

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 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 年 ～ 2012 年

課題番号：22590700

研究課題名（和文） K-ras 遺伝子変異は GST- π を介して大腸発癌を促進する研究課題名（英文） K-ras mutation promotes colorectal carcinogenesis through GST- π

研究代表者 高山 哲治 (TAKAYAMA TETSUJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：10284994

研究成果の概要（和文）：本研究では大腸癌において K-ras 変異により誘導される GST- π の意義を検討した。まず K-ras 野生型大腸細胞に変異 K-ras 遺伝子を導入したところ、いずれの細胞も GST- π 発現が誘導され、RAF/MEK/ERK が活性化して細胞増殖が促進し、JNK, p53 が抑制されてアポトーシスが抑制された。また、GST- π siRNA を用いて GST- π knockdown 細胞を樹立したところ、逆に細胞増殖能は低下し、アポトーシスが亢進した。抗 RAF 抗体及び抗 JNK 抗体を用いた免疫沈降では、GST- π が RAF や JNK と直接結合していることが示唆された。つまり、GST- π は RAF と結合することにより RAF/MEK/ERK を活性化して細胞増殖活性を亢進し、JNK と結合して p53 などの発現を抑制してアポトーシスを抑制することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of GST- π in growth promotion and apoptosis resistance of colorectal cancer. When a mutated K-ras gene was transfected into K-ras wild colon cancer cell line, GST- π expression was induced. The transfectant cells showed enhanced growth promotion activity via RAF/MEK/ERK activation and apoptosis resistance by inhibited JNK and p53 pathway. In contrast, GST- π knockdown cells showed growth inhibition and apoptosis enhancement by the inverse action mechanisms. Immunoprecipitation revealed that GST- π was directly interacted with RAF and JNK respectively. These results indicate that GST- π promote cell growth via direct binding to RAF and subsequent RAF/MEK/ERK activation, and inhibit apoptosis via direct binding to JNK and subsequent p53 apoptosis pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：下部消化管学（小腸、大腸）

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の死亡率は世界的に増加の一途を

たどり、その発生機序の解析と有効な治療法、予防法の確立が急務である。申請者らは、大

腸発癌過程の初期病変である aberrant crypt foci (ACF)においては K-ras 変異が高率に認められ、この変異により Glutathione S-transferase(GST)- π が誘導されること、また GST- π は発癌に促進的に作用することを報告した。

2. 研究の目的

本研究では、K-ras 野生型大腸細胞(GST- π 陰性)に変異 K-ras 遺伝子を導入し、細胞増殖やアポトーシスの変化等を調べ、大腸発癌における GST- π の役割を明らかにした。また、GST- π 高発現大腸癌細胞の GST- π knockdown 実験も行い、GST- π の細胞増殖促進及びアポトーシス抑制効果とその機序を検討する。さらに、免疫沈降法により、GST- π と RAF や JNK などの蛋白との結合性の有無を検討した。

3. 研究の方法

(1) K-ras 野生型大腸癌細胞に対する変異 K-ras 遺伝子の導入

変異 K-ras 遺伝子の発現ベクターを K-ras 野生型大腸細胞 CoCM-1 にリポフェクション法により遺伝子導入し、G418 耐性細胞 CoCM/RAS1-3 を樹立した。MTT assay 及び TUNEL 染色により細胞増殖とアポトーシスを調べた。

(2) K-ras 変異陽性大腸癌細胞株への GST- π siRNA ベクターの導入

K-ras 変異陽性の大腸癌細胞株 M7609 に GST- π siRNA ベクターを導入し、stable な GST- π KD 細胞 (M7609GSTKD) を樹立し、同様に細胞増殖とアポトーシスを調べた。

