

学 位 論 文 題 名

E1AF/PEA3 Activates the Rho/Rho-Associated
Kinase Pathway to Increase the Malignancy Potential
of Non-Small Cell Lung Cancer Cells

(E1AF/PEA は Rho/ROCK 系を活性化し、
非小細胞肺癌細胞の悪性形質を増強する)

学位論文内容の要旨

【背景】遊走能・浸潤能および造腫瘍能・転移能は癌細胞の悪性度を特徴づける因子である。我々はこれまでに、Ets 族転写因子に属する E1AF の発現が非小細胞肺癌で高頻度に認められ、遊走能・浸潤能の亢進に関係していることを示してきた。一方、Small GTPase である Rho は Rho-associated kinase (ROCK) の活性化を介してミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化を引き起こし、細胞骨格を制御することで、種々の癌細胞の遊走能・浸潤能に関与することが知られている。

【目的】E1AFによって引き起こされる非小細胞肺癌の悪性形質におけるRho/ROCK系の役割を、非小細胞肺癌のE1AF非発現細胞株VMRC-LCDにE1AF発現ベクターを遺伝子導入したE1AF発現細胞株(E1AF細胞)と空ベクターを導入した細胞(vector細胞)を用いて検討した。すなわち、両細胞株における遊走能・浸潤能および造腫瘍能・転移能と、Rhoの活性との関係を検討し、ROCK阻害剤の遊走能・浸潤能に与える効果を検討した。

【材料と方法】1) 細胞：共著者の吉田が作成し報告済みのE1AF細胞とvector細胞を用いた(Hiroumi et al. Int J Cancer, 93:786-791. 2001)。培養は10%FBS添加RPMI1640を用いた。2) E1AFのウエスタンブロット法：RIPAバッファーで抽出したタンパク質30 μ g をSDS-PAGEにて分離後に、ニトロセルロース膜にトランスファーし、抗E1AFモノクローナル抗体にて反応させた。さらにHPR付加2次抗体と反応させ、Amersham ECL systemを用いて視覚化した。3) Rho Pull-Downアッセイ：3.5 x 10⁵/mlのE1AF細胞とvector細胞をHGF添加・非添加下で24時間培養し、Laemmliバッファーで抽出したタンパク質1.5 mgにRhotekin RBD-agarose beadsを加え、4°Cで45分間攪拌した。洗浄後、beadsに結合したGTP結合型Rhoを溶出し、抗Rhoポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法によって検出した。4) 遊走能・浸潤能アッセイ：トランスウェルチャンバーを用い、遊走能アッセイでは1 x 10⁵個の細胞を上チャンバーに加え24時間培養し、下面に移動した細胞数をカウントした。上チャンバーの下面フィルターには遊走促進因子としてフィブロネクチンをコートした。浸潤能アッセイでは、2 x 10⁵個の細胞を用い、上チャンバーの上面にマトリゲルをコートして同様の実験を行った。さらに、ROCK阻害剤Y27632や、E1AFと相乗的に遊走能・浸潤能を増加させるHepatocyte growth factor (HGF)を加えた条件で検討を加えた。5) 細胞増殖

アッセイ：96穴プレートに 1.0×10^4 個の細胞を撒き、Y27632を添加・非添加下で、1、3 および 5 日間の培養を行った。細胞増殖はMTT法を用いて測定した。6) MLCおよび phosphorylated MLC (pMLC) のウエスタンブロット法：細胞をHGFとY27632の添加・非添加下で24時間培養し、RIPAバッファでタンパク質を抽出、抗MLC抗体と抗pMLC抗体を用いたウエスタンブロット法を行った。7) 造腫瘍能と転移能の検討：ヌードマウスに、 1×10^7 個の腫瘍細胞を経静脈投与、皮下投与、肺内投与し、14日目、28日目、42日目に解剖した。腫瘍の個数、重量を計測した。一部をホルマリン固定、パラフィン包埋し、薄切後にH-E染色を行った。一部はRIPAバッファ中でホモジェナイズしタンパク質を抽出し、MLCとpMLCのウエスタンブロット法を行った。

