

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	
Title(English)	Study on the role of Skp2 in hepatocyte growth factor induced inhibition of hepatoma cell proliferation
著者(和文)	リーシャオリエン
Author(English)	Xiaoran Li
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9352号, 授与年月日:2013年11月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:駒田 雅之,岩崎 博史,太田 啓之,梶川 正樹,中戸川 仁
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9352号, Conferred date:2013/11/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

Study on the role of Skp2 in hepatocyte growth factor-induced inhibition of hepatoma cell proliferation

李 曉然

指導教員：駒田 雅之 准教授

東京工業大学 大学院生命理工学研究科 生体システム専攻

論文の要約

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) は、様々な組織において間質細胞から分泌され細胞