

	ほんま のぶゆき
氏 名	本 間 信 之
学 位	博 士 (医学)
学位記番号	新大博(医)第1705号
学位授与の日付	平成19年1月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
博士論文名	MEK/ERK signaling is a critical mediator for integrin-induced cell scattering in highly metastatic hepatocellular carcinoma cells (MEK/ERKシグナル伝達経路は高転移性肝癌細胞においてインテグリンを介した遊走能獲得に関与する重要なメディエーターである)
論文審査委員	主査 教授 畠 山 勝 義 副査 教授 青 柳 豊 副査 教授 味 岡 洋 一

博士論文の要旨

【背景と目的】

ヒト肝細胞癌 (HCC) は高頻度に肝内転移を伴い再発を繰り返す予後不良な悪性腫瘍であるが、その転移機構に関しては様々な検討がなされているにもかかわらず未だ不明である。これまで、われわれは低分化型ヒト肝癌由来培養細胞株 KYN-2 (KYN-2) が免疫不全マウス肝臓内でヒト HCC 類似の肝内転移巣を形成することを見出し、このモデルを用いてヒト HCC の浸潤転移機構の解析を行ってきた。そして、この細胞が試験管内で細胞基質間接着分子 (インテグリン) を介した刺激により、浸潤転移に対し抑制的に作用する細胞間接着分子 (E-cadherin) の不活化が起こり KYN-2 細胞の遊走能が亢進する事を明らかにした。一方インテグリンの下流で活性化される分子のひとつである細胞外シグナル制御キナーゼ(ERK)と呼ばれる分子は HCC での活性化や発現亢進が我々を含めた複数のグループから報告されている。本研究ではこの ERK に着目し、KYN-2 細胞におけるインテグリンを介した遊走能の誘導に関与する細胞内シグナル伝達機構を解析し、HCC の肝内転移を制御するシグナル伝達経路の解明を目指した。

【方法】

KYN-2 細胞を用い、各培養条件下における ERK の活性化と形態の変化を検討した。次に ERK の上流に位置する ERK キナーゼ(MEK)の阻害剤を用いて ERK の活性化を阻害し、KYN-2 細胞の形態変化と接着分子の局在を観察した。また、MEK の機能獲得型変異体遺伝子を KYN-2 細胞に導入し、強制的に MEK/ERK シグナルを増幅してその効果を解析した。

【結果と考察】

KYN-2 細胞はコラーゲン等の存在培養下でインテグリンを刺激すると、ERK の活性化と平行して細胞の遊走が誘導された。また、ERK シグナルの上流に位置する MEK の阻害剤で処理すると、コラーゲン等の存在下であっても細胞間接着が回復し、細胞の遊走能が著明に抑制された。一方機能獲得型変異体 MEK1 遺伝子を導入した KYN-2 細胞では E-cadherin の細胞間接着部位への集積が低下し細胞同士の結合が減弱した。また機能獲得型変異体 MEK1 遺伝子導入細胞では対照細胞株と比較して細胞遊走能の亢進が観察された。これらの結果は、インテグリンを介して細胞外からの刺激が加えられることにより、細胞内の MEK/ERK シグナル伝達経路が活性化し、その結果 E-cadherin を介した細胞間接着の減弱と細胞遊走能の獲得が起こることを示していると考えられた。さらに MEK-ERK シグナルが癌細胞の遊走を促す過程において関与している分子を検索するため、抗体マイクロアレイを用いて機能獲得型変異体 MEK1 遺伝子導入細胞における蛋白発現を網羅的に解析した。その結果、上皮増殖因子受容体(EGFR)の抑制因子である c-Cbl が著明に減少している事を見出した。

以上の結果よりインテグリン・MEK・ERK を介したシグナル伝達経路が高転移性 HCC 細胞株の遊走能獲得に深く関与している事が示された。さらに細胞の遊走能の獲得は浸潤転移の重要なひとつのステップと考えられることから、このシグナルがヒト HCC の浸潤転移に関与している可能性が示唆された。またこのシグナルの下流で作用している分子機構のひとつとして c-Cbl の発現変化が示された。今後は臨床材料を用いたインテグリン・MEK・ERK シグナル活性と肝内転移、予後との相関を検討するとともに、KYN-2 モデルを用いて c-Cbl などインテグリン・MEK・ERK シグナルの下流のシグナルを詳細に解析することが、将来の転移の予知や治療につながっていくと考えられた。

(論文審査の要旨)

申請者は、肝細胞癌の肝内転移を制御するシグナル伝達経路の解明を目的として、低分化型ヒト肝癌由来培養細胞(KYN-2)におけるインテグリンを介した遊走能の誘導に関与する細胞内シグナル伝達機構を解析した。

【材料及び方法】 KYN-2 を用い、各培養条件下における細胞外シグナル制御キナーゼ(ERK)の活性化と形態の変化を、ERK キナーゼ(MEK)の阻害剤を用いての KYN-2 の形態変化と接着分子の局在を、また MEK の機能獲得型変異体遺伝子を KYN-2 に導入し強制的に MEK/ERK シグナルを増幅してその効果を解析した。

【結果と考察】 KYN-2 は、コラーゲン等の存在培養下でインテグリンを刺激すると、ERK の活性化と平行して細胞の遊走が誘導された。また、MEK の阻害剤で処理するとコラーゲン等の存在下であっても細胞間接着が回復し細胞の遊走能が著明に抑制された。一方、機能獲得型変異体遺伝子を導入すると E-cadherin の細胞間接着部位への集積が低下し細胞同士の結合が減弱した。これらの結果は、インテグリンを介しての刺激により、細胞内の MEK/ERK シグナル伝達経路が活性化し、その結果細胞間接着の減弱と細胞遊走能の獲得が生じることを示していると考えられた。

以上、インテグリン・MEK・ERK を介したシグナル伝達経路が高転移性肝細胞癌の遊走能獲得に深く関与していることを明らかにした点に、学位論文としての価値を認める。