

学 位 論 文 題 名

肝細胞増殖因子（HGF）刺激における
口腔扁平上皮がんの浸潤性におよぼす
ets がん遺伝子群転写因子 E1AF の役割

学位論文内容の要旨

c-metは骨肉腫細胞から分離されたがん遺伝子で、その遺伝子産物c-METは50kDの α 鎖と145kDの β 鎖からなる190kDの膜貫通型のチロシンキナーゼ型受容体である。そのリガンドとなる肝細胞増殖因子（Hepatocyte growth factor: HGF）が結合することによって c-MET の細胞内ドメインのリン酸化が生じ、これにより種々の正常細胞での生物学的反応が誘導されることや、HGF刺激によりc-METをもつがん細胞の浸潤・転移が増強することが報告されている。

浸潤・転移は悪性腫瘍の特徴的な性質で、癌細胞が周囲の正常組織に浸潤していくためには、細胞接着の低下、運動性の亢進による原発巣からの離脱とともに、細胞外基質分解酵素による腫瘍をとりまく周囲組織や基底膜の破壊が重要である。細胞外基質分解酵素にはマトリックスメタロプロテアーゼ、やウロキナーゼタイププラスミノゲンアクチベーター、カテプシンなどが知られており、これらは浸潤性の癌で強発現していることが報告されている。このうちマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）は、現在までに16種類の分子種が報告され、一次構造と基質特異性の違いから5群に分類されている遺伝子ファミリーで、MMPの産生レベルとがん細胞の浸潤能が深く関連していることや、非転移性の細胞にMMP-9の遺伝子導入を行うことによって転移能を獲得すること、MMP-3のantisense 発現ベクターの導入によりin vitroでの浸潤活性の減少が生じることなどから、MMPとがん細胞の浸潤転移との関連が示唆されている。MMP遺伝子のプロモーター領域には数個の *ets* 結合モチーフが存在し、*ets* がん遺伝子群転写因子がMMP遺伝子の発現に重要な役割を演じていることが推測される。

ets がん遺伝子ファミリーはトリ赤芽球症レトロウイルスE26から最初に発見されたv-*ets* に対するプロトがん遺伝子で、現在、ヒトを含む種々の生物種から30種以上の遺伝子が分離されている。*ets* ファミリーに属する遺伝子産物は約85個のアミノ酸よりなるETSドメインをもち、ETSドメインはファミリー間で高いホモロジーを有している。このETSドメインを介して遺伝子産物が転写調節領域に結合し、多くの場合、遺伝子の転写を活性化する転写因子として働き、細胞の腫瘍化との関連も報告されている。

E1AFはアデノウイルスのがん遺伝子であるE1A遺伝子のプロモーター領域に結合するヒト細胞の転写因子として分離同定された。そのcDNAの塩基配列を基にしたアミノ酸配列の解析により、E1AFはカルボキシル末端側にETSドメインをもつ*ets* ファミリーの転写因子であることが明らかになった。HigashinoらはE1AFが複数のMMP遺伝子の転写を亢進することを示し、Kayaらは非浸潤性の乳癌細胞株にE1AFの発現プラスミドを導入することでMMP-9の産生が増加し浸潤形質を獲得することを明らかにした。また、Hidaらは、E1AFを発現し浸潤性に増殖する口腔扁平上皮がん細胞株HSC3細胞に、antisense E1AF発現ベクターを導入すること

によって浸潤活性の減少がみられたと述べている。さらに半沢は、c-METを強く発現している HSC3 を HGF で刺激すると E1AF と MMPs に関連した発現の亢進がみられることを報告し、HGF/c-MET シグナル伝達系における E1AF の関与を示唆しているが、HGF/c-met がもたらすがん細胞の浸潤転移の増強に関わる因子の詳細は今だに不明瞭な点が多い。

今回の検索は HGF/c-Met シグナル伝達系における E1AF の役割の詳細を知ることを目的にいった。Ca9.22 は口腔扁平上皮がん由来の細胞株で、E1AF と MMP の発現が低く、ヌードマウスに移植した際も、膨張性に増殖する細胞であることが明らかにされている。また、c-MET の発現も低いことを抗 c-MET 抗体を用いた Western blotting 法で確認している。HSC3 も口腔扁平上皮がん由来の細胞株であるが、E1AF、MMP、c-MET を強く発現している細胞株で、浸潤性増殖を示すことが報告されており、これらの遺伝子/遺伝子産物を対照として用いた。

