

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月20日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790353

研究課題名（和文） 膵癌における fascin 異常発現と RAS 信号伝達経路の関連

研究課題名（英文） The relationship between fascin-overexpression and RAS signaling pathway in pancreatic cancer

研究代表者

山口 浩（YAMAGUCHI HIROSHI）

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：20510697

研究成果の概要（和文）: Fascin の過剰発現を示す膵癌細胞株において RAS 信号伝達経路を抑制すると fascin の発現が減弱した。Fascin のプロモーター活性の解析でも同様の所見がみられ、膵癌における fascin の過剰発現は RAS 信号伝達経路活性化によるものであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）: Inhibition of RAS signaling pathway induced the fascin down-regulation in the pancreatic cancer cell-lines which normally showed fascin-overexpression. The similar results were revealed in promoter activity assay. These results indicate that fascin-overexpression in the pancreatic cancer is caused by an activated RAS signaling pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：fascin, 膵癌, RAS 信号伝達経路

1. 研究開始当初の背景

Fascin とは、細胞運動能の増大に関与する蛋白で、正常組織では線維芽細胞や血管内皮細胞などの間葉系細胞に発現しているが、上皮での発現はみられない。近年、様々な癌腫の fascin の異常発現、さらにはその生物学的悪性度との相関が相次いで報告されている。しかし、fascin が発現異常を起こすメカニズムについての研究はこれまでほとんどなされていない。各種癌における fascin の発現態

度の相違からは、その発現メカニズムには臓器(もしくは腫瘍)特異性があるのではないかと考えられているが、詳細は全く不明である。癌領域における fascin 研究の意義は、(1)Malignant potential の高い腫瘍の marker となる可能性がある、(2)新しい分子治療標的となる可能性がある、という2点に集約される。前者は fascin が各種癌で高発現していることから容易に想像される。後者に関しては、in vitro の実験で fascin の

knockdown により腫瘍細胞の浸潤能が低下したという報告に続き, in vivo での腫瘍転移能も有意に抑制されたという報告が近年相次いでなされ, 本蛋白が分子標的治療のターゲットとなり得る期待を大きく抱かせる.

Fascin は通常型膵癌では, (i)90%以上に発現, (ii)PanIN と呼ばれる上皮内病変の段階ですでに発現という, 他臓器の癌にみられない特徴を有す. すなわち, carcinogenesis の非常に初期の段階で異常発現が始まり, 浸潤能を得た段階ではほぼ全例に発現がみられるという特徴である. 申請者らは, 膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)での fascin 発現でも同様の特徴がみられることを明らかにしている(Yamaguchi H et al. Mod Pathol 20, 552-61, 2007).

この fascin の発現態度は, 膵癌で極めて高頻度に起きている RAS の変異と, 異常が出現する段階・頻度等が極めて類似している. 申請者は前述の論文で, IPMN において mRNA レベルでも fascin の異常発現が起きていることを示し, 転写促進が fascin の異常発現へとつながる可能性を指摘した. 一方, 別の論文で, intraductal tubulopapillary neoplasm と名付けた特種な膵腫瘍では, 膵管上皮性腫瘍としては非常に奇異なことに, RAS の変異, fascin の発現ともみられないことも報告した(Yamaguchi H et al. Am J Surg Pathol 33, 1164-72, 2009). これらの事象から, 膵癌における fascin の異常発現は RAS 変異と関連した転写亢進が関与している可能性が高いと考えられる.

2. 研究の目的

膵癌における Fascin 異常発現と RAS 信号伝達経路と Fascin 発現との関連性を明らかにする.

3. 研究の方法

(1) RAS-MAPK 経路の抑制により fascin 発現が低下するかどうかの検証

正常膵管上皮初代培養株に比し, fascin の転写が非常に亢進していることを確認された PCI-35, MIA PaCa-2 において, MAPK 抑制剤である U0126 処理を行った後, RNA, 蛋白を抽出した. Real time RT-PCR 法を用いて fascin の転写が抑制されているかどうかを検証した.

(2) RAS-MAPK 経路の活性化により fascin 発現が惹起されるかどうかの検証

RAS の変異がない対照細胞株 HEK293 に対し, MAPKK 遺伝子を transfection し RAS-MAPK 経路を活性化させた. さらには MAPK の主要なエフェクター分子である

ERK を非活性化させる DUSP6 遺伝子の導入し, fascin 発現の動向を検証した.

