

機関番号：33920

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790370

研究課題名（和文）GLI1 新規標的遺伝子 HES1, DEC2 による膵癌悪性形質発現メカニズムの解析

研究課題名（英文）Roles of HES1 and DEC2, newly identified transcriptional targets of GLI1, in pancreatic carcinogenesis.

研究代表者

稲熊 真悟 (INAGUMA SHINGO)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：80410786

研究成果の概要（和文）：

ヘッジホッグシグナル経路に属する転写因子 GLI1 は、*DEC2* プロモーター領域の-1126～-1117 に存在する CACCC-box を介して、直接 *DEC2* 発現を上昇させることを解明した。また、GLI1 によって発現上昇した *DEC2* はミスマッチリペア遺伝子の一つである *MLH1* の転写を抑制することも明らかにした。GLI1-*DEC2* 経路を介した *MLH1* の発現抑制が、遺伝子変異やゲノムの不安定性を誘発し、膵臓がんに寄与している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We identified *DEC2* as one of the direct transcriptional targets of GLI1, a downstream transcription factor of Hedgehog signaling pathway, via CACCC-box-like elements localized between -1126 and -1117 in the *DEC2* promoter. We also showed that one of the mismatch repair gene *MLH1* was down-regulated by GLI1-induced *DEC2*. We propose the possibility that Shh-GLI1-*DEC2* pathway represses *MLH1* expression and could enhance gene alteration and genomic instability in pancreatic carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
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 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌細胞は生物学的に高い増殖能、転移・浸潤能や薬剤耐性能などの悪性形質を有し、早期発見や治癒切除が困難であることも

加え、通常型膵管癌の5年生存率は9.5%とその予後は著しく不良であり、疾患原因遺伝子を対象とした分子標的治療法の確立が切望されている。

(2) ヒト膵癌においては *K-RAS*, *p53* の点突然変異、*c-Erb-B2* の異常発現などの遺伝子異常が報告されているが、これらの分子異常のみではその発がんメカニズムや、浸潤・転移に至る悪性形質の詳細は説明できず、膵臓癌発生進展の分子機構が十分に理解されているとは言い難い。

(3) トランスジェニック・マウスを用いた発がん研究から、形態形成に必須である Sonic hedgehog (Shh)-GLI シグナル経路と *K-RAS* 経路の協調的活性化が膵浸潤癌の発生に重要であることが報告されている。また、75%以上の膵癌組織で SHH の過剰発現が認められていることや、転写因子 GLI1 が増殖、転移・浸潤、薬剤耐性をはじめとする、様々な悪性形質の制御を行っていることが報告されており、SHH-GLI 経路が膵臓癌の発生、進展に重要である可能性が示唆されていたが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。

(4) 研究代表者らは、GLI1 の転写標的遺伝子の観点から、膵臓癌発生・進展のメカニズムを明らかにすべく、膵臓癌細胞株 Panc-1 をもとに、GLI1-Estrogen Receptor 融合遺伝子を安定発現する Panc-1G1ER とその陰性対照である Panc-1ER を作成し、Panc-1G1ER において  $\beta$ -estradiol (E2) 処理によって、*PTCH* など既知の GLI1 特異的標的遺伝子が効率的に誘導されることを確認した。これらの細胞株を用いて、E2 処理前後の発現遺伝子を cDNA マイクロアレイにて網羅的に解析、比較することで、GLI1 特異的転写標的遺伝子群を明らかにすることを試みた。その結果、GLI1 特異的な転写標的遺伝子の候補として、gel forming mucin の一種である *MUC5AC* や、*HES1*, *HES5*, *HEYL*, *DEC2* といった basic helix-loop-helix (bHLH) type の転写抑制因子群を新たに同定した。

(5) *MUC5AC* に関しては、E-cadherin による細胞間接着を阻害することで、膵癌細胞の遊走・浸潤を促進している可能性が示唆され、これを明らかにするための実験計画を遂行している最中であった。一方で、*DEC2* や *HES1* に関しては、cycloheximide による前処理を行っても、Panc-1G1ER において各遺伝子の発現誘導が観察されることから、これらが GLI1 の直接的な転写標的である可能性を明らかにしているのみであり、それらのエンハンサー配列の特定や、膵発がん、進展に及ぼす重要性や、機能に関しては未解析であった。

(6) 以上、研究代表者らは転写因子 GLI1 の転写標的を主体とした研究の過程で、GLI1 によって発現上昇した *DEC2* や *HES1* が膵癌の発生、進展にいかなる役割を担っているか、そのメカニズムを解析するための準備が整いつつある状況であった。

## 2. 研究の目的

(1) 研究代表者らが新規に同定した GLI1 転写標的遺伝子候補である *DEC2*, *HES1* が、直接的な GLI1 の転写標的であることを、膵臓癌細胞株を用いた *in vitro* の実験系で明らかにすることを目的としている。

(2) また、SHH-GLI1-DEC2/HES1 シグナル伝達経路が、どのようなメカニズムで膵臓癌細胞の悪性形質発現を制御するかを明らかにし、膵臓癌の発生、進展に寄与するメカニズムに関する理解を深め、将来的な治療応用の布石となることも目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) GLI1, GLI2 の siRNA を膵臓癌細胞株に一過性導入作用し、*DEC2*, *HES1* の発現が抑制されることを確認する。

