

学位論文題名

Differential Mechanisms of Constitutive Akt/PKB Activation and Its Influence on Gene Expression in Pancreatic Cancer Cells

(膵癌細胞株における Akt/PKB の恒常的活性化の様々な要因と
遺伝子発現に対する影響)

学位論文内容の要旨

目的

膵癌においてK-Ras変異は80-100%に認められ、Ras下流情報伝達路のうちAkt/PKBはアポトーシスや細胞増殖に関与し癌化の重要な要因と考えられている。これまでのところAkt活性化の主要な要因はPTEN機能の欠失とRasの活性化と言われている。しかしAkt活性化の要因としてこれらの一方のみが必要なのか、双方の組み合わせが必要なのか明らかとなっていない。本研究では膵癌細胞株におけるAkt活性化要因を解析し、また、Aktの恒常的活性化が遺伝子発現に対しどのように影響を与えるかを検討した。

材料と方法

細胞：ヒト膵癌細胞7株を用いた。PCI-66, -68, -79は北海道大学分子病理学分野より、KMP-3, -4, -8は京都大学腫瘍外科教室より、PSN-1は国立がんセンター研究所分子腫瘍学部より供与された。MEK、Akt、EGFRのリン酸化のWestern blot 解析：6cm dishにconfluentの培養細胞を0.5% FCSのDMEMで24時間培養し、続いて無血清のDMEMで24時間培養後、Cell Lysis Buffer (New England Biolabs, Beverly, MA)を用いて蛋白質を抽出した。10 μ gの蛋白を7.5-12.5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、poly vinylidene difluoride膜(Millipore, Bedford, MA)に転写した。その後、抗体として抗Akt (S473)、抗リン酸化Akt (S473)、抗MEK1/2、抗リン酸化MEK1/2 (S217/221)はNew England Biolabs社製、抗EGFR、抗リン酸化EGFR (Y1173)はUpstate Biotechnology (Lake Placid, NY)社製を用いてWestern blot 解析を行った。

Akt kinase assay：無血清培地から抽出された蛋白をImmobilized Akt1G1モノクローナル抗体 (New England Biolabs)にて一晚インキュベート後、Akt kinaseの基質としてATPとGSK-3の存在下にkinase assayを行った。GSK-3のリン酸化を抗リン酸化GSK-3a/b (GSK-3a, Ser21; GSK-3b, Ser9) 抗体 (New England Biolabs)を用いWestern blot 解析を行った。

K-RasおよびH-Rasのシークエンス法による解析：細胞株より抽出されたgenomic DNAからK-rasおよびH-ras geneをPCR法にて増幅した。PCR断片はABI 377 automated sequencer (Applied Biosystems, Chiba)を用いて塩基配列が決定された。

p53遺伝子解析：Yeast p53 functional assayおよびシークエンス法により解析した。

PTEN遺伝子解析：PTEN stop codon assayおよびシークエンス法により解析した。

LY294002およびGenisteinによる処理：PCI-66, -68, KMP-3, -4がconfluentとなった後、48時間無血清培地で培養後、LY294002 (PI3K Inhibitor)を添加し40 mMに調整、もしくはGenistein (Tyrosin kinase Inhibitor)を添加し100 mMに調整し8時間、5%CO₂インキュベーター内で37度で培養した。その後、蛋白質を抽出しAktおよびAktリン酸化をWestern blot法にて解析した。

Akt1およびAkt2のシークエンス法による解析：PCI -66, -68のgenomic DNAからAkt1およびAkt2の遺伝子をPCR法にて増幅後、塩基配列が決定された。

DNAアレイ解析：細胞株より全RNAを抽出し、Mag Extractor(Toyobo,Osaka,Japan)を用いて mRNAを回収した。Gene Navigator™ cDNA Array System(Toyobo)を用いて標識cDNAを調整し、GeneticLab (Sapporo) in-house cDNA array filterにハイブリダイズさせ、Imaging High-Chemilumi-Gene Navigator(Toyobo)を用いて測定した。1281の遺伝子発現について解析した。発現data解析：発現プロファイルの解析およびクラスター解析はMATLAB 6.1 (MathWorks, Natick, MA)を用いた。

結果

血清存在下の培地にて全ての細胞株のAktがリン酸化され、血清刺激のない状態でもPCI -66, -68, KMP-3, -4においてAktがリン酸化されていた。また、血清刺激のない状態で同じ4つの細胞株においてAkt kinase activityのあることが認められたがリン酸化Aktの総量とリン酸化GSK-3の程度に明らかな関係はなかった。

全ての細胞株でK-Rasのコードン12に変異を認め、全ての細胞株でH-Rasに変異を認めなかった。無血清培地にて全ての細胞株でMEKがリン酸化されていた。このことから全ての細胞株においてRasが活性化されていることを示している。p53の変異はRasを活性化するといわれているが、KMP-8以外の細胞株で変異を認めた。PTENはKMP-4でフレームシフト変異をおこしKMP-3で正常な PTENの発現がなくpseudo PTENが発現していた。