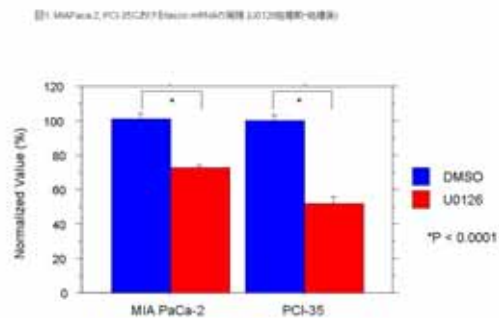
(3) RAS-MAPK 経路のシグナルにより fascin の promoter が活性化されるかどうかの検証

Fascin の promoter 領域の cloning を行い, これをルシフェラーゼが導入されたレポーターベクター(pGL3)に挿入した. 同ベクターを上記の2種の膵癌細胞株に導入してルシフェラーゼ発光の有無を調べた. さらに U0126 処理により MAPK 経路を抑制し, fascin promoter が非活性化されるかどうかを検証した.

4. 研究成果

(1) RAS-MAPK 経路の抑制により fascin 発現が低下するかどうかの検証

図1に示すように, PCI-35, MIA PaCa-2 いずれの細胞株においても, コントロールサンプルと比較してU-0126 処理を行ったサンプルの方が有意に fascin の mRNA の発現が低下していた.



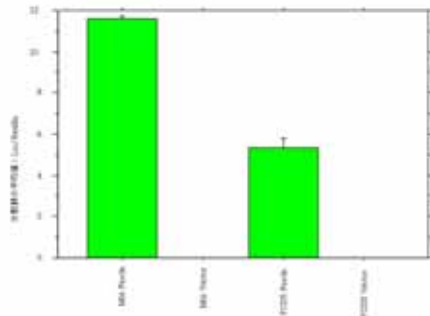
(2) RAS-MAPK 経路の活性化により fascin 発現が惹起されるかどうかの検証

HEK293 に MAPKK 遺伝子を導入し RAS-MAPK 経路を活性化させた群, さらにはそれに DUSP 処理を加え経路を抑制した群では, 元々の親株と比し fascin の mRNA の発現の増減はほとんど認められなかった.

(3) RAS-MAPK 経路のシグナルにより fascin の promoter が活性化されるかどうかの検証

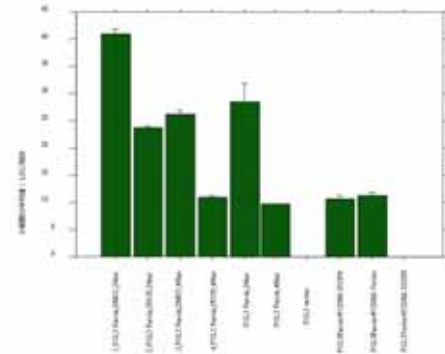
Fascin の promoter を挿入したレポーターベクター (pGL3) を, PCI-35 及び MIAPaCa-2 の 2 種の膵癌細胞株に導入すると, ルシフェラーゼアッセイではいずれの株においても promoter の活性化が認められた (図 2A) .

図2A MIAPaCa-2, PCI35株でFascin promoter activity



さらに U0126 処理により RAS-MAPK 経路を抑制したところ, MIAPaCa-2 においては 24 時間後, 48 時間 fascin promoter の非活性化が観察された (図 2B) .

図2B MIAPaCa-2細胞でFascin promoter activity (U0126とDMSO処理時)の検定



<考察>

2 つの細胞株において, U-0126 により RAS-MAPK の経路を抑制すると fascin の発現に低下がみられたこと, さらにはレポーターアッセイにおいてこれらの 2 細胞株では fascin promoter の活性化が確認されたことから, 膵癌においては RAS 遺伝子の点突然変異が fascin mRNA の転写の亢進を引き起こし, 同蛋白の異常発現につながっていることが示唆された. MIAPaCa-2 においては, U-0126 処理を加えると fascin promoter 活性が抑制されたことも, 同様のことを示していると考えられた. 一方で, PCI-35 株では U-0126 による fascin の promoter 活性の変化に一定の方向性が得られなかった. これは triplicate で行った実験の結果にばらつきがあり, なんらかの technical error が加わっていた可能性が考えられ, 再検証が必要である.

