EphA2 up-regulation induced by deoxycholic acid in human colon carcinoma cells, an involvement of extracellular signal-regulated kinase and p53-independence

著者	李 忠佑
雑誌名	浜松医科大学学報. 学位授与記録
巻	21
ページ	31-33
発行年	2004-03-23
URL	http://hdl.handle.net/10271/1265

doi: 10.1007/s00432-003-0493-z

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 4 1 2 号	学位授与年月日	平成 1 6 年 3 月 2 3 日
氏 名	李 忠 佑		
論文題目	<p>EphA2 up-regulation induced by deoxycholic acid in human colon carcinoma cells, an involvement of extracellular signal-regulated kinase and p53-independence (デオキシコール酸によるヒト大腸癌細胞における EphA2 受容体の発現誘導、細胞外シグナル制御キナーゼの関与と p53-非依存性)</p>		

論文題目

EphA2 up-regulation induced by deoxycholic acid in human colon carcinoma cells, an involvement of extracellular signal-regulated kinase and p53-independence

(デオキシコール酸によるヒト大腸癌細胞における EphA2 受容体の発現誘導、細胞外シグナル制御キナーゼの関与と p53-非依存性)

論文の内容の要旨

【はじめに】

受容体型チロシンキナーゼ中で、Eph 受容体は、最大のファミリーを構成する。現在 14 種類のメンバーがあり、神経系のネットワーク形成など多くの重要な役割が知られている。近年このメンバーの種々の悪性腫瘍における発現の変化が報告されつつある。また、発癌過程における種々の生物学的役割も示唆されている。今回は、同ファミリーの中で上皮に発現しており、最近、乳癌、前立腺癌、肺癌、食道癌と大腸癌になどで高発現が報告され、癌の進展や腫瘍血管の形成にかかわると想像されている EphA2 について、その発現制御を検討した。EphA2 発現と活性の制御は、癌細胞における Eph の病理学的意義という点からも重要な事と考えられるが、その制御因子については、未知のことが多い。我々は、癌遺伝子 c-Cbl による EphA2 活性の負の制御を示した(Wang Y. et al, BBRC, 2002)が、これまで、EphA2 発現の正の制御についてはほとんど報告がない。

本研究は、デオキシコール酸が EphA2 の発現を誘導するという現象を発見したものであり、その機構について解析をすすめたものである。特に、細胞外シグナル制御キナーゼの関与について *in vitro* の検討を加えた。

【材料ならびに方法】

ヒト大腸癌由来細胞株は 10%FBS を加えたそれぞれ推奨されている最適な培養基 McCoy's 5A、DMEM 及び L-15 で 5% CO₂、37℃で培養した。使用したプラスミドは、dominant negative (DN) プラスミドとして 19-11-pCR-bluntII-TOPO-erk2^{T188A/Y190F} と pCMV5-erk^{2K52R}、野生型プラスミドとして pCEP4-MEK2 である。EphA2 の cDNA は発現ベクター pAlterMax へ、サブクローニングした。これらを上記の大腸癌細胞へ導入した。細胞を 6cm ディッシュ内に 85~90% confluency まで増殖させ、DCA や種々の特異的阻害剤などを添加した。予定の時間後、細胞を収集し、細胞の EphA2 の発現量は、蛋白レベルを western blotting で、mRNA レベルを半定量 RT-PCR と northern blot で検出した。

【結果】

1. 細胞株 HCT116(p53 正常株)では、DCA の添加により、DCA の濃度依存性に又処理時間依存性に、EphA2 蛋白と mRNA の発現量が増加した。
2. 同様に、大腸癌細胞株 DLD-1 と SW620(p53 変異株)と HCT116 p53(-/-)(p53 欠損株)でも、EphA2 蛋白の発現量は増加した。そのときには、p53 蛋白量は前 2 者で減少した。proteasome 阻害剤 MG132 は、DCA による EphA2 の増加を部分的に阻害した。
3. 細胞外シグナル制御キナーゼの特異阻害剤 PD98059 と U0126 は、DCA で誘導される erk キナーゼ活性、EphA2 蛋白、mRNA の発現量の増加をいずれも部分的に抑制した。

一方 p38 と SAPK/JNK キナーゼの阻害剤は、EphA2 発現誘導抑制作用はなかった。細胞に erk-MAPK の DN-プラスミドを導入すると、DCA による erk キナーゼ活性、EphA2 蛋白の発現量の増加作用が抑制された。

4. EGF 受容体特異的阻害剤 PD168393, AG1478 及び PI-3 キナーゼ特異的阻害剤 wortmannin, LY294002 も、DCA で誘導される細胞外シグナル制御キナーゼ活性上昇と EphA2 蛋白発現量の増加を部分的におさえた。

〔考察〕

DCA は大腸癌のプロモーターとして知られ、残胃癌などの要因の一つとも推測されている。最近の研究によって、DCA が種々の癌遺伝子と細胞増殖に関連する遺伝子の発現を誘導することが報告されているが、この現象と細胞膜直下のシグナル伝達経路とのかかわりはまだ詳細に検討されていない。