まず c-met 発現プラスミド pRS2 を Lipofectamine (GibcoBRL) を用い、Ca9.22 に遺伝子導入した。導入 48 時間後からネオマイシン (G418) によるセレクションを行い、約 3 週間後に G418 耐性コロニーをクローニングし、これらを c-met 発現 Ca9.22 (met9.22) とした。

met9.22 は、HGF 刺激により MMP-1、MMP-9 を強く産生することがそれぞれの抗体を用いた Western blotting 法、免疫染色法で示され、また細胞生物学的にも浸潤活性をもつことが Invasion assay 法で明らかになった。この際、関連した E1AF mRNA の転写亢進が Northern blotting 法で認められ、このような所見から HGF/c-MET による細胞の浸潤活性の増強の際には、E1AF の転写亢進による MMP 産生の増大が関与していることが強く示唆された。

さらに、E1AF の働きを直接的に検索する目的で met9.22 に antisense E1AF 発現ベクター pZeoSV2ASE1AF を met9.22 に遺伝子導入し、ゼオシンを用いた遺伝子導入細胞のクローニングを行い、c-met と antisense E1AF を共発現する Ca9.22 細胞 (met9.22 AS) を得た。

E1AF の antisense 発現ベクター pZeoSV2ASE1AF は、E1AF に特異的なグルタミンリッチドメインを中心とした n.n.400-761 の 362bp の E1AF cDNA 断片をゼオシン耐性遺伝子を持つ発現ベクター pZeoSV2 (Invitrogen) に逆向きの配列方向に組み込むことにより作製した。antisense E1AF 発現ベクターを導入し、E1AF タンパクの産生を阻害した met9.22 AS 細胞では、HGF の刺激によっても MMP の産生亢進、浸潤活性の増強、関連した E1AF mRNA の転写亢進は認められず、母細胞の Ca9.22 と同様の性状を示していた。この結果は、E1AF は HGF/c-MET のシグナル伝達系の下流に位置しているが、antisense E1AF 発現ベクターの導入により E1AF のタンパクへの翻訳が阻害され、本来起こるべき E1AF による MMP の転写の亢進が低下させられたことによるものであると考えられる。

このような実験結果は転写因子 E1AF が HGF/c-MET シグナル伝達系の下流に位置し、HGF によるがん細胞の浸潤に深く関与していることを強く示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則
副 査 教 授 向 後 隆 男
副 査 教 授 渡 邊 継 男
副 査 助 教 授 進 藤 正 信

学 位 論 文 題 名

肝細胞増殖因子 (HGF) 刺激における 口腔扁平上皮がんの浸潤性におよぼす *ets* がん遺伝子群転写因子 E1AF の役割

審査は、戸塚、向後、進藤各審査員出席の下で、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。渡邊審査員は、個別に審査を行った。審査論文の概要は、以下の通りである。

悪性腫瘍が浸潤・転移を生じるためには、細胞接着の低下や運動性の亢進による原発巣からの離脱とともに、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 等の細胞外基質分解酵素による周囲組織や基底膜の破壊が不可欠である。c-MET は膜貫通型のチロシンキナーゼ型受容体で、肝細胞増殖因子 (HGF) の結合により、c-MET の細胞内ドメインにリン酸化を生じ、これにより正常細胞における様々な生物学的反応が誘導され、またがん細胞においては浸潤・転移能が増強すると考えられている。最近、c-MET を強く発現しているがん細胞を HGF で刺激すると、MMPs 産生の亢進とともに、それに相関して *ets* がん遺伝子群の転写因子の 1 つである E1AF 発現の亢進がみられることが報告され、HGF/c-MET シグナル伝達系における E1AF の関与が示唆されているが、その詳細については未だ不明な点が多い。