(2) GLI1 が *DEC2* の発現を誘導する際のエンハンサー部位を明らかにするために、そのプロモーター領域 (-1728~+291) を PCR にて増幅し、pGL4 レポーターベクターに導入する。これらのベクターを用い、レポーターアッセイを行うことで、エンハンサー領域を明らかにする。また、レポーターアッセイによって同定された GLI1 結合配列に関して、クロマチン免疫沈降法を用いて、GLI1 の結合を証明する。

(3) *DEC2* はミスマッチリペア遺伝子 *MLH1* の転写を抑制することを、Nakamura H. らが報告している (Oncogene, 2008)。そこで、GLI1, *DEC2* の発現ベクター、および *DEC2* の発現を抑制する shRNA ベクターを膵臓癌細胞株に一過性導入し、*MLH1* 発現の変化を検討する。

(4) 膵臓癌切除材料を用いて、正常膵管、Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN)、浸潤癌組織における GLI1, *DEC2*, *MLH1* の発現を免疫組織学的に解析する。各遺伝子の発現強度は陰性 (score 0)、弱陽性 (score 1)、強陽性 (score 2) と、三段階で評価する。

## 4. 研究成果

(1)膵臓癌細胞株 Panc-1、KP-4 に GLI1、GLI2 の siRNA を作用させたところ、内因性の *DEC2*、*HES1* の発現がいずれも抑制された。Panc-1G1ER において、cycloheximide による前処理を行っても、*DEC2*、*HES1* の発現誘導が抑制されなかった結果も含め、これらの遺伝子は GLI1 の直接的標的遺伝子であると考えられた。

(2)レポーターアッセイ、クロマチン免疫沈降法を行い、*DEC2* プロモーターを解析したところ、-1126 から -1117 に存在する CACCC-box-like 配列に GLI1 が結合することで、*DEC2* の発現を誘導することを明らかにし、*DEC2* は GLI1 の直接的な転写標的遺伝子であると結論づけた。

(3)膵臓癌細胞株に外来性に導入した GLI1 は効率的に内因性 *DEC2* を誘導し、MLH1 発現を抑制した。また、同時に *DEC2* 特異的な shRNA ベクターを導入したところ、MLH1 発現の抑制を認めなかったことから、GLI1 による MLH1 発現抑制は *DEC2* 依存的な現象と考えられた。

(4)膵臓癌切除材を用いた免疫組織学的解析から、GLI1 は正常膵管上皮に比して PanIN-1 A といった比較的早期の膵管内病変から浸潤癌に至るまで、有意な発現上昇が観察された。また、PanIN-1B、PanIN-2、PanIN-3、浸潤癌においては、正常膵管上皮に比して有意な *DEC2* 発現上昇と、MLH1 発現低下を観察した。GLI1 発現と *DEC2*、MLH1 発現との相関性をスピアマンの順位相関係数を用いて解析したところ、GLI1-*DEC2* 間には有意な正の相関 ( $R=0.785$ ,  $P<0.0001$ ) を、GLI1-MLH1 間には有意な負の相関 ( $R=-0.673$ ,  $P<0.0001$ ) を観察した。

(5)現在までに、胃癌等の消化管癌では、*MLH1* プロモーターメチル化によるサイレンシングが、ゲノム遺伝子の不安定性や、遺伝子変異を惹起し、発がんに寄与していると考えられていた。今回、研究代表者は、膵発がんの過程で発現上昇した GLI1 が、*DEC2* の発現誘導とそれによる転写抑制によって MLH1 の発現を抑制するという、新たなメカニズムを見出し、このような MLH1 遺伝子の発現低下が遺伝子変異やゲノム不安定性を惹起することで、GLI1-*DEC2* 経路が膵発がんを亢進させている可能性を提唱する。

## 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 1 件)

① Shingo Inaguma, Kenji Kasai, Hiroshi Ikeda: “GLI1 facilitates the migration and invasion of pancreatic cancer cells through MUC5AC-mediated attenuation of E-cadherin” *Oncogene* 30(6):714-723 (2011) (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

① 稲熊真悟、笠井謙次、米山亜紀子、池田洋: 「膵癌細胞において GLI1 は bHLH 型転写抑制因子 *DEC2* の発現を直接誘導し MLH1 を介した遺伝子不安定制に寄与する」第 98 回日本病理学会総会 (2009 年 5 月 3 日) 京都市

② 米山亜紀子、笠井謙次、稲熊真悟、池田洋: 「膵臓癌および Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) における SIL 発現状況の免疫組織学的検討」第 98 回日本病理学会総会 (2009 年 5 月 3 日) 京都市

③ 稲熊真悟、笠井謙次、池田洋: 「GLI1 は gel forming mucin MUC5AC の発現上昇によって膵癌細胞の浸潤・遊走能を亢進させる」第 68 回日本癌学会学術総会 (2009 年 10 月 1 日) 横浜市

④ Shingo Inaguma, Kenji Kasai, Hiroshi Ikeda: “GLI1 induces the expression of bHLH type of transcriptional repressor *DEC2* in pancreatic cancer cells” 101<sup>st</sup> Annual meeting of American Association for Cancer Research (2010 年 4 月 20 日) Washington, DC

⑤ 稲熊真悟、笠井謙次、池田洋: 「GLI1 は MUC5AC の発現誘導によって E-cadherin による細胞間接着を阻害し膵癌細胞の遊走・浸潤を促進する」第 99 回日本病理学会総会 (2010 年 4 月 29 日) 新宿区

[その他]

新聞報道 (計 1 件)

① 中日新聞「膵臓がん、広がる仕組みを解明、

粘液物質が進行促進」(2010年11月11日夕刊)(稲熊真悟研究成果報道)

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

稲熊 真悟 (INAGUMA SHINGO)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：80410786