

がん産生プロテアーゼ kallikrein 11 の生理的機能解明

2006年3月修了 先端生命科学専攻 46533 佐野厚美 (指導教官 落合淳志教授)

keyword: kallikrein 11, *KLK11*, hK11, IGF, IGFBP-3, protease, proteolysis, breast cancer,

【序論】

がんの発生率が世界的に増加している中で、近年の分子生物学や分子腫瘍学の急速な進歩によりがんの発生・増殖・進展に関わる因子が徐々に判明してきた。ペプチドの加水分解を行うプロテアーゼ(タンパク質分解酵素)も重要と考えられる因子の1つである。

Tissue kallikrein 11(遺伝子名 *KLK11*; タンパク名 hK11)は分泌型トリプシン様セリンプロテアーゼであり、ステロイドホルモンによって発現が調節される。正常では多くの組織で発現していることが確認されており、乳がんを含めたいくつかの腫瘍においても発現が認められているが、胃がんにおける *KLK11* 遺伝子の発現については未だに報告がない。また、前立腺がん及び卵巣がん腫瘍マーカーになりうる分子としてその発現と予後との関わりが注目されているが、hK11 の酵素としての機能に関する報告はほぼ皆無であり、その基質や組織における機能は未だに明らかにされていない。

そこで本研究では、ヒトがん細胞株における *KLK11* の発現の確認、ヒト胃がん同所移植マウスを用いた *KLK11* の機能検討、hK11 の基質の同定、ヒト乳がん組織における *KLK11* の発現の確認を通して、エストロゲンによって発現調節を受けるプロテアーゼ hK11 の生理的機能の解明を試みた。

【結果】

ヒトがん細胞株における *KLK11* mRNA の発現

21種のヒトがん細胞株を用いて *KLK11* の発現を定量 PCR により確認したところ、乳がん、胃がん、膵がん、大腸がんの一部に発現が認められた。乳がんではエストロゲンレセプター(ER)陽性の細胞株のみに *KLK11* が発現し、胃がんでは高分化型胃がん由来細胞株には *KLK11* は発現せず、低分化型胃がん由来細胞株6株中4株に発現していることが示された。また、この *KLK11* を発現する低分化型胃がん細胞株4株は全てスキルス胃がん由来細胞株であった。

胃がんにおける検討

スキルス胃がん由来細胞株に *KLK11* が高発現していたことから、低分化で間質の高度な線維化を伴う予後の悪い胃がん形成への *KLK11* の関与が示唆された。その確認のため、胃がん細胞株8株を用いて同所移植マウスモデルを作製し、その腫瘍組織における密な間質組織量で組織線維化の評価を行った。結果、マウスモデルで線維化像を呈したのは2株の細胞株による腫瘍であり、それらは *KLK11* を発現するスキルス胃がん由来細胞株と発現しないスキルス胃がん由来細胞株による腫瘍各1株ずつであった。よって、*KLK11* の発現量と同所移植マウスモデルにおける線維化、および細胞株の由来する組織型は相関しないことが示された。

次に、胃がんの増殖ならびに間質の線維化に重要な役割を果たす transforming growth factor- β (TGF- β)の活性化と hK11 の関係について調べた。TGF- β は latency-associated peptide(LAP)を伴った潜在型(latent form)として細胞外に分泌されるため、LAP に対する hK11 の分解能を検討した。しかし、潜在型 TGF- β を用いた Western blot による検討では hK11 が LAP を直接基質としては分解せず、TGF- β を活性化しないことが判明した。

乳がんにおける検討

細胞株における *KLK11* 発現検討により乳がん細胞で ER と *KLK11* の発現に関連性が見出されたため、ER 陽性の乳がん細胞株2株を用いてステロイドホルモンにより刺激を行い、エストロゲンによって *KLK11* の発現が増加することを確認した。

次に、乳がんを代表とする多くのがんで腫瘍の増殖・浸潤・転移に働く insulin-like growth factors(IGFs) シグナルとの関わりを調べた。多くの場合、IGFs は IGF binding proteins(IGFBPs)と共に産生され、IGFBPs

と結合することでその作用が阻害されるため、生体における IGFs の利用にはプロテアーゼによる IGFBNs の分解が重要になる。そこで、IGFBP-1~6 の6種全ての IGFBNs に対する hK11 の分解能を調べたところ、IGFBP-1, -2, -3, -5 では IGFBNs の分解断片が、IGFBP-4, -6 では元の IGFBNs の減少がわずかに見られ、hK11 は IGFBNs 全てを基質とする可能性が示唆された。