一方で, 反対に RAS が野生型である HEK293 において, RAS-MAPK 経路を強制的に活性化させると fascin の転写が亢進すると仮定していたが, 予測に反して mRNA 値に大きな変化はみられなかった. このことは, 本株においては RAS-MAPK 経路の活性化に伴いいずれかの 2 次経路の活性化が惹起され, 結果的に fascin の転写の亢進が防がれる, feedback 機構のようなものが働くのではないかと推察された. おそらく膵癌細胞株においては, RAS の変異に加えてこの feedback 機構にも異常が引き起こされており, fascin の異常発現という結果につながるのではないだろうかと考察された.

本研究により, 膵癌における fascin の異常発現の原因は RAS の変異である可能性が高いことが示された. 今後の課題として, 膵癌において fascin を target とした治療が有用であるかどうかの, in vitro, in vivo における検証が望まれる.

<今後の研究予定>

クローニングした fascin のプロモーター領域は約 2000bp であるため, 現在この領域を断片化しながら再度クローニングを進めている. この断片を少しずつ短くしながらレポータープラスミドに組み込み, 同プラスミドを膵癌細胞株に導入してルシフェラーゼアッセイを行い, 実際に転写活性化に関わっている領域の同定を試みている. この領域が同定されれば, 同領域に働きかける転写因子を検索し, fascin の転写を促進する転写因子を検索出来ると考えている.

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 12 件)

- (1) Xiao HD, Yamaguchi H (double author), Dias-Santagata D, Kuboki Y, Akhavanfard S, Hatori T, Yamamoto M, Shiratori K, Kobayashi M, Shimizu M, Fernandez-Del Castillo C, Mino-Kenudson M, Furukawa T. Molecular characteristics and biological behaviours of the oncocytic and pancreaticobiliary subtypes of intraductal papillary mucinous neoplasms. J Pathol. 2011 Aug;224(4):508-16. doi: 10.1002/path.2875. 査読有
- (2) Yamaguchi H, Kuboki Y, Hatori T, Yamamoto M, Shiratori K, Kawamura S, Kobayashi M, Shimizu M, Ban S, Koyama I, Higashi M, Shin N, Ishida K, Morikawa T, Motoi F, Unno M, Kanno A, Satoh K, Shimosegawa T, Oriyasa H, Watanabe T, Nishimura K, Harada Y, Furukawa T. Somatic mutations in PIK3CA and activation of AKT in intraductal tubulopapillary neoplasms of the pancreas. Am J Surg Pathol. 2011 Dec;35(12):1812-7. doi: 10.1097/PAS.0b013e31822769a0. 査読有
- (3) Furukawa T, Hatori T, Fujita I, Yamamoto M, Kobayashi M, Ohike N, Morohoshi T, Egawa S, Unno M, Takao S, Osako M, Yonezawa S, Mino-Kenudson M, Lauwers GY, Yamaguchi H, Ban S, Shimizu M. Prognostic relevance of morphological types of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. JAMA. Apr;60(4):509-16. Epub 2010 Dec 30. doi: 10.1136/gut.2010.210567. 査読有

[学会発表] (計 22 件)

- (1) Yamaguchi H, Furukawa T, Kuboki Y, Hatori T, Higashi M, Morikawa T, Kanno A, Oriyasa H, Harada Y, Shimizu M.: Somatic mutations in PIK3CA and activation of AKT in intraductal tubulopapillary neoplasms of the pancreas. 4th AOPA & KPBA Joint Meeting of the 4th Asian-Oceanic Pancreas Association and 2011 annual Congress of the Korean Pancreatobiliary Association. September 2-3, 2011 Jeju, Korea
- (2) 山口 浩 他 : 膵管内管状乳頭腫瘍 / Intraductal tubulopapillary neoplasm における PIK3CA の体細胞変異 . 第 100 回日本病理学会総会 平成 23 年 4 月 28-30 日 横浜

(3) 山口 浩 : パネルディスカッション ; 膵癌取り扱い規約をめぐって - 膵管内腫瘍の新しい分類システムの提唱 第 18 回日本消化器関連学会週間 (JDDW2010) 2010 年 10 月 13-16 日 横浜

(4) Yamaguchi H et al.: A New Classification system for Primary Intraductal Neoplasms of the Pancreas. 第 14 回国際膵臓学会・第 41 回日本膵臓学会大会合同会議 2010 年 7 月 10 -13 日 福岡

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山口 浩 (YAMAGUCHI HIROSHI)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 20510697

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

古川 徹 (FURUKAWA TORU)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 30282122