【結果】1) E1AF細胞におけるE1AFタンパク質の発現をウエスタンブロット法にて確認した。2) E1AF細胞はvector細胞より活性型であるGTP結合型Rhoが豊富で、HGF添加によりその活性は相乗的に増強した。E1AF細胞とvector細胞でtotal Rhoの発現に差はみられなかった。3) 以前の報告と同様、E1AF細胞はvector細胞と比べ、遊走能と浸潤能が増加し、さらにHGF添加により相乗的に増加した。Y27632は濃度依存性に遊走能と浸潤能を抑制したが、特にHGF添加下のE1AF細胞において抑制効果は顕著であった。4) Y27632は遊走能・浸潤能を強く抑制した濃度でも細胞増殖に影響を与えなかった。5) E1AF細胞はvector細胞よりMLCのリン酸化が亢進し、HGF添加によりリン酸化は増強された。このリン酸化はY27632によって強く抑制された。6) E1AF細胞はvector細胞より、ヌードマウスへの皮下移植で高頻度に皮下腫瘍を形成した(6/6 vs. 1/7)。肺内移植でもE1AF細胞は肺腫瘍を高頻度に形成した(4/7 vs. 1/7)。E1AF細胞由来の肺腫瘍を形成した4匹の中で、3匹に縦隔リンパ節への転移を認めた。一方、vector細胞由来の肺腫瘍を形成したマウスは縦隔転移を認めなかった。E1AF細胞由来の腫瘍は、vector細胞由来の腫瘍よりMLCのリン酸化が著明に亢進していた。

【考察】これまでE1AFとRho/ROCK系の関係を示した報告はなく、本研究はE1AFの高発現がRho/ROCK系の活性化をもたらすことを示した最初の研究である。我々はこれまでE1AFによる遊走能・浸潤能の増強がMMPやuPAの発現と関係していることを報告してきたが、新たな機序として、Rhoの活性化が関係していることが示唆された。さらに、ROCK阻害剤によって遊走能・浸潤能が抑制されたことは、E1AFによる遊走能・浸潤能の増強にRho/ROCKの活性化が必須である可能性を示唆している。

Rho/ROCK系はラットの肝臓癌細胞、ヒトのグリオーマ細胞およびヒトの卵巣癌細胞で遊走能や浸潤能と関連が示されている。また、患者から切除された乳癌や膵癌の悪性度とRhoのisoformであるRhoCの発現レベルとの関連が報告されている。最近、非小細胞肺癌においてもRhoCが高発現し、脈管浸潤と相関していることが示された。これらの報告はRho/ROCK系の遊走能・浸潤能との強い関連を示しており、さらに今回の結果はE1AFによる遊走能・浸潤能の亢進においてもRho/ROCK系が重要な役割を果たしていることを示唆している。

E1AFがRhoを活性化する機序は不明である。E1AFは転写因子であるが、total Rhoの発現は増加させなかった。Rho活性はGuanine・ヌクレオチド変換因子(GEFs)とGTPase活性化因子(GAPs)によって制御されており、E1AFがGEFsやGAPsの発現を制御している可能性があり、今後の検討が必要である。

E1AFによる造腫瘍能に対する影響についてはこれまで一定の見解が得られていないが、本研究からは非小細胞肺癌細胞においてE1AFが造腫瘍能と転移能を増強することが示唆された。さらにE1AF細胞由来腫瘍におけるMLCのリン酸化の亢進は、E1AFによる造腫瘍能と

転移能の増強においても、Rho/ROCK 系が重要な役割を果たしていることを示唆している。

【結論】E1AF は HGF と協調的に作用して Rho/ROCK 系を活性化し、その活性化が非小細胞肺癌における遊走能・浸潤能、造腫瘍能および転移能の亢進に重要な働きを果たしている。この系を抑制する Y27632 のような阻害剤は、E1AF を高頻度に過剰発現する非小細胞肺癌において、有効な治療薬になる可能性が示唆される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 佐々木 文 章

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 西 村 正 治

学 位 論 文 題 名

E1AF/PEA3 Activates the Rho/Rho-Associated Kinase Pathway to Increase the Malignancy Potential of Non-Small Cell Lung Cancer Cells

(E1AF/PEA は Rho/ROCK 系を活性化し、
非小細胞肺癌細胞の悪性形質を増強する)

