

133. 膵癌モデルマウスを用いた新規代謝制御分子の機能解析

坂本 毅治

東京大学 医科学研究所 人癌病因遺伝子分野

Key words : 膵癌, マウスモデル, ERK, RNF126

緒言

膵癌は外科手術以外で有効な治療法が無く、5年生存率が5%を切り、膵腺癌と診断された患者の生存期間の中央値は6カ月と極めて予後不良ながんである。膵癌ではKRAS、CDKN2A、TP53、SMAD4/DPC4などの変異が高頻度に観察されており、これらの変異を導入した遺伝子改変マウスではヒトの膵癌と良く似た病態を呈することから、遺伝子改変マウスを用いた膵癌の研究が盛んに行われている。しかしながら、膵癌悪性化の分子機構の理解は未だ不完全である。

我々は、これまでにゲノムワイド shRNA ライブラリーを用いた網羅的スクリーニングを行い、酸素依存性の細胞増殖に関わる遺伝子を13種類同定した¹⁾。その中のひとつであるRNF126について解析を進めたところ、RNF126は乳癌細胞株などで、足場非依存的な細胞増殖やヌードマウス皮下での腫瘍増殖を促進することが明らかとなった。メタボローム解析の結果、RNF126ノックダウン細胞では解糖系代謝産物には影響は無かったが、ミトコンドリアのTCAサイクルの代謝産物の低下が観察され、この傾向はがん細胞を非接着状態にした時により顕著に表れた。さらなる解析の結果、RNF126は解糖系-TCAサイクルへの代謝フラックスを制御し、がん細胞の浮遊状態での生存、増殖に関わるpyruvate dehydrogenase kinase (PDK) のE3ユビキチンリガーゼであることが明らかとなった。以上の結果は乳癌、肺癌細胞株を用いた実験であり、膵癌においてRNF126ががんの悪性化を制御するかについては不明である。そこで本研究では、RNF126が膵癌においてどのような役割を果たしているかについて、細胞株および膵癌モデルマウスを用いて検討を行った。

方法、結果および考察

RNF126欠損膵癌モデルマウスの作製が予定よりも時間がかかったため、その間、先行研究の延長で、ヒト乳腺上皮MCF-10A、ヒト乳癌MDA-MB-231、膵腺癌A549細胞におけるRNF126の発現制御機構について解析を行った。細胞を浮遊状態で培養した際に、MCF-10A細胞においてRNF126の発現低下が観察された(図1A)。一方、MDA-MB-231、A549細胞では浮遊状態でもRNF126の発現は保持されていた。がん細胞の足場非依存性の増殖にはERKシグナルが関わることから、ERKのリン酸化状態を調べたところ、浮遊状態でのMCF-10A細胞のERKリン酸化が著しく低下しているのに対して、MDA-MB-231、A549細胞ではERKのリン酸化が保持されていた。また、MEK阻害剤U0126で細胞を処理したところ、MDA-MB-231、A549細胞においてもRNF126の発現が低下した。以上の結果から、RNF126の発現がERKシグナルにより発現制御を受けることが明らかとなった。U0126処理によりMDA-MB-231、A549においてRNF126のmRNAレベルが低下したことから(図1B)、ERKシグナルによりRNF126が転写レベルで制御されていることが示唆された。そこで、RNF126のプロモーター領域を用いたレポーターアッセイを行った結果、開始コドン上流1880-1860塩基に存在する2つのELK1結合サイトがU0126処理に応答することが分かった(図1C)。続いて、ELK1抗体を用いてクロマチン免疫沈降実験を行った結果、ELK1がU0126処理応答性に上述のELK1結合サイトに結合していることが明らかとなった(図1D)。以上の結果から、ERKシグナルはELK1を介してRNF126の転写を促進することが明らかとなった²⁾。