(3) GST- π KD 大腸癌細胞における各種 MAP kinase の発現及び活性

M7609GSTKD1, 2 細胞における p38, リン酸化 ERK 及び JNK の発現を Western blot 法で調べた。

(4) 大腸癌細胞における GST- π 発現と ERK カスケード関連酵素の発現

GSTKO/RAS1, 2 細胞におけるリン酸化 RAF, MEK, ERK の発現を Western blot 法により検討した。

(5) GSTKO/RAS1, 2 細胞における抗 RAF 抗体を用いた免疫沈降

GSTKO/RAS1-3 を可溶化して抗 RAF 抗体を用いて免疫沈降を行い、抗 GST- π 抗体で Western blot 解析を行った。

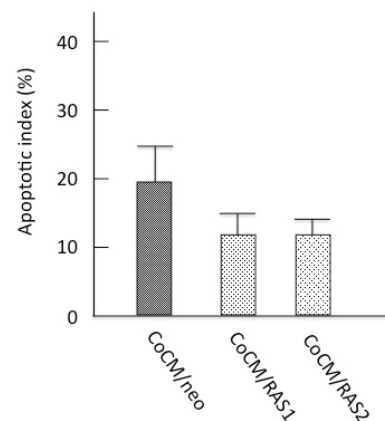
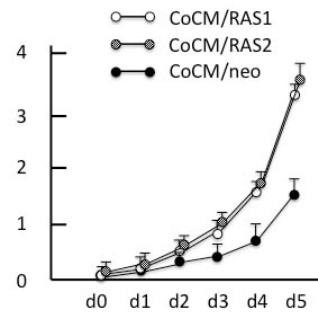
(6) GSTKO/RAS1, 2 細胞における抗 JNK 抗体を用いた免疫沈降

同様に、抗 JNK 抗体を用いて免疫沈降を

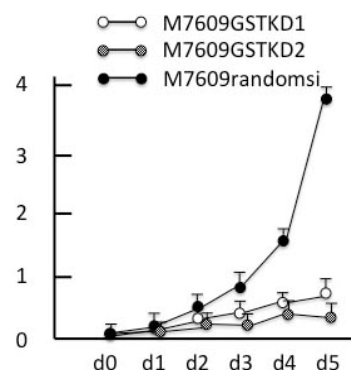
行い、得られた沈降物を抗 GST- π 抗体で Western blot 解析を行った。

4. 研究成果

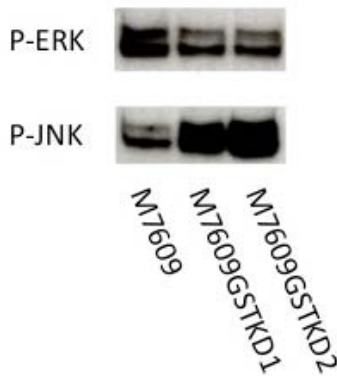
(1) CoCM/RAS1 及び CoCM/RAS2 細胞を培養して MTT assay を行ったところ、いずれも CoCM/neo に比べ細胞増殖能が高まっていた。また、CoCM/RAS1 及び CoCM/RAS2 のデオキシコール酸 (20 μ M) 存在下で TUNEL 染色を行ったところ、CoCM/neo に比べアポトーシスが抑制されていた。



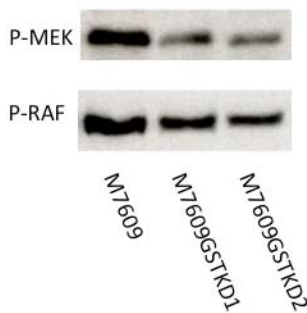
(2) M7609GSTKD の細胞増殖活性を MTT assay により調べたところ、親株に比べて有意に低下していた。