Aktの恒常的リン酸化を示すPCI -66, -68, KMP-3, -4をLY294002処理するとPCI -66, -68ではAktリン酸化は抑制されず、KMP-3では完全に、KMP-4では部分的にAktリン酸化が抑制された。PCI -66, -68ではAktの恒常的リン酸化とPIP-3の過剰産生とは関係がないことを示している。

無血清培地にて全ての細胞株でEGFRはリン酸化されていなかった。このことは全ての細胞株でEGFRの自己リン酸化はないことを示している。また、PCI -66, -68, KMP-3, -4をGenistein処理するとPCI -66, -68はAktリン酸化は抑制されず、KMP-3, -4ではAktリン酸化が抑制された。

PIP-3がAkt活性化の直接的で唯一同定されている因子であるが、PCI -66, -68では他の要因が考えられる。そこでPCI -66, -68においてAkt1およびAkt2の塩基配列を調べたが変異を認めなかった。

Aktの恒常的リン酸化がmRNAの発現に影響するかを調べるためにcDNAアレイ解析を行った。Aktの恒常的リン酸化を示すPCI -66, -68, KMP-3, -4の群とそうでないPCI-79, KMP-8, PSN-1の群とを比較した結果、11の遺伝子が発現上昇し38の遺伝子が発現低下を示した。PCI -66, -68とKMP-3, -4との間では遺伝子発現に著しい差を認めなかった。

考察

今回の検討からAktの恒常的活性化には少なくとも2つの異なった要因が存在することが明らかになった。一つの要因はKMP-3, -4にみられるPTEN機能の欠失である。全ての細胞株でK-Rasのコードン12に変異を認めRasが活性化されていたが、Aktの恒常的活性化を示したのは4つの細胞株であった。このことはRasの活性化だけではAktの恒常的活性化に十分ではないことを示している。しかし、KMP-3, -4においてRasの下流のPI3KをLY294002にて抑制し、上流をGenisteinにて抑制するとAktのリン酸化が抑制されたことから、これらの細胞ではAktの活性化にはRas-PI3Kを介したシグナルが必要と考えられた。

もう1つの要因はPCI -66, -68で示されたものでこれまでに知られたものではない。すなわちPTENは野性型で機能の欠失はなく、LY294002でもGenisteinにてAktのリン酸化が抑制されず、チロシンキナーゼレセプター/Ras/PI3K/PTEN経路とは全く別の要因の存在を示唆しており、Akt1とAkt2に変異がないことより、LY294002にて抑制されない未知のPIP-3を増加させる因子やPIP-3以外のAktリン酸化因子の存在が考えられる。

DNAアレイ解析ではAktの恒常的リン酸化を示す4群とそうでない3群とを比較し、49の遺伝子で発現に変化を示した。Aktの恒常的リン酸化がAkt下流の遺伝子発現に影響したことが示唆された。

結語

Akt/PKB活性化の要因にはRasの活性化だけでは十分ではなく、PTEN機能の欠失、あるいはPI3Kを介さない未知の要因の存在が重要と考えられた。

DNAアレイ解析によりAktの恒常的リン酸化がAkt下流の遺伝子発現に影響したことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 一 馬

副 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

Differential Mechanisms of Constitutive Akt/PKB Activation and Its Influence on Gene Expression in Pancreatic Cancer Cells

(膵癌細胞株における Akt/PKB の恒常的活性化の様々な要因と
遺伝子発現に対する影響)

膵癌において K-Ras 変異は 80-100%に認められ、Ras 下流情報伝達路のうち Akt/PKB はアポトーシスや細胞増殖に関与し癌化の重要な要因と考えられている。これまでのところ Akt 活性化の主要な要因は PTEN 機能の欠失と Ras の活性化と言われている。しかし Akt 活性化の要因としてこれらの一方のみが必要なのか、双方の組み合わせが必要なのか明らかとなっていない。本研究では膵癌細胞株における Akt 活性化要因を解析し、また、Akt の恒常的活性化が遺伝子発現に対しどのように影響を与えるかを検討した。

細胞：ヒト膵癌細胞 7 株、PCI -66、-68、-79、KMP-3、-4、-8、PSN1 を用いた。

MEK、Akt、EGFR のリン酸化の Western blot 解析：無血清培地下に細胞培養して蛋白質を抽出した。抗 Akt 抗体、抗リン酸化 Akt (S473)抗体、抗 MEK1/2 抗体、抗リン酸化 MEK1/2 (S217/221)抗体、抗 EGFR 抗体、抗リン酸化 EGFR (Y1173)抗体を用いて Western blot 解析を行った。

Akt kinase assay：無血清培地から抽出された蛋白を Immobilized Akt1G1 モノクローナル抗体にて一晩インキュベート後、Akt kinase の基質として ATP と GSK-3 の存在下に kinase assay を行った。抗リン酸化 GSK-3a/b (GSK-3a, Ser21; GSK-3b, Ser9) 抗体を用い Western blot 解析を行った。

