

論文の内容の要旨

論文題目：癌抑制遺伝子 APC とグアニンヌクレオチド交換因子 Asef の大腸癌発症における役割

(Role of the tumor suppressor APC and the guanine-nucleotide exchange factor Asef in colorectal tumorigenesis)

氏名 古川史織

【序章】

日本人の大腸癌による死亡者数はこの 20 年で 2 倍以上に増え続けており、癌死の原因の主要なものになっている。しかし、発癌から癌の進行における分子メカニズムの解明は十分に進んでいるとは言えず、大腸癌に対する有効な治療法、診断法、抗癌剤等の開発は重要な課題となっている。

本研究では、大腸癌発症の鍵を握る癌抑制遺伝子 APC (Adenomatous polyposis coli) に着目し、当研究室で同定した APC 結合タンパク質 Asef を手がかりとして、APC の癌における機能を明らかにし、新たな分子標的治療法開発を目的とした。

【第一章】

－背景－

癌抑制遺伝子 APC 遺伝子は家族性腺腫性ポリポージス (Familial adenomatous polyposis: FAP) の原因遺伝子として単離された。大腸癌では APC の変異によって停止コドンが生じ断片化した短い遺伝子産物が発現しているが、この様な変異型 APC は FAP 患者だけではなく、散发性の大腸癌においても高頻度で見られ、大腸癌全体の 80% を占める。よって、一般の大腸癌の発症においても APC の変異は重要な要素であると考えられる。

APC は β -カテニンの分解を促進することで Wnt シグナルを負に制御しているが、大腸癌に見られる変異型 APC はこの機能を失っており、Wnt シグナルが恒常的に活性化されることが癌化に重要であると考えられてきた。しかし、当研究室では APC 結合新規タンパク質として Rac1 と Cdc42 特異的な GEF、Asef と Asef2 を同定しており、これらが 大腸癌で発現している変異型 APC と相互作用することで、恒常的に活性化され、細胞の接着や運動を制御し、癌の悪性化に寄与していることを明らかにしてきた。本研究では APC/Asef の癌細胞における機能をより詳しく解明することを目的とした。

—結果—

APC/Asef は bFGF や VEGF を含む増殖因子の下流で機能する

細胞に Asef を強制発現するとラメリポディアを形成し、細胞の運動を誘導するが、このような挙動は細胞に増殖因子を作用させた時と同様な反応である。その為、APC/Asef が増殖因子の下流因子として機能しているのかどうかを検討したところ、ヒト大動脈内皮細胞 (HAEC) では、血管新生に必須の増殖因子 bFGF や VEGF の刺激によって、APC/Asef がラッフル膜やラメリポディアに濃縮、局在することを見出した。これらの結果から、APC/Asef は bFGF と VEGF の下流因子として機能している可能性が示唆された。

HAEC において APC または Asef を siRNA によって抑制し、細胞の運動能を検討したところ、これらの細胞はコントロールの HAEC に比べて有意に運動能が抑制された。さらに、当研究室で作製されていた Asef ノックアウトマウス (Asef^{-/-}) から大動脈内皮細胞 (MAEC) を採取し、bFGF や VEGF 刺激による影響を検討したところ、HAEC と同様に Asef の欠損によって運動能の低下が観察された。更に Asef^{-/-} MAEC は血清や bFGF 存在下でも、血管構造の形成に必要なチューブ形成能も失われていた (Fig.1)。

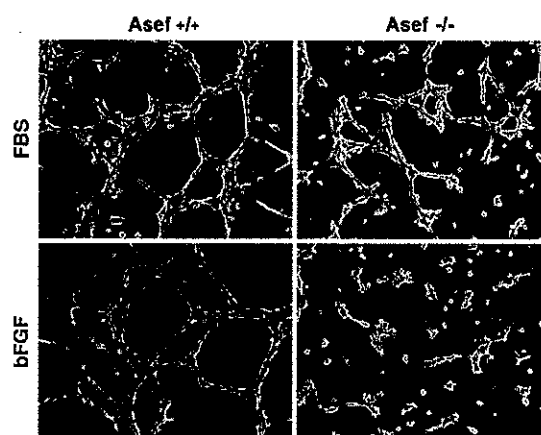


Fig.1 Asef のチューブ形成能

微小血管の形成に必要な Asef

Asef が *in vivo* で血管新生に与える影響を調べるために *in vivo* マトリゲルプラグアッセイを行った。bFGF を含むマトリゲルプラグを Asef^{+/+} マウスと Asef^{-/-} マウスの皮下に移植し、5 日後に摘出したところ、Asef の欠損によって、マトリゲルプラグ内に伸長してきた血管が明らかに減少していることを見出した。よって Asef は増殖因子に誘導される微小血管の伸長に重要であることが示唆された。

腫瘍組織への血管新生と Asef

血管新生は腫瘍の増殖や転移過程で重要な役割を果たしている。Asef が腫瘍の血管新生に影響を与えるか調べる為に B16 メラノーマ細胞を Asef^{+/+} と Asef^{-/-} マウスの皮下に移植し、腫瘍の増殖速度を検討したところ、Asef^{+/+} マウスに移植した腫瘍に比べ、Asef^{-/-} マウスに移植した腫瘍の増殖は顕著な遅延を示したのに加え、腫瘍組織への血管の伸長にも明らかな減少が見られた。

