

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870792

研究課題名(和文)慢性炎症誘発性発癌に関わる新しいSonic hedgehog遺伝子誘導機構の解明

研究課題名(英文)The novel mechanisms of sonic hedgehog gene expression in the chronic inflammation induced cancer

研究代表者

阿部 芳憲(Abe, Yoshinori)

日本医科大学・付置研究所・助教

研究者番号：00386153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌は癌による死亡原因の上位に位置する癌である。我々は肺癌由来癌細胞株で癌化と深く関わるhedgehogシグナル伝達経路の活性化に必要なリガンドである、sonic hedgehog (Shh) 遺伝子の発現が亢進していることを見出した。

その後の解析の結果、肺癌においては炎症誘発性発癌と深く関わる転写制御因子STAT3がShh遺伝子の発現誘導に関わることや、この機構が腫瘍維持に重要な役割を果たしている可能性などを見出した。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer is the most leading cause of cancer death. We found that the expression of sonic hedgehog (Shh) gene, which is a ligand required for hedgehog signaling pathway activation was enhanced in lung cancer-derived cell lines.

From subsequent analysis, we found that a transcription factor STAT3, which is involved in the chronic inflammation-induced tumorigenesis, induced Shh gene expression in lung cancer-derived cell lines. This mechanism may play an important role in tumor maintenance.

研究分野：分子生物学

キーワード：STAT3 hedgehogシグナル伝達経路

1. 研究開始当初の背景

炎症は感染や組織傷害に対し、生体が持つ組織修復機構である。一方、炎症反応が恒常的に起こる慢性炎症は細胞の癌化の主要な原因となり、疫学的な解析から癌発症の25%は慢性炎症によるものだとされている。しかしながら慢性炎症による癌化の分子メカニズムについては不明な点が多く残っており、この機構をより深く理解することは、癌治療の観点から見て重要なテーマとなる。慢性炎症誘発性発癌のメディエーターの一つにサイトカインと呼ばれる様々な種類の分泌蛋白質がある。それらの中でIL-6は、慢性炎症誘発性発癌に関わる主要な転写因子STAT3を活性化することが知られている。

申請者はこれまで一貫して、Hhシグナル伝達経路の恒常的活性化と癌発症のメカニズムについて研究を行ってきた。そして最近の解析から転写因子STAT3が恒常的に活性化し、Hhシグナル伝達経路のリガンドであるShhが恒常的に発現している癌細胞由来細胞株において、STAT3阻害剤を処理するとShh遺伝子の発現が抑制されることを見出した。このことからSTAT3が、Shh遺伝子の発現誘導に関わっている可能性が考えられた。

Hhシグナル伝達経路は組織修復時の炎症反応の過程でShhが発現誘導されることによって活性化することや、STAT3とHhシグナル伝達経路が相互作用して、組織修復時の細胞遊走に関わることが報告されている。このことから慢性炎症においても、STAT3とHhシグナル伝達経路は恒常的に活性化され相互作用することで、細胞の癌化と深く関わっている可能性がある。一方、多くの癌でShhが過剰発現することによってHhシグナル伝達経路が恒常的活性化していることが報告されているが、Shh遺伝子の発現誘導機構には不明な点が多い。

また、慢性炎症反応に限らず癌化の過程では、いくつかの細胞内シグナル伝達制御機構が破綻し、複数の細胞内シグナル伝達経路が同時に恒常的に活性化し、相互作用する。このことが、ある分子を標的とした抗癌剤を患者に投与しても、癌細胞が消失しない原因の一つとなる。従って新しい癌治療法を提唱する上で、癌発症に関わる細胞内シグナル伝達ネットワーク機構をより深く理解することが重要である。

2. 研究の目的

本研究は、新しい癌治療法の提唱を見据え、STAT3活性化経路からHhシグナル伝達経路への新しいシグナル伝達機構を解明し、癌化に関わるシグナル伝達ネ

ットワークの分子機構に、新しい知見を加えることを目的とする。具体的には(1)STAT3によるShh遺伝子発現誘導機構を解明し、(2)発癌モデルマウスによるSTAT3を介したShh遺伝子発現誘導の癌化への影響、及びこの機構を遮断した時の腫瘍抑制効果について明らかにする。

3. 研究の方法

これまでNF- κ BがShhの発現誘導に関与するとの報告がある。しかし、これらの実験は1種類の細胞株を用いた実験結果であり、より多くの癌細胞株を用いた網羅的な解析や個体レベルでの解析は、未だなされていない。本研究では以下の実験を行って(1)Shhが発現している様々な癌細胞株でSTAT3とShh発現との相関関係を明らかにし、STAT3によるShh発現誘導機構を明らかにする。さらに、(2)STAT3を介したShh発現誘導機構と炎症誘発性発癌との関わりを、発癌モデルマウスを用いて明らかにする。

1. 申請者はこれまで慢性炎症誘発性発癌とも関わりのある非小細胞肺癌、胃癌、乳癌由来癌細胞株で、STAT3阻害剤処理によってShh遺伝子の発現が低下することを見出した。そこで、より多くのShh発現癌細胞株を入手し、それらの細胞株でSTAT3が恒常的に活性化していることを明らかにする。そしてSTAT3が活性化しているShh遺伝子発現癌細胞株で、阻害剤やRNAi法によってSTAT3を抑制した時、Shhの発現も低下することを確認し、STAT3によるShh遺伝子発現誘導が多くの癌で見られることを明らかにする。(平成25年度)
2. STAT3がShh遺伝子翻訳領域上流に数あるSTAT結合配列のうち、どの領域に結合しShh遺伝子の発現誘導を行うかなど、STAT3によるShh遺伝子発現誘導機構を詳細に明らかにする。(平成25~26年度)
3. STAT3によるShh遺伝子発現誘導が、実際に慢性炎症誘発性発癌の過程でも生じ、STAT3の抑制によるShh遺伝子の発現抑制が腫瘍形成の抑制に繋がることを、慢性炎症誘発性発癌モデルマウスを用いた実験系で明らかにする。(平成26~27年度)

