

# 論文内容の要旨

## がん細胞の運動・浸潤能の制御における ERK-MAP キナーゼの役割に関する研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 藤城 修平

【目的】がん細胞の浸潤・転移の過程においては、がん細胞の原発巣からの離脱、運動能の亢進、及び細胞外基質の分解が重要である。これら一連の過程には様々な分子が関与しているが、その中でも特に低分子量 G タンパク質である Rho ファミリー分子、様々な細胞接着分子、Matrix Metalloproteinases (MMPs) などが中心的な役割を担うことが報告されている。これまでに我々の研究室では、細胞増殖制御において必須の役割を果たしている ERK-MAP キナーゼ経路が、細胞運動能の制御においても本質的な機能を担っていることを明らかにしてきたが、一方、その分子機構の詳細については不明な点が多い。そこで本研究では、ERK-MAP キナーゼ経路がどのような機能を持つ分子の発現、あるいは機能調節を介して、がん細胞の運動能、さらに浸潤能の制御に関与するかという点を明らかにすべく、特に上記分子に着目して解析した。

【方法・結果】まず、ERK-MAP キナーゼ経路が恒常的に活性化されているヒトがん細胞として HT1080 (繊維肉腫由来)、T24 (膀胱癌由来)、及び KT006 (横紋筋肉腫由来)、一方、ERK-MAP キナーゼ経路の恒常的活性化が認められないがん細胞として MCF7 (乳癌由来)、LNCaP (前立腺癌由来)、Colo320 (大腸癌由来) を利用して、それらの細胞外基質 (ECM) への浸潤能を、Matrigel Invasion Assay によって比較した。その結果、ERK-MAP キナーゼ経路が恒常的に活性化されているがん細胞は高い浸潤能を有すること、それらの細胞を MEK 特異的阻害剤 PD184352 で処理して ERK-MAP キナーゼ経路を遮断すると浸潤能が顕著に抑制されること、ERK-MAP キナーゼ経路が活性化されていないがん細胞では浸潤能が低いことを見出した。そこで、ERK-MAP キナーゼがどのような機能を持つ分子の発現を介してがん細胞の浸潤能を亢進させるのかという点について、CD44 及び Integrin  $\beta 1$  (細胞接着分子)、MMP-2/-3/-9/-14 (ECM 分解酵素) に着目して解析を進めた。その結果、がん細胞における ERK-MAP キナー

ゼの活性レベルと CD44、及び MMP-3/-9/-14 の発現レベルの間に高い相関を認めた。なお、Integrin  $\beta$ 1、及び MMP-2 に関しては ERK-MAP キナーゼ活性との相関が認められなかった。

次に、転移能の高い多くのがん細胞において RhoA (Rho ファミリー分子) の機能亢進が認められていることより、その活性化因子である GEF-H1 に焦点を当てて解析を進めた。GEF-H1 は RhoA 特異的 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 活性を有しており、Ras の活性化に伴ってその発現が亢進することが報告されている。そこで、GEF-H1 の発現が ERK-MAP キナーゼ経路によって制御される可能性を検討する目的で、様々ながん細胞におけるその発現レベル、及びそれが PD184352 処理で影響されるかどうかを、Western Blot 法、Northern Blot 法によって解析した。その結果、GEF-H1 の発現は ERK-MAP キナーゼ経路によって制御されていることを見出した。

最近、GEF-H1 は PAK1、CDK1、あるいは Aurora キナーゼによってリン酸化されることで、その活性が抑制されることが報告されている。そこで、GEF-H1 が ERK-MAP キナーゼによってリン酸化される可能性を検討する目的で、GEF-H1 の欠失変異体、及び点変異体を作成し、それらを HT1080 細胞あるいは HeLa 細胞に発現させた後、ERK-MAP キナーゼのリン酸化部位 (Thr/Ser-Pro) を特異的に認識する抗体を利用して解析した。その結果、ERK-MAP キナーゼは細胞内で GEF-H1 の C 末側と結合すること、さらに ERK-MAP キナーゼは GEF-H1 の Thr<sup>678</sup> をリン酸化することを見出した。次いで ERK-MAP キナーゼによる Thr<sup>678</sup> のリン酸化が GEF-H1 の GEF 活性にどのような影響を及ぼすかを明らかにすべく、HT1080 細胞などに野生型 GEF-H1、あるいは Thr<sup>678</sup> を Ala に置換した T678A 変異体を発現させた後、GTP 結合型 (活性型) RhoA の量を GST-Rhotekin-RBD を利用した Pull-Down Assay で解析した。その結果、野生型 GEF-H1 は T678A 変異体と比較して高い GEF 活性を示すこと、それは細胞を PD184352 で処理することで抑制されることを見出した。すなわち、ERK-MAP キナーゼによる Thr<sup>678</sup> のリン酸化が GEF-H1 の GEF 活性を亢進させることが明らかとなった。最後に、Thr<sup>678</sup> のリン酸化による GEF-H1 の活性化 (RhoA の活性化) の生物学的意義を明らかにする目的で、GEF-H1、あるいは T678A 変異体を HT1080 細胞などに発現させた際、その形態、及び接着性がどのように変化するかを解析した。その結果、GEF-H1、あるいは T678A 変異体のいずれを発現させた際にも細胞は収縮して丸い形態となった。

が、GEF-H1 を発現させた細胞では、T678A 変異体を発現させた細胞と比較して、細胞の伸展性の低下、および器壁からの離脱能が亢進することを見出した。

【結論・考察】ERK-MAP キナーゼの恒常的活性化が起こっているがん細胞では CD44、MMP-3/-9/-14、および GEF-H1 の発現が亢進していること、さらに ERK-MAP キナーゼによって Thr<sup>678</sup> がリン酸化されることで GEF-H1 の RhoA に対する GEF 活性が亢進することを見出した。すなわち、ERK-MAP キナーゼは (1) GEF-H1 の発現/リン酸化を介して、がん細胞の原発巣からの離脱を促進する (図①)、(2) MMP-3/-9/-14 の発現を介して、細胞外基質 (ECM) の分解を促進する (図②)、(3) CD44 の発現上昇を介して、運動能を促進する (図③)。その結果として、ERK-MAP キナーゼ系が恒常的に活性化されているがん細胞においては、運動能、及び ECM 浸潤能の亢進が誘起されると考えられる。これらの結果は、ERK-MAP キナーゼ経路の選択的遮断が、がん細胞の増殖抑制だけでなく、浸潤転移能の抑制にも繋がる点で、極めて有効ながん治療に結びつく可能性を強く示唆するものである。