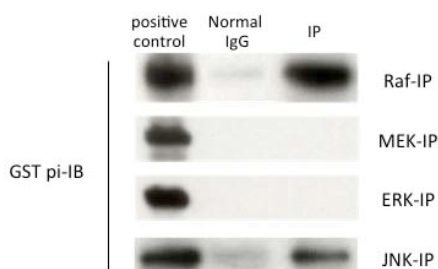
(3) M7609GSTKD1, 2 細胞のいずれにおいても、リン酸化 ERK の発現は低下し、リン酸化 JUN の発現は亢進していた。P38 は変化を認めなかった。各酵素の活性も同様であった。



(4) M7609GSTKD1, 2 細胞のいずれにおいても、リン酸化 RAF, MEK の発現は低下していた。



(5) 免疫沈降後の Western blot 解析では、21kDa に GST- π を示すバンドが認められ、GST- π が RAF と結合していることが示唆された。他の MAP kinase 関連蛋白では GST- π との結合を示唆する結果は得られなかった。同様に、21kDa に GST- π を示すバンドが認められ、GST- π と JNK の結合が示唆された。一方、MEK や ERK の免疫沈降ではバンドは認められず、これらの蛋白と GST- π との結合は否定された。



以上より、大腸癌細胞において GST- π は RAF, MEK, ERK などの MAPkinase を活性化することにより細胞増殖活性を亢進させていることが明らかとなった。一方、JNK, p53 を抑制することによりアポトーシスを抑制することが明らかとなった。また、GST- π は RAF と結合して RAF/MEK/ERK カスケードを活性化し、JNK と結合して JNK, p53 経路のアポトーシスを抑制することが示唆された。

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 4 件)

1. Takayama T, Nagashima H, Maeda M, Nojiri S, Hirayama M, Nakano Y, Takahashi Y, Sato Y, Sekikawa H, Mori M, Sonoda T, Kimura T, Kato J, Niitsu Y. Randomized double-blind trial of sulindac and etodolac to eradicate aberrant crypt foci and to prevent sporadic colorectal polyps. Clin Cancer Res. 2011;17:3803- 3811. (査読有) (DOI:10.1158/1078-0432.CCR-10-2395.)
2. Takeuchi T, Kimura T, Okamoto K, Aoyagi E, Miyamoto H, Kaji M, Takenaka H, Okamura S, Okahisa T, Takayama T. A mechanism for abnormal angiogenesis in human radiation proctitis: analysis of expression profile for angiogenic factors. J Gastroenterol, 2012;47:56-64. (査読有) (DOI:10.1007/s00535-011-0470-2.)
3. Kimura T, Okamoto K, Miyamoto H, Kimura-Kaji M, Kitamura S, Takenaka H, Muguruma N, Okahisa T, Aoyagi E, Kajimoto M, Tsuji Y, Kogawa T, Tsuji A, Takayama T. Clinical benefit of

high-sensitivity KRAS mutation testing
in metastatic colorectal cancer
treated with anti-EGFR antibody
therapy. *Oncology*. 2012; 82: 298-304.
(査読有) (DOI: 10.1159/000336792.)

4. 高山哲治、他. 大腸癌の予防 化学予防の面
から *The GI Forefront* 6巻 2010年 32-36.
(査読無)

[学会発表] (計 2 件)

1. Takayama T, Nishita H, Niitsu Y. Colon
cancer prevention targeting GST-pi. 第 70
回日本癌学会. 2011年 10月 4日. 名古屋国際
会議場(愛知県).
2. Tsuda M, Takayama T, et al.
Chemopreventive effect of RAS inhibitor on
azoxymethane-induced colorectal
carcinogenesis. 第 71 回日本癌学会. 2012年
9月 19日. 札幌市教育文化会館(北海道).

[その他]

ホームページ等

<http://pub2.db.tokushima-u.ac.jp/ERD/person/169695/profile-ja.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 哲治 (TAKAYAMA TETSUJI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：10284994

(2) 研究分担者

岡村 誠介 (OKAMURA SEISUKE)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教
研究者番号：30274210

梶 雅子 (KAJI MASAKO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教
研究者番号：30518220

(3) 連携研究者

()

研究者番号：