

腫瘍悪性化関連因子 ARK5 遺伝子の腫瘍細胞における発現調節機構

新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻
がん先端生命科学研究分野 2005年3月修了
指導教官 江角 浩安 教授
学籍番号 36524 下条 洋輔

序論

腫瘍の増殖や生存は血管から供給される酸素及び栄養素、特にグルコースに依存する。故に腫瘍の血管新生は、過剰な増殖による酸素及び栄養欠乏への対抗手段であり、腫瘍悪性化の主要因として考えられてきた。しかしながら、膵癌をはじめとする多くの腫瘍組織は hypovascular であり、十分な新生血管が認められず、また血管構造構築が不完全であることから常に低酸素・低栄養状態に曝されていると考えられる。近年、血管新生の盛んな肝癌由来細胞株では、低栄養素（低グルコース）下で急激な細胞死が誘導されるのに対し、血管新生が不十分な膵癌由来細胞株が低グルコースに強い耐性を示すことが明らかにされた。こうしたことから従来の考え方とは異なり、膵癌のような血流が不十分である腫瘍では栄養飢餓耐性能が腫瘍悪性化の重要な要因である可能性が指摘されている。

膵癌の栄養飢餓耐性能は AMPK (AMP-activated protein kinase) と Akt により誘導されることが明らかにされている。AMPK は運動生理や糖尿病研究領域において盛んに研究されてきたが、細胞のエネルギー欠乏に反応してコレステロールや脂肪酸の合成を抑制し、異化反応を促進する分子として同定されたものである。近年では複数の関連因子 (AMPK-related kinase) が報告されており、ARK5 も単離・同定された。ARK5 の活性は AMPK family の中で唯一 Akt により制御されており、ARK5 の活性化が *in vitro* では栄養飢餓耐性を誘導することに加え、*in vivo* では更に腫瘍細胞の生存・浸潤・転移が増強されることが明らかとなっている。ARK5 の mRNA レベルの発現については脳や心臓に強く見られる一方、大腸癌や膵癌をはじめ多くの腫瘍組織由来の細胞株でも強発現が認められる。加えて実際の癌組織、例えば大腸癌では ARK5 の腫瘍特異的な発現が認められている。従って ARK5 は腫瘍の発生・進展に重要な役割を担っていると考えられ、ARK5 を標的とする新たな癌治療薬の開発が期待されており、現在酵素活性阻害剤のスクリーニングが進行している。一方で、ARK5 の癌組織での発現抑制という癌治療の可能性もある。そこで本研究では腫瘍特異的な ARK5 の発現制御機構の解明、更に新たな治療法実現へ向けて、恒常的な mRNA の高発現がみられた膵癌細胞株及び低グルコース下で ARK5 mRNA の誘導が認められた肝癌細胞株 HepG2 に焦点を当て、プロモーター解析を中心に ARK5 の発現制御機構の解析を試みた。

結果

I. 転写調節因子による遺伝子発現制御

先ず転写調節因子による発現制御が考えられた為、腫瘍における ARK5 遺伝子転写調節

領域の解析に着手した。NCBI データベースでは正常な脳由来の ARK5 mRNA の転写開始点
が示されており、腫瘍において同様にその点が使用されているか、RT-PCR およびプライマ
ー伸長法を用いて解析した結果、腫瘍では脳とは異なり、更に下流で転写が開始されてい
る可能性が示唆された。そこでルシフェラーゼに繋いだ約 4.3kbp の ARK5 プロモーター及
び欠失変異コンストラクトを用意し、腫瘍細胞株に対してレポーターアッセイを行うこと
で具体的に転写に関与する因子の同定を試みた結果、転写開始点上流にある E2F、AML-1 α
の結合モチーフを含む領域の欠如に伴って活性減少が見られ、これら 2 つが候補因子とし
て挙げられた。

II. mRNA 安定化による遺伝子発現制御

グルコース飢餓条件下での ARK5 遺伝子の発現解析を行うに当たり、肝癌細胞株 4 種を
用いて、RT-PCR により発現の経時的変化を検討したところ、HepG2 細胞では 12 時間の飢
餓処理で約 2.5 倍の発現誘導が見られた。転写調節による発現誘導が考えられたので ARK5
プロモーターコンストラクトを用いたレポーターアッセイを行ったところ、グルコース飢
餓処理により活性の減少が示された。mRNA 安定化による蓄積が一方で考えられ、転写阻
害剤 actinomycin D を用いた mRNA 半減期の検討を行ったところ、グルコース飢餓条件下で
は ARK5 mRNA の半減期が約 2 倍に伸びていることが示された。

考察・結論

腫瘍における ARK5 mRNA の遺伝子発現制御は少なくとも転写調節因子による制御と
mRNA の安定化による制御の 2 つの可能性が考えられた。おそらく腫瘍がエネルギー的に
劣悪な欠乏環境による弊害に対応し、生き残っていくためには、低グルコース下でサバイ
バルに関連する遺伝子発現を微調節できる多彩な制御機構が必要だと思われる。転写制御
の解析では上述の転写因子が実際に腫瘍で ARK5 の発現制御に関与しているか、脳との制
御差の原因または結果なのか。今後更なる詳細なプロモーター解析ならびに変異導入によ
る解析を行う必要がある。mRNA 安定化による発現制御では今後、mRNA の安定化に寄与
している分子の探索及び、安定化シグナルの機構の解析を予定している。

キーワード：栄養飢餓、腫瘍悪性化関連因子、AMPK、ARK5