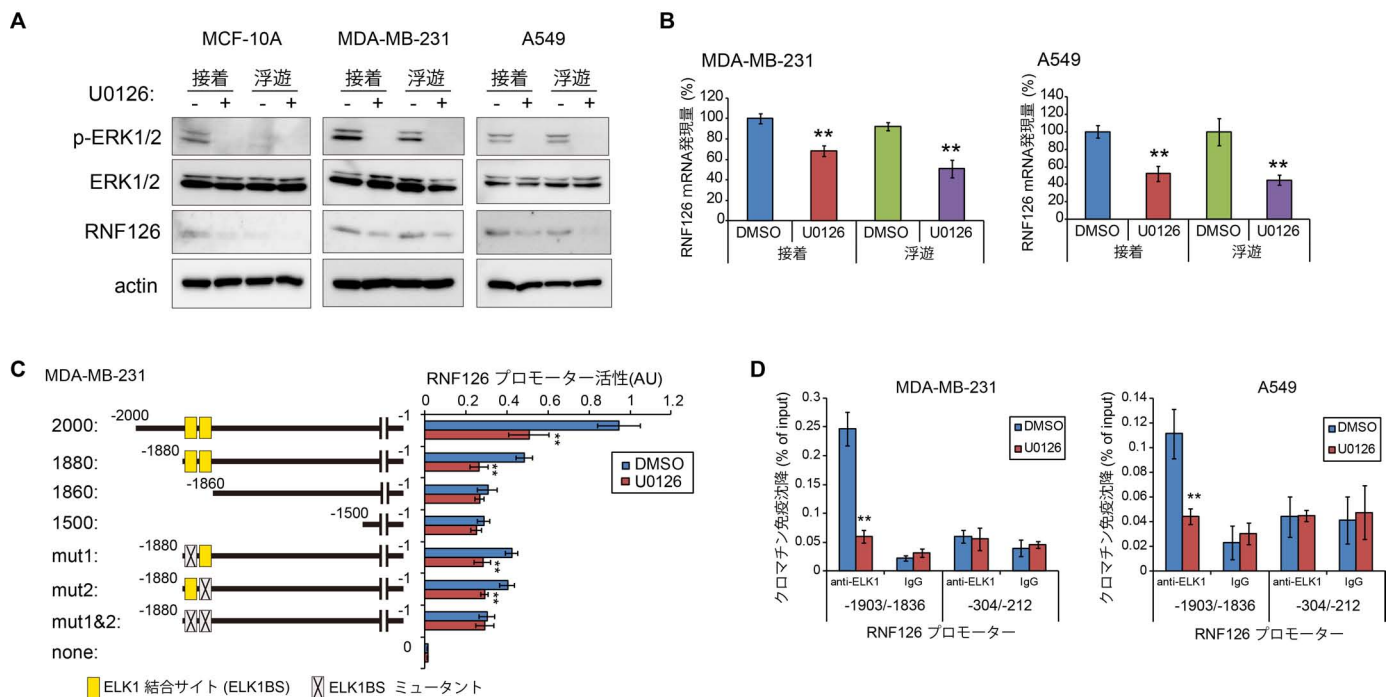


図 1. ERK シグナルによる RNF126 の発現制御

(A) MCF-10A、MDA-MB-231、A549 細胞の ERK1/2、リン酸化 ERK1/2、RNF126、アクチンのウエスタンブロット解析。溶媒 (DMSO) または U0126 (10 μ M) を加え、接着または浮遊状態で 24 時間細胞培養した。

(B) RNF126 mRNA レベルの定量 PCR 解析。RNF126 mRNA レベルは Actb mRNA レベルで標準化した。エラーバーは標準偏差 (n = 3)。データは t 検定で解析した。*p < 0.05、**p < 0.01。

(C) MDA-MB-231 細胞における RNF126 プロモーター活性の解析。エラーバーは標準偏差 (n = 3)。データは t 検定で解析した。*p < 0.05、**p < 0.01。

(D) ELK-1 抗体またはコントロール IgG を用いた RNF126 プロモーターの ChIP-定量 PCR 解析。エラーバーは標準偏差 (n = 3)。データは t 検定で解析した。*p < 0.05、**p < 0.01。

続いて、膀胱癌において RNF126 をノックダウンした際に、乳癌、肺癌で見られたように造腫瘍能が低下するかについて、ヒト膀胱癌 AsPC1 を用いてヌードマウス皮下での腫瘍増殖を解析した。その結果、RNF126 ノックダウンにより、AsPC1 の造腫瘍能が低下することが明らかとなった (図 2)。この結果から、膀胱癌においても RNF126 を抑制することで造腫瘍能が抑制されることが示唆された。

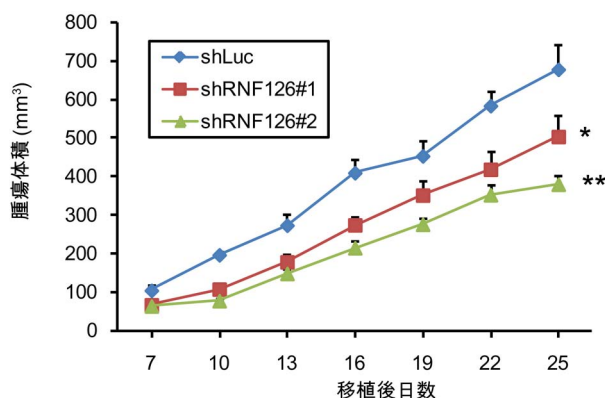


図2. RNF126 ノックダウンはヒト膵癌 AsPC1 細胞の造腫瘍能を抑制する

コントロール (shLuc) および RNF126 ノックダウン (shRNF126) AsPC1 細胞をヌードマウス皮下に移植し、腫瘍サイズを測定した。各群 n = 6、エラーバーは標準誤差。移植後 25 日の腫瘍サイズを Mann-Whitney U 検定で解析した。*p < 0.05、**p < 0.01。