K-Ras codon 12,13 および H-Ras codon 12,13,61 の遺伝子変異を塩基配列決定法により解析した。

p53 遺伝子解析：Yeast p53 functional assay および塩基配列決定法により解析した。

PTEN 遺伝子解析：PTEN stop codon assay および塩基配列決定法により解析した。

LY294002 および Genistein による処理：PCI -66、-68、KMP-3、-4 を無血清培地で培養後、LY294002(PI3K Inhibitor)および Genistein(Tyrosin kinase Inhibitor)を添加し Akt リン酸化を Western blot 法にて解析した。

Akt1 および Akt2 の遺伝子変異を塩基配列決定法により解析した。

DNA アレイ解析：細胞株より全 RNA を抽出して mRNA を回収した後、標識 cDNA を調整して GeneticLab (Sapporo) cDNA array filter にハイブリダイズさせることにより 1281 の遺伝子発現について解析した。

発現データ解析：発現プロファイルの解析およびクラスター解析を行った。

結果

血清刺激のない状態でも PCI-66、-68、KMP-3、-4 において Akt がリン酸化されていた。また、血清刺激のない状態と同じ 4 つの細胞株において Akt kinase activity のあることが認められた。

全ての細胞株で K-Ras のコドン 12 に変異を認め、全ての細胞株で H-Ras に変異を認めなかった。無血清培地にて全ての細胞株で MEK がリン酸化されていた。このことから全ての細胞株において Ras が活性化されていることが示された。p53 の変異は KMP-8 以外の細胞株で変異を認めた。PTEN は KMP-4 で変異を認め、KMP-3 で正常な PTEN の発現がなく pseudo PTEN が発現していた。

Akt の恒常的リン酸化を示す PCI-66、-68、KMP-3、-4 を PI3K Inhibitor で処理すると PCI-66、-68 では Akt のリン酸化は抑制されず、KMP-3、KMP-4 で Akt のリン酸化が抑制された。無血清培地にて全ての細胞株で EGFR はリン酸化されていなかった。このことは全ての細胞株で EGFR の自己リン酸化はないことを示している。また、PCI-66、-68、KMP-3、-4 を Tyrosin kinase Inhibitor で処理すると PCI-66、-68 では Akt のリン酸化は抑制されず、KMP-3、-4 では Akt リン酸化が抑制された。

PCI-66、-68 において Akt 自身に変異がないかを Akt1 および Akt2 に関して塩基配列を調べたが変異を認めなかった。

Akt の恒常的リン酸化が mRNA の発現に影響するかを cDNA アレイにて解析した。Akt の恒常的リン酸化を示す PCI-66、-68、KMP-3、-4 の群とそうでない PCI-79、KMP-8、PSN-1 の群とを比較した結果、11 の遺伝子が発現上昇し 38 の遺伝子が発現低下を示した。PCI-66、-68 と KMP-3、-4 との間では遺伝子発現に著しい差を認めなかった。

考察

今回の検討から Akt の恒常的活性化には少なくとも 2 つの異なる要因が存在することが明らかになった。一つの要因は KMP-3、-4 にみられる PTEN 機能の欠失である。全ての細胞株で K-Ras のコドン 12 に変異を認め Ras が活性化されていたが、Akt の恒常的活性化を示したのは 4 つの細胞株であった。このことは Ras の活性化だけでは Akt の恒常的活性化に十分ではないことを示している。しかし、KMP-3、-4 において Ras の下流の PI3K を PI3K Inhibitor にて抑制し、上流を Tyrosin kinase Inhibitor にて抑制すると Akt のリン酸化が抑制されたことから、これらの細胞では Akt の活性化には PTEN 機能の欠失が重要と考えられた。もう 1 つの要因として PCI-66、-68 で示された結果からこれまでに知られていない経路の存在が考えられる。すなわち PTEN の機能は正常で、PI3K Inhibitor でも Tyrosin kinase Inhibitor にても Akt のリン酸化が抑制されず、チロシンキナーゼレセプター/Ras/PI3K/Akt 経路とは別の要因が考えられた。

DNA アレイ解析では Akt の恒常的リン酸化を示す 4 群とそうでない 3 群とを比較し、49 の遺伝子で発現に変化を示した。Akt の恒常的リン酸化が Akt 下流の遺伝子発現に影響したことが示唆された。

結語

Akt/PKB 活性化の要因には Ras の活性化だけではなく、PTEN 機能の欠失、あるいは PI3K を介さない未知の要因の存在が重要と考えられた。

DNA アレイ解析により Akt の恒常的リン酸化が Akt 下流の遺伝子発現に影響したことが示唆された。

口頭発表において守内哲也教授より Akt の恒常的活性化の未知の因子にはどのようなものが考えられるか、PTEN stop codon assay では missense 変異はわからないのではないかと、との質問があった。つづいて加藤紘之教授より膵癌ではどの pathway が関与しているか、大腸癌などと膵癌の悪性度の違いの原因についての質問があった。また田中一馬教授より Akt 活性

化の他癌での重要性、Akt が活性化されていない膵癌での予想されるシグナル伝達路についての質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。

膵癌細胞株における Akt/PKB の恒常的活性化の様々な要因とその下流遺伝子の発現を明らかにした本研究の意義は大きく、審査員一同協議の結果、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者は博士（医学）の学位授与に値するものと判定した。