4. 研究成果

1. 癌細胞株でのSTAT3の機能阻害によるShh遺伝子の発現抑制

本研究では様々な癌種の中から、まず癌による死亡原因の上位に位置する肺癌のうち、約85%をしめる非小細胞肺癌に焦点を絞って解析を進めることとした。

非小細胞肺癌患者の約3割にはEGFR

遺伝子に変異があり、約 1 割には Ras に変異があることが分かっている。そこで EGFR に変異がある非小細胞肺癌由来細胞株 (HCC827, HCC4006) と Ras に変異が入っている非小細胞肺癌由来癌細胞株 (A549) を用いて、Shh の発現が正常胎児肺由来細胞株と比較して亢進しているかどうかについて、リアルタイム定量 PCR 法を行って調べた。その結果、いずれの癌細胞株でも Shh の発現が亢進していることが分かった。

次にこれらの癌細胞株に STAT3 阻害剤を処理して Shh 遺伝子の発現変化について、リアルタイム定量 PCR 法を行って調べた。その結果、STAT3 が抑制されることによって Shh の発現が減少することが分かった。

同様の結果は、RNAi 法を行って STAT3 の発現を抑制することによっても確認できた。

2. STAT3 が直接 Shh 遺伝子の発現誘導に関わるのかどうか

次に、STAT3 が Shh 遺伝子の発現誘導に直接関わるのかどうかを調べた。具体的には Shh 遺伝子翻訳開始点上流 2 kb 程度を幾つかの範囲に分割し、ルシフェラーゼアッセイ用ベクターに組み込んだ。このプラスミドと活性型 STAT3 (STAT3C: 図 1 中では STAT3 と表記) を細胞にトランスフェクションして 24 時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼアッセイ法を行った。その結果、STAT3 が直接 Shh 遺伝子を誘導することを示唆する結果を得た (図 1)。

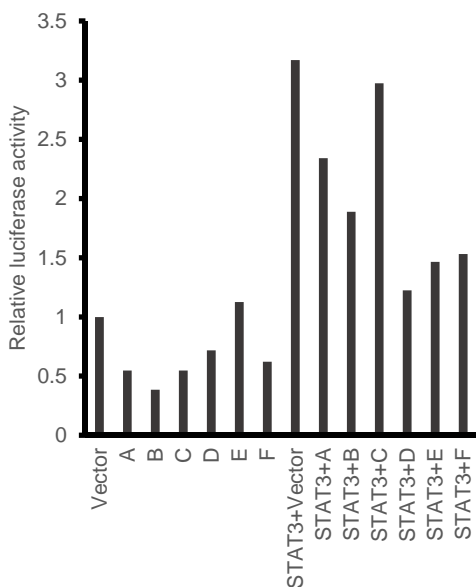


図 1: STAT3 による Shh 遺伝子の発現誘導

Shh 遺伝子翻訳開始点上流領域 1.2kb を幾つかの領域に分割したレポータープラスミドを用いて実験した。A が翻訳開始点より最も遠く、F が翻訳開始点に最も近い。

この結果から、STAT3 は Shh 遺伝子翻訳開始点より数百塩基上流の STAT 結合配列に結合して Shh 遺伝子の発現を誘導していることが考えられた。

実際、ChIP アッセイ法を行った実験からも同様の可能性を示唆する結果を得た。

また、STAT3 は NF- κ B と強調して遺伝子の発現誘導に関わるとの報告もある。しかしながら、Shh 遺伝子の発現誘導には STAT3 のみが関わることを示唆する結果を得た。

3. STAT3-Shh 経路の細胞の癌化における役割

最後に、STAT3-Shh 経路が細胞の癌化においてどのような役割を担っているかについて検討した。

まず癌細胞株をヌードマウスへ移植してできた腫瘍に Shh の中和抗体を処理して腫瘍が縮小するかどうかを調べた。その結果、腫瘍の消失は見られなかった。

さらに癌細胞株に Shh を処理しても、Hedgehog シグナル活性化に伴って発現亢進するはず遺伝子群も亢進しなかった。しかしながら、hedgehog シグナル伝達経路下流で機能する転写制御因子 Gli ファミリーを、RNAi 法を行って発現抑制すると、Gli 標的遺伝子群の発現は抑制された。このことから、STAT3 によって発現誘導される Shh は直接癌細胞に作用しないことが考えられた。

これらのことから STAT3 によって発現誘導される Shh は腫瘍環境を維持する別の細胞(癌関連線維芽細胞、免疫細胞)の維持に関わる可能性が考えられた。今後はこの可能性に着目して解析を進める予定である。

また、申請者は本研究の過程で、肺癌細胞における hedgehog シグナル伝達経路に依存しない、新しい Gli ファミリー活性化機構も見出している。この知見については、平成 28 年度の早い時期に論文投稿を目指す。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

阿部 芳憲 (ABE Yoshinori)
日本医科大学付置研究所・助教
研究者番号：00386153

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：