本研究は、がん細胞の HGF/c-MET シグナル伝達系における E1AF の役割を明らかにすることを目的に行われた。

【実験細胞及び実験方法】

ヒト口腔扁平上皮がん由来細胞株 Ca9.22 を用い、*c-met* 及び anti-sense E1AF 発現ベクターの遺伝子導入を行った。また、c-MET 高発現細胞株であるヒト口腔扁平上皮がん由来細胞株 HSC3 を陽性対照として用いた。

c-met 発現プラスミド pRS2 を Lipofectoamine を用いて、Ca9.22 に遺伝子導入した。導入48時間後からネオマイシンによるセレクションを行い、約3週間後に G418 耐性コロニーをクローニングし、*c-met* 発現 Ca9.22 細胞 (met9.22) を得た。次に、E1AF に特異的なグルタミンリッチドメインを中心とした 362bp の E1AF cDNA 断片をゼオシン耐性遺伝子を持つ発現ベクター pZeoSV2 に逆向きの配列方向に組み込み、E1AF の antisense 発現ベクター pZeoSV2ASE1AF を作製した。この

ベクターを met9.22 に遺伝子導入し、ゼオシンを用いた遺伝子導入細胞のクローニングを行い、*c-met* と antisense E1AF を共発現する Ca9.22 細胞 (met9.22AS) を得た。

Ca9.22, met9.22, met9.22AS と HSC3 を 10%FBS 添加 DMEM で培養し、通法に従って処理した後、c-MET の発現を Western blot 法で検索した。次に、Ca9.22, met9.22, met9.22AS, HSC3 を HGF で 6 時間処理し、HGF 未処理ならびに HGF 処理 Ca9.22, met9.22, met9.22AS, HSC3 各々について、E1AF mRNA, E1AF antisense RNA の発現を Northern blotting 法で、MMP-1, MMP-9 の発現を Western blotting 法ならびに免疫染色法、また細胞生物学的浸潤活性を *in vitro* invasion assay で検索した。

【実験結果】

母細胞の Ca9.22 では c-MET 発現は軽度であったが、met9.22, met9.22AS 及び HSC3 では明らかな発現が認められた。

HGF 未処理の Ca9.22 では E1AF mRNA の発現は軽度であったが、met9.22, HSC3 では E1AF mRNA が、また met9.22AS では 2 つの異なったクローンのいずれにおいても、E1AF mRNA と E1AF antisense RNA が認められた。HGF 処理により、HSC3 と met9.22 では E1AF mRNA の著しい発現増強がみられたが、met9.22AS では増強は認められなかった。

Ca9.22 では MMP-1, MMP-9 の発現はほとんど認められず、HGF 刺激による発現亢進もみられなかった。met9.22 と HSC3 では、HGF 非刺激時にも MMP-1, MMP-9 の発現がみられ、HGF 刺激により MMP-1, MMP-9 タンパクの発現は著しく亢進した。これに対して、met9.22AS では HGF 非刺激時にも軽度の発現がみられたものの、HGF 刺激による発現亢進は認められなかった。免疫染色の結果も同様に、HSC3, met9.22 では細胞質に MMP-1, MMP-9 陽性所見が得られたが、Ca9.22, met9.22AS では HGF 非刺激時、刺激時とも明らかな陽性所見は認められなかった。

invasion assay において浸潤細胞数は、met9.22 と HSC3 では HGF 刺激により、それぞれ約 4 倍の浸潤活性の増強がみられたが、Ca9.22, met9.22AS では HGF による活性の増強はほとんど認められなかった。

このように、met9.22 は HGF 刺激により MMP-1, MMP-9 を強く産生し、また細胞生物学的にも浸潤活性が増強した。この際、関連した E1AF mRNA の転写亢進が認められ、HGF/c-MET シグナル伝達系によるがん細胞の浸潤活性の増強の際には、E1AF の転写亢進による MMP 産生の増大が関与していることが示された。一方、met9.22AS では、HGF 刺激を加えた際にも MMP の産生や浸潤活性の増強、ならびに E1AF mRNA の転写亢進が認められず、これは antisense E1AF 発現ベクターの導入により E1AF のタンパクへの翻訳が阻害され、本来起こるべき E1AF による MMP の転写亢進が抑制されたことによるものと考えられた。

このような実験結果は、転写因子 E1AF が HGF/c-MET シグナル伝達系の下流に位置し、HGF によるがん細胞の浸潤に深く関与していることを強く示唆している。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、HGF/c-MET によるがん細胞の浸潤形質の発現には、シグナル伝達系の下流に位置する転写因子 E1AF による MMP の転写亢進が深く関与していることを明らかにしたことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。