遊走能・浸潤能および造腫瘍能・転移能は癌細胞の悪性度を特徴づける因子である。我々はこれまでに、Ets 族転写因子に属する E1AF が非小細胞肺癌で高頻度に過剰発現し、遊走能・浸潤能の亢進に関係していることを示してきたが、その機序は明らかではない。最近、Small GTPase である Rho が Rho-associated kinase (ROCK) の活性化を介してミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化を引き起こし、細胞骨格を制御することで、種々の癌細胞の遊走能・浸潤能に関与することが報告されてきた。本論文では、非小細胞肺癌の E1AF 非発現細胞株 VMRC-LCD に E1AF 発現ベクターを遺伝子導入した E1AF 発現細胞株 (E1AF 細胞) と空ベクターを導入した細胞 (vector 細胞) を用いて、E1AF によって引き起こされる非小細胞肺癌の悪性形質における Rho/ROCK 系の役割を検討した。始めに E1AF 細胞における E1AF タンパク質の発現をウェスタンブロット法にて確認した。次に Rhotekin RBD-agars beads を用いた Rho pull down 法によって、E1AF 細胞では vector 細胞に比して、活性型である GTP 結合型 Rho が豊富で、HGF 添加により相乗的に増加することを示した。E1AF 細胞と vector 細胞で total Rho の発現に差はみられなかった。以前の報告と同様、E1AF 細胞は vector 細胞と比べ、遊走能と浸潤能が亢進し、さらに HGF 添加によりさらに増強した。ROCK 阻害剤である Y-27632 は濃度依存性に遊走能と浸潤能を抑制したが、特に HGF 添加下の E1AF 細胞において抑制効果は顕著であった。Y27632 は遊走能・浸潤能を強く抑制した濃度でも細胞増殖に影響を与えなかった。E1AF 細胞は vector 細胞より MLC のリン酸化が亢進し、HGF 添加によりリン酸化は増強された。このリン酸化は Y27632 によって強く抑制された。in vivo における検討においては、E1AF 細胞は vector 細胞に比し、ヌードマウスへの皮下移植で高頻度に皮下腫瘍を形成した (6/6 vs. 1/7)。肺内移植でも E1AF 細胞は肺

腫瘍を高頻度に形成した(4/7 vs. 1/7)。E1AF 細胞由来の肺腫瘍を形成した 4 匹の中で、3 匹に縦隔リンパ節への転移を認めた。一方、vector 細胞由来の肺腫瘍を形成した 1 匹のマウスでは縦隔転移を認めなかった。E1AF 細胞由来の腫瘍は、vector 細胞由来の腫瘍より MLC のリン酸化が著明に亢進していた。

以上より、E1AF は HGF と協調的に作用して Rho/ROCK 系を活性化し、その活性化が非小細胞肺癌における遊走能・浸潤能、造腫瘍能および転移能の亢進に重要な働きを果たしていることが示唆された。さらに、この系を抑制する Y27632 のような阻害剤は、E1AF を高頻度に過剰発現する非小細胞肺癌において、有効な治療薬になる可能性が示唆された。

審査にあたり、副査佐々木教授から、1)E1AF による Rho/ROCK 系活性化の機序、2)HGF と E1AF との関係、3)HGF 添加下での Y27632 の高い効果、4)in vivo における Y27632 の効果について、副査秋田教授から、1) E1AF 細胞由来 in vivo 腫瘍での MLC の著明なリン酸化の機序、2)ROCK 阻害剤の分子標的治療薬としての展望について、副査西村教授から、1)Y27632 の特異性、2)E1AF 高発現の癌での MMP の役割に関して質問があった。次いで主査守内教授から、内因性 E1AF 発現細胞での E1AF 阻害実験、Y27632 の効果についての質問があった。申請者はこれらの質問に対して、自験データと文献を引用して概ね適切に回答した。

この論文は、E1AF が Rho/ROCK 系を活性化することを初めて示した点、また、その活性化が E1AF によって引き起こされる非小細胞肺癌の悪性形質に重要な役割を果たしていることを示した点で高く評価され、今後、E1AF と Rho/ROCK 系の間の分子機構の解明やこれらの系に対する分子標的薬の開発などに広く応用されることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。