これらの細胞株を用いた実験の間、cre リコンビナーゼ発現下でのみ特異的に変異型 Kras を発現する LSL-KrasG12D マウス、膵臓特異的に cre リコンビナーゼを発現する Pdx1-cre マウス、Cre リコンビナーゼにより各遺伝子の欠損が起こる Tp53flox/flox マウスを交配させた膵癌モデルマウス (KPC マウス) と Rnf126flox/flox マウスを交配させることで、RNF126 欠損膵癌モデルマウスを作製した。まず、膵癌モデルマウスにおいて、コントロールマウスと RNF126 欠損マウスでの生存期間の比較を行った。その結果、細胞株での結果に反し、RNF126 欠損膵癌モデルマウスはコントロールマウスに比べて有意に生存期間が短縮していることが明らかとなった (図 3A)。RNF126 欠損膵癌モデルマウスの膵臓の組織病理的解析を行ったところ、RNF126 ノックアウトマウスは 4 週齢の時点で膵臓の構造が確認できないほどに膵癌が進行していることが明らかとなった (図 3B)。以上の結果から、膵癌モデルマウスでは RNF126 は膵癌の進行に対し抑制的に働くことが明らかとなった。

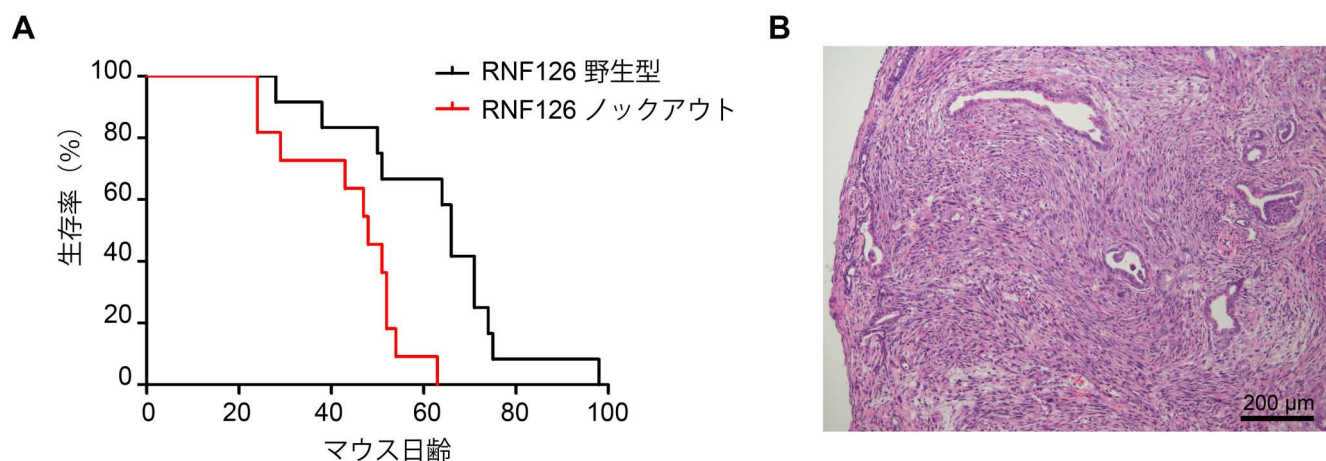


図3. RNF126 欠損膵癌モデルマウスの解析

(A) コントロール (n = 12) および RNF126 欠損 (n = 11) 膵癌モデルマウスの生存期間を Log-rank テストで解析した。P = 0.0023。

(B) 生後 28 日の RNF126 欠損膵癌モデルマウスの膵臓のヘマトキシリン&エオジン染色。

膵癌細胞株 AsPC1 では RNF126 は腫瘍促進的に働くのに対し、膵癌モデルマウスでは抑制的に働いたことから、RNF126 はがんのステージにより異なる役割を果たしている可能性が考えられる。今後は膵癌モデルマウスにおいて、

RNF126 がどのようなメカニズムでがん抑制的に働くかについて、経時的に回収した腫瘍組織の病理組織学的、生化学的解析を進める予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野の中岡寛樹、芳野聖子、金森茜、村上善則、金沢大学医薬保健研究域医学系の清木元治である。

文 献

- 1) Genetic screening of new genes responsible for cellular adaptation to hypoxia using a genome-wide shRNA library. Yoshino S, Hara T, Weng JS, Takahashi Y, Seiki M, Sakamoto T. PLoS One. 2012;7(4):e35590. doi: 10.1371/journal.pone.0035590.
- 2) The ERK-signaling target RNF126 regulates anoikis resistance in cancer cells by changing the mitochondrial metabolic flux. Yoshino S, Hara T, Nakaoka HJ, Kanamori A, Murakami Y, Seiki M, Sakamoto T. Cell Discovery. 2016;2:16019. doi:10.1038/celldisc.2016.19.