJS) の原因遺伝子として同定されたが、散発性の癌においても、*LKB1* 遺伝子の変異が報告されていることから、癌抑制遺伝子であることが強く示唆されている。*Lkb1* 遺伝子ノックアウトマウスは 50 週齢以降、肝細胞癌 (HCC) を発症する。本研究では、LKB1 欠失による c-Jun の発現の上昇が肝癌発症に関与する可能性を示唆した。さらに、LKB1 の新たな癌抑制機能として、細胞運動性、細胞増殖に重要な役割を果たすことが知られている PAK1 シグナル伝達経路を LKB1 が抑制していることを示した。

研究成果の概要（英文）：

The serine/threonine protein kinase *LKB1* is a tumor suppressor gene mutated in the Peutz-Jeghers syndrome patients. The mutations are found also in several types of sporadic cancer. We have previously shown that the heterozygous *Lkb1* mutations in mice cause gastrointestinal hamartomas after 20 weeks of age, and hepatocellular carcinomas (HCC) after 50 weeks. However, the mechanisms of hepatocarcinogenesis by LKB1 loss have not been elucidated. In this study, we found that expression of c-Jun was increased by LKB1 loss. In addition, we investigated the effect of LKB1 on cell motility whose acquisition occurs in early metastasis. We found that knockdown of LKB1 enhanced cell migration and PAK1 activity in human colon cancer HCT116 cells. Furthermore, we found that PAK1 was activated in the hepatocellular carcinomas and the precancerous liver lesions of *Lkb1* (+/-) mice. Taken together, these results suggest that PAK1 is a direct downstream target of LKB1 and plays an essential role in LKB1-induced suppression of cell migration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1800000	540000	2340000
2009年度	1500000	450000	1950000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	990000	4290000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍、肝細胞癌、シグナル伝達、LKB1、キナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

セリン・スレオニンキナーゼをコードする *LKB1* 遺伝子は、Peutz-Jeghers 症候群 (PJS) 患者の約 80% 以上で変異が認められる癌抑制遺伝子である。PJS は胃腸管の過誤腫性ポリープと粘膜の色素沈着を主徴とする常染色体優性の遺伝性疾患で、それ以外の臓器にも高率に癌を発生する。また近年までに、PJS 以外の散発性の癌、大腸癌、膵癌、肺癌などにも、*LKB1* 遺伝子の不活性化 (変異) が報告されている。我々は、これまでに *Lkb1* 遺伝子ノックアウトマウスを作出し、*Lkb1*+/-マウスが PJS と同様に胃腸管に過誤腫性腫瘍を発生することを報告した (Miyoshi, H., *et al.*, *Cancer Res.* **62**: 2261-2266, 2002)。50 週齢以上の *Lkb1*+/-マウスには、さらに肝細胞癌 (HCC) が発生した (Nakau, M., *et al.*, *Cancer Res.* **62**: 4549-4553, 2002)。発生した全ての HCC と前癌病変において *Lkb1* 遺伝子の LOH (loss of heterozygosity) が見られた。LKB1 の既知の機能として、現在までに、細胞株を用いた実験により LKB1 の基質として少なくとも 14 種類のタンパクキナーゼが同定されている。その中で最も解析の進んでいる AMP キナーゼ (AMPK) は、LKB1 により活性化され、細胞増殖を促進する mTOR 経路を抑制することが示されている。また、LKB1 がアクチンフィラメントの重合を制御していることや、LKB1 が MARK2 のリン酸化を介して、微小管の重合を抑制することにより、細胞極性を制御することが示唆されている (Kojima, Y., *et al.*, *J Biol. Chem.* **282**: 23532-23540, 2007)。さらに、肝臓特異的に LKB1 を欠失するマウスは高血糖を示し、糖新生および脂質合成の酵素をコードする遺伝子の発現が増加していることが示されている。一方で、LKB1 欠失による発癌の機序はわかっていない。

## 2. 研究の目的

*Lkb1*+/-マウスは単一の遺伝子欠失によって高率に肝細胞癌 (HCC) を発症する数少ないモデル動物である。このマウスでは、正常肝細胞から前癌病変、そして HCC へと癌化が進行すると考えられている。しかしながら肝癌発症の分子機序はわかっていない。予備実験により、我々は肝癌の発生を促進することが示