本研究は、DCA による癌蛋白 EphA2 の過剰発現を初めて示す、いくつかの阻害実験で、関与する機構の一部を明らかにすることができた。つまり p38 と SAPK/JNKMAP キナーゼが少なくとも部分的には関与すること、erk-MAP キナーゼや、EGF 受容体や、PI-3 キナーゼとの関連もあることが示された。従来、EphA2 遺伝子のプロモーター領域の中には、p53 反応配列(response element)があり、camptothecin(CPT)による正の制御の場合に p53 依存性であることが知られている(Dohn M. et al, Oncogene, 2001)。今回、我々の見出した DCA による EphA2 の正の制御は p53 ノックアウト HCT116 でもおこることから、p53 非依存性であり、CPT の場合とは対照的である。

EphA2 の腫瘍における多彩な効果を考えると、この遺伝子が生体内にある胆汁酸成分で誘導されることは興味深い。どのような転写因子が DCA の EphA2 誘導に関連するか、今後興味をもたれる。この研究結果は、大腸癌を発生過程中的 DCA と EphA2 の新しい役割を示唆するものである。

〔結論〕

デオキシコール酸はヒト大腸癌細胞で EphA2 の発現を誘導し、その機構には、細胞外シグナル制御キナーゼが関与し、p53 非依存性である。

論文審査の結果の要旨

Eph 受容体は、受容体型チロシンキナーゼのうち最大のファミリーを構成する。現在 14 種類のメンバーがあり、神経系のネットワーク形成など多くの重要な役割が知られている。近年このメンバーが悪性腫瘍において高発現が報告されたり、発癌過程において役割をしているという示唆もある。申請者は、上皮に発現しており、乳癌、前立腺癌、肺癌、食道癌、大腸癌などに高発現が報告され、癌の進展や腫瘍血管の形成に関わると推定される EphA2 について、その発現制御を検討している。EphA2 発現と活性の制御は、癌細胞における病理学的意義という点からも重要なことと考えられるが、その制御因子についてはあまり知られていない。

胆汁酸の発癌作用に注目し、申請者は deoxycholic acid(DCA)という胆汁酸の主成分が EphA2 の発現を増加することを発見し、さらに DCA が EphA2 を増加させる分子機構についても検討をしている。

ヒト大腸癌細胞株 HCT116(p53 正常株)に DCA, Urso-DCA, Chen-DCA などを培養液に添加し、EphA2 蛋白の量をウェスタンブロッティングにより定量したところ、DCA は著明

に増加、Urso-DCA は少し増加、Cheno-DCA は変化がないことが判明した。そこで、以後の実験では DCA を用いて実験を行った。まず、DCA の濃度を変えて添加したところ、EphA2 蛋白が濃度依存性に増加した。また、経時的に観察したところ、EphA2 蛋白は添加後 12 時間をピークに増加し、24 時間では少し減少した。また、DCA 処理した細胞からの RNA を用いたノーザンブロットあるいは半定量的 RT-PCR で解析しても同じく濃度依存的に、時間依存的に EphA2 mRNA が増加することを示した。しかし、EphB4, EphrinA1, EphrinA4 などは DCA により mRNA が増減することはない。

以前に、comptotheclin による EphA2 の増加は p53 依存的であることが知られていたの
で、p53 変異を持つ細胞株 DLD-1, SW620, HT-29 でも DCA による EphA2 の増加が起こ
るかどうかを検討した結果、HCT116 細胞と同様に EphA2 の増加が認められた。また、p53
欠損株である HCT116 p53(-/-)でも DCA による増加が認められたことから、DCA による
EphA2 増加には p53 は必要ないことが判明した。

次に、DCA の作用機構に関する検討を行った。HCT116 細胞において、DCA は erk1/2 や p38 の MAP キナーゼを活性化することが知られていた¹⁾ので、DCA 処理後の HCT116 細胞における erk1/2 の活性化と EphA2 増加との関係を観察した。

erk1/2 の活性化は 1 時間から見られ 4 時間でピークに達した。DCA による erk1/2 の活性化は p53 の変異株でも p53 欠失株でも同じく認められた。つまり、DCA による erk1/2 の活性化が先におこり、その後 EphA2 の増加が後に続くという関係であることが明らかになった。どの MAP キナーゼが関与しているかを知るために、MEK/ERK キナーゼの阻害剤 U0126 と PD98059、p38 キナーゼの阻害剤 SB202190、JNK の阻害剤である JNKI-1 を前処理して、DCA による EphA2 増加を見たところ、PD98059 と U0126 により EphA2 増加が抑制されたが、SB202190 や JNKI-1 では EphA2 増加が抑制されなかった。さらに、ドミナントネガティブの erk2 変異体の遺伝子導入により DCA による EphA2 増加が抑制された。さらに、EGF 受容体特異的阻害剤 PD168393 や AG1478、PI3 キナーゼ阻害剤 wortmannin や LY294002 が DCA による EphA2 増加を部分的に抑制することを示した。

本審査委員会では、DCAにより EphA2 mRNA 及び蛋白質が増加することを発見し、このことが p53 非依存的に起こり、erk-MAP キナーゼ経路や部分的ではあるが EGF 受容体や PI3 キナーゼを介する経路にも関わっていることを示したことを高く評価した。

審査の過程において、申請者に次のような質問がなされた。

- 1) Eph と Ephrin の構造的特徴は何か
- 2) p53 変異株では p53 蛋白量が増加している理由は
- 3) mRNA の測定法は
- 4) Ras/Raf の関与について
- 5) DCA と FXR の関係は
- 6) この実験系における DCA の作用部位は
- 7) 胃癌細胞でも EphA2 は増加するか
- 8) 24 時間後に減少するのはなぜか

これらに対し、申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 三 浦 直 行
副査 前 川 真 人 副査 梶 村 昌 良