【結論】

本研究により、Asef/APC は bFGF や VEGF の下流因子として機能し、血管の形

成に重要な役割を果たしていることが示された。さらに B16 メラノーマ細胞を用いた移植実験において Asef は癌組織における血管新生にも深く関与していることを明らかにした。

【第二章】

—背景—

APC の変異を介した Adenoma 発生における Asef/Asef2 の重要性を明らかにする為、APC^{Min/+} マウス (APC 遺伝子に変異があるヒト大腸癌モデルマウス) と Asef^{+/-}/Asef2^{+/-} マウスを交配したところ、Asef/Asef2 の欠損によって腸管に発生するポリープの数や大きさが激減することが明らかとなった (Fig2)。また、ヒト大腸癌検体では正常な組織に比べ Asef/Asef2 の発現が顕著に亢進している事も見出した。従って、Asef/Asef2 の発現亢進は細胞の癌化に重要であると考えられた。そこで本研究では、大腸癌発生の初期に働く因子を捉えるため、Asef の上流で働く因子を同定し、APC/Asef を介した大腸癌変異機構の全体像を解明することを目指した。

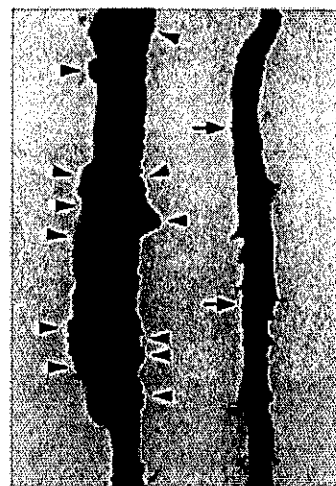


Fig.2

(右)APC^{Min/+}マウス, (左) APC^{Min/+}/Asef^{-/-}/Asef2^{-/-}マウス
矢頭は大きなポリープを、矢印は小さなポリープを示す

—結果—

Notch シグナルによる Asef の発現制御

Asef のプロモーターに結合する転写因子を推測し (転写因子結合予測サイトプログラム P-MATCH を使用) 得られた候補転写因子の中で shRNA を用いた発現抑制によって Asef の発現が変動するものを選別したところ、Notch 経路の一般的転写因子である CSL が Asef の発現制御候補因子として得られた。更に、Asef プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイや ChIP アッセイにより CSL が Asef の発現を直接制御し上流因子として働いていることを見出した。

Notch-APC/Asef 経路の制御機構の解析

Notch ファミリーの中で Notch3 だけが大多数の大腸癌症例で発現亢進していることを見出した。その為、Notch3/Asef 経路を制御する因子を捉える為、大腸癌細胞における Notch3 の発現亢進メカニズムの解析を行った。Notch の発現上昇機構として miRNA との関連が示唆されていたため、本研究においても miRNA による制御を検証した。Notch3 の 3' untranslated region (UTR) には脊椎動物間で高度に保存された miR-1/206 の認識する配列が存在し、miR-1 だけが正常組織と比較して大腸

癌組織で発現が有意に減少していた。そこで大腸癌細胞株 DLD-1 に miR-1 を強制発現し、Notch3 と Asef への影響を確認したところタンパク質、mRNA レベルで発現抑制が見られた。さらに、Notch3 の 3'UTR を用いたルシフェラーゼアッセイの結果から、miR-1 は Notch3 の発現を直接制御し、Notch3/Asef の上流因子として働いていることが示唆された。

miR-1-Notch3-Asef経路による癌細胞の運動制御

DLD-1においてNotch3の活性化型N3ICDを強制発現すると、細胞の運動能は亢進するが、Asefの発現を抑制するとN3ICDを強制発現しても細胞の運動能亢進は全く確認されなかった。また、DLD-1にmiR-1を強制発現すると細胞運動が顕著に減少するが、N3ICDまたはAsefの強制発現をすることで細胞の運動能は回復できたことから、miR-1-Notch3-Asef経路の存在と、本経路が癌細胞の運動能に重要であることが示唆された。

微小環境との相互作用による癌の転移・浸潤能の促進

癌細胞は自らの生存のために、周辺的环境から血管を新生し、栄養を取り込んだり、転移の足場に利用する。癌組織ではほとんどの血管がDelta-like-4 (DLL4) を発現していることが明らかにされている。従って、腫瘍組織に接触している血管内皮細胞が提示するDLL4によって癌細胞のNotch3/Asef経路の活性化が起こっており、その活性化によって癌細胞の血管への侵入や転移が起こるのではないかと考えることができる。そこで、Transendothelial migration assayを行い、この可能性を検証した。単層培養したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の上にmiR-1を強制発現したDLD-1細胞を播種するとHUVEC下層への移動が抑制されたが、N3ICDまたはAsefの強制発現をすると細胞の運動能は回復した。また、HUVECのDLL4の発現を抑制した場合もDLD-1のHUVEC下層への移動が阻害された。

【結果】

本研究により、大腸癌ではmiR-1の発現減少がNotch3の発現亢進を引き起こし、更にAsefの発現亢進を招いていることが明らかになった。また、腫瘍内に進入してきた血管内皮細胞が提示するNotchリガンドDLL4による腫瘍内でのNotch3/Asef経路の活性化が、腫瘍細胞の転移・浸潤能の獲得に重要であることが明らかになったことから、miR-1-Notch3-Asef経路をターゲットとした創薬が、大腸癌の治療の有望な手段となるのではないかと考えられる。