唆されている *c-Jun* の発現が、*Lkb1*+/-マウスの前癌病変と HCC において著しく増加していることを見出している。また、*Lkb1*+/-マウスの肝臓正常部と HCC を比較したマイクロアレイ解析を行い、HCC では未分化細胞マーカーである Prominin-1 の発現が顕著に上昇していることを見出した。この結果から、LKB1 欠失は *c-Jun* の発現上昇に加えて、未分化細胞を出現させることにより肝癌発症を促進している可能性が考えられた。そこで本研究では、*Lkb1*+/-マウスにおける肝癌発症の分子機序の解明を最終目標として、以下の解析を行うこととする。まず、LKB1 欠失による *c-Jun* の発現上昇と細胞増殖促進の機序をヒト肝細胞癌 HepG2 細胞と siRNA を用いて解析を行う。また、LKB1 欠失により出現する未分化細胞の同定と肝癌におけるその役割について検証する。さらに、*LKB1* 遺伝子の癌抑制遺伝子の機能として、LKB1 の新規リン酸化標的因子を同定し、細胞増殖、運動性に対する効果を解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) LKB1 欠失により生じる *c-Jun* の発現上昇の機序解析

これまでの実験により *Lkb1*+/-マウスの前癌病変と HCC で *c-Jun* の発現が上昇していることを見出している。*c-Jun* は肝癌発症において、細胞の生存、アポトーシス制御などにおいて重要な役割を担うことが報告されている。ヒト肝細胞癌 HepG2 細胞を用いて、*c-Jun* の発現に対する LKB1 欠損の影響を調べる。このとき、siRNA により恒常的に内在性 LKB1 を低下した HepG2 細胞や、野生型または不活性化型 LKB1 を人為的に発現した細胞を使用する。また、*c-Jun* と相互作用のある GSK3 $\beta$  の活性化状態をウエスタンブロッティングにより検討する。さらに、*Lkb1*+/-マウスの肝臓正常部、前癌病変部、HCC においても同様に、GSK3 $\beta$  の活性化状態を検討する。

### (2) LKB1 欠失により出現する未分化細胞の解析

これまでに、*Lkb1*+/-マウスの肝臓正常部と HCC から抽出した mRNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、LKB1 が欠損した HCC では未分化細胞マーカーである

Prominin-1 の発現が著しく増加していることを見出した。この結果は、さらにウエスタンブロッティング法と免疫染色法によっても確認している。これらの結果は、LKB1 が肝細胞の分化を制御する可能性を示唆している。Prominin-1 陽性の肝細胞を、NOD/SCID マウスに移植し、腫瘍のサイズ、病理像を検証し、Prominin-1 陽性細胞の癌幹細胞としての機能を明らかにする。

### (3) LKB1 による PAK1 シグナル伝達経路の抑制

*Lkb1*<sup>+/-</sup>マウスで発症する前癌病変、悪性化した肝細胞癌では、正常肝臓で認められる索状構造が失われていることから、LKB1 は細胞極性、細胞骨格、細胞の運動性に何らかの役割を持つ可能性が示唆されている。まず、内在的に LKB1 を発現しているヒト大腸がん細胞株 HCT116 細胞に LKB1 に対する特異的 siRNA を発現させ、細胞運動性に与える LKB1 の影響を調べる。次に細胞運動に関わるシグナル伝達分子 (PAK1) に対する LKB1 影響を LKB1 に対する siRNA や LKB1 発現ベクターを用いて解析を行う。また、LKB1 による PAK1 の活性化状態を *in vitro* キナーゼアッセイにより検証する。LKB1 による PAK1 活性抑制の機序に直接的なリン酸化が介しているかを検討する。さらに、*in vivo*での PAK1 の活性化状態を *Lkb1*<sup>+/-</sup>マウスの前癌病変、悪性化した肝細胞癌と正常部から調製した細胞可溶化液を用いたウエスタンブロッティング法により検証する。

## 4. 研究成果

### (1) LKB1 欠失により生じる c-Jun の発現上昇の機序

ヒト肝細胞癌 HepG2 細胞に LKB1 に対する特異的 siRNA を用いて c-Jun の発現に対する影響を検討した。その結果、LKB1 をノックダウンした細胞では、c-Jun の発現量が上昇していることがわかった。近年、GSK3 $\beta$  がリン酸化により c-Jun のタンパク質の安定性をプロテアソーム・ユビキチン系 (Fbw7) 依存的に制御していることが報告されている (Wei, W. *et al.*, *Cancer Cell* 8: 25-33, 2005)。LKB1 をノックダウンした HepG2 細胞において、GSK3 $\beta$  の活性化状態をウエスタンブロッティング法により解析すると、GSK3 $\beta$  のリン酸化が LKB1 ノックダウン細胞で上昇していた。このことから、LKB1 のノックダウンは、GSK3 $\beta$  の活性を抑制することが示唆された。さらに、*Lkb1*<sup>-/-</sup>繊維芽細胞を用いた実験で、野生型 LKB1 をこの細胞に人為的に誘導させると GSK3 $\beta$  のリン酸化が低下することが確認された。この結果より、LKB1 が GSK3 $\beta$  の活性を制御し、その結果 c-Jun タンパク質を安