今回の研究では血中を最も多く流れ、IGFs

との結合能が最も高い IGFBN-3 に焦点を絞って詳細な検討を行った。その結果、hK11 は IGFBN-3 を分解し、その反応はセリンプロテアーゼ阻害剤によって阻害されることが確認された(Fig.1)。また、hK11 により反応時間依存的に IGFBN-3 が分解されることを示した。

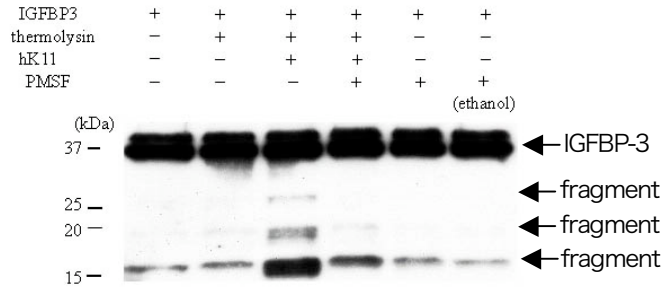


Fig.1 hK11 による IGFBN-3 分解確認

ヒト乳がん手術材料における検討

ヒト乳がん 27 症例の腫瘍部および非腫瘍部の mRNA を用いて *KLK11* の発現を定量 PCR により検討し、その結果を用いて解析を行ったが、腫瘍部と非腫瘍部の比較では *KLK11* の発現に有意差は認められなかった。*KLK11* 発現と臨床病理像における検討を行ったところ、組織異型度において *KLK11* が Grade III と比較して Grade I/II の乳がんにおいて有意に高く発現していることが判明したが、その他の乳がん予後因子(ER+)(-)、PgR+)(-)、閉経前後、等)との間に有意な相関は認められなかった。

【考察】

本研究では、各種ヒト乳がん細胞株で *KLK11* が発現しており、特に間質の線維化を伴うスキルス胃がん由来の低分化胃がん細胞株、並びに ER 陽性の乳がん細胞株に高発現していることを示した。また、hK11 は IGFBNs を分解し、がん周囲の IGFs の活性化に寄与する可能性があることを示した。IGFBP-3 が hK11 の基質になることはがんにおける hK11 の生理学的意義についての初めての報告である。

今後の課題としては、低分化型胃がんにおける *KLK11* の生理的意義の検討、乳がん細胞における hK11 の IGFBN-3 以外の IGFBNs に対する分解能の詳細な検討、hK11 による IGFBNs の分解によるがん細胞内 IGF シグナルの伝達確認、分子生物学的手法による酵素としての hK11 の切断配列・切断条件等の検討、*KLK11* knockout または overexpression による細胞の変化の確認、*KLK11* 発現とヒト乳がん組織における症例数を増やした再検討などが挙げられる。

IGFs はさまざまな組織で発現するが、乳がんにおいては IGF シグナルとエストロゲンとのクロストークが存在することが明らかになっている。エストロゲンは ER を介して IGF-I、IGF-II、IGF type I receptor(IGF-IR) の発現を上昇させ、IGFBP-3 の発現を減少させることで、伝達される IGF シグナルを増加させる。また、IGF シグナルは ER の発現を亢進する。今回 IGFBN-3 を分解することが新規に判明した hK11 はエストロゲンによって発現が亢進されるプロテアーゼであることを確認した。これらの事実を考え合わせると、乳がんにおいては IGF シグナル・エストロゲン・hK11 が相互作用してがん細胞の生存に寄与すると考えられる(Fig.2)。

ホルモン依存性腫瘍において、ホルモン依存性プロテアーゼが成長因子のシグナルを抑制タンパクの分解を通して調節するという機構は今までに知られていない事象であり大変興味深い。

本研究が示すホルモン依存性プロテアーゼによる IGF シグナルの新規利用法が腫瘍と IGF との関わりの一端を明らかにし、これが将来的に新しい治療に結びつくことが期待される。

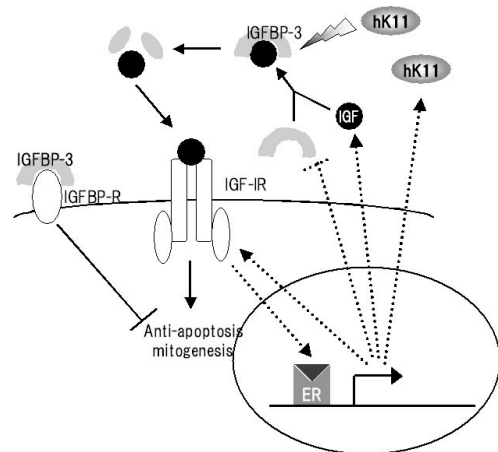


Fig.2 乳がんにおいて予想される IGF シグナル・エストロゲン・hK11 クロストーク概略図