定化させることにより、転写非依存的に c-Jun の発現を抑制していることが示唆された。

### (2) LKB1 欠失により出現する未分化細胞の解析

Prominin-1 陽性は肝臓において未分化細胞マーカーであることが示唆されている。*Lkb1*<sup>+/-</sup>マウスの前癌病変は Prominin-1 の発現対し、強陽性であることから、免疫不全マウス (NOD/SCID) に前癌病変を移植したところ、前癌病変でも移植可能であることがわかった。また移植病変部の組織像を HE 染色により観察すると、前癌病変の特徴を保っていることが確認された。この結果から、LKB1 欠失は c-Jun の発現上昇に加えて、未分化細胞を出現させることにより肝癌発症を促進している可能性が考えられた。

### (3) LKB1 による PAK1 シグナル伝達経路の抑制

*Lkb1*<sup>+/-</sup>マウスで発症する前癌病変、悪性化した肝細胞癌では、正常肝臓で認められる索状構造が失われていることが確認されている。また、*Lkb1*<sup>+/-</sup>マウスの肝細胞癌は肺に転移することから、LKB1 は細胞極性、細胞骨格、細胞の運動性に何らかの役割を持つ可能性が示唆されている。まず、ヒト大腸癌 HCT116 細胞に対し、LKB1 に対する特異的 siRNA を発現させ、細胞運動性に与える LKB1 の影響を調べた。LKB1 をノックダウンすると細胞運動性が上昇し (図 1)、PAK1 活性が亢進していることを見出した (図 2)。

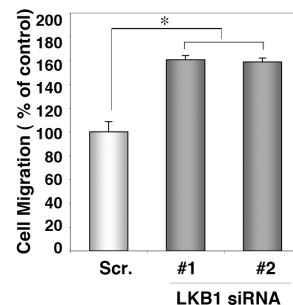


図 1 LKB1 のノックダウンによる細胞運動性の上昇

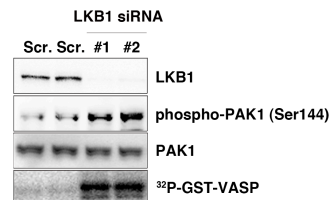


図 2 LKB1 のノックダウンによる PAK1 活性の上昇

次に、運動性の上昇が PAK1 活性の上昇によるものであるのかを調べるため、不活性型 PAK1 (PAK1-K299R) を LKB1 ノックダウン HCT116 細胞に発現すると、細胞運動性の上昇は解除された。一方、LKB1 欠損 MEF 細胞にア

デノウイルスを用いて、LKB1 を発現するとPAK1 の活性を顕著に阻害し、同時に運動性の抑制も認められた。この LKB1 による運動性の抑制は活性型 PAK1 (PAK1-T423E) の発現により解除された (図 3)。

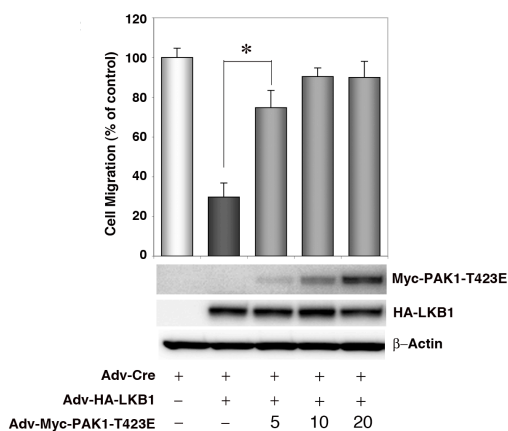


図 3 LKB1 は PAK1 依存性の細胞運動性を抑制する

これらの結果により、LKB1 が PAK1 依存の細胞運動性を抑制することが示唆された。また、LKB1 が PAK1 の活性を抑制するためには LKB1 の酵素活性が必要であることが示唆された (図 4)。

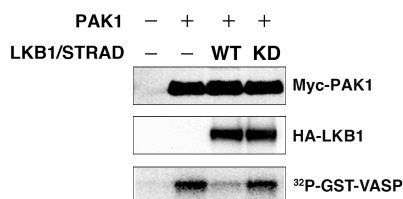


図 4 LKB1 は PAK1 活性化を抑制する

次に、LKB1 が PAK1 を直接リン酸化するかを PAK1 のリコンビナントタンパク質を基質として解析した結果、LKB1 が *in vitro* で PAK1 の Thr109 残基をリン酸化することがわかった。Thr109 残基のリン酸化修飾による PAK1 の活性を HEK293T に野生型、恒常活性型、不活性型、このリン酸化を模した PAK1-T109E 変異体、さらにリン酸化耐性変異体 (PAK1-T109A) をそれぞれ発現させることにより検証した。その結果、このリン酸化を模した PAK1-T109E 変異体は野生型 PAK1 と比較して顕著に活性が低いことがわかった (図 5)。

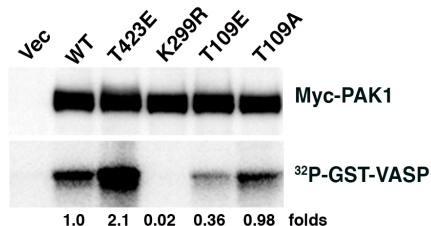


図 5 Thr109 のリン酸化による PAK1 活性の抑制

一方、リン酸化耐性の PAK1-T109A 変異体は LKB1 による抑制を受けなかったことから、LKB1 による PAK1 を抑制するためには、Thr109 残基のリン酸化が不可欠であることが示唆された。さらに、LKB1 による PAK1 活性化の阻害が *in vivo* で確認できるかを *Lkb1*<sup>+/-</sup> マウス肝細胞癌と正常部肝臓で PAK1 の活性型 (リン酸化型) をウエスタンブロッティング法により解析した結果、*Lkb1*<sup>+/-</sup> マウス肝臓では正常肝臓部と比較して、PAK1 が活性化していることがわかった (図 6)。

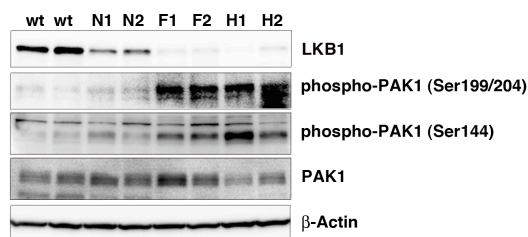


図 6 *Lkb1*<sup>+/-</sup> マウス肝細胞癌の PAK1 の活性化

本研究により、我々は、がん抑制遺伝子 LKB1 の新規標的因子として PAK1 を同定し、また、LKB1 が PAK1 シグナル伝達経路を抑制し、細胞増殖や運動性を制御していることを示唆した。この結果は LKB1 が癌転移を抑制する分子機序の一つである可能性がある。

## 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 Atsuko Deguchi, Hiroyuki Miyoshi, Yasushi Kojima, Katsuya Okawa, Masahiro Aoki, and Makoto M. Taketo. LKB1 suppresses p21-activated kinase-1 (PAK1) by phosphorylating at Thr109 in the p21-binding domain. *J. Biol. Chem.* *in press*. 査読あり
- ② Hiroyuki Miyoshi, Atsuko Deguchi, Yasushi Kojima, Masayuki Nakau, Masahiro Aoki and Makoto M. Taketo. Hepatocellular carcinoma development by conditional b-catenin activation in *Lkb1* (+/-) mice. *Cancer Sci.* **100**, 2046-2053, 2009 年 査読あり
- ③ Cen B, Deguchi A, and Weinstein IB. Activation of protein kinase G increases the expression of p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> and histidine triad protein through Sp1. *Cancer Res* **68**, 5355-5362, 2008 年 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

- ① Deguchi A, Miyoshi H, Kojima Y, Taketo MM. Gene expression profiles of hepatocellular carcinoma in *Lkb1* (+/-) mice. *COE International Symposium 2007* (Kyoto, Japan), June 2007.
- ② Deguchi A, Miyoshi H, Kojima Y, Taketo MM. Gene expression profiles of hepatocellular carcinoma in *Lkb1* (+/-) mice. *21st Century COE Colloquium Animal models for Cancer Research* (Kyoto, Japan), October 2006.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

出口 敦子 (DEGUCHI ATSUKO)

京都大学大学院・医学研究科・研究員

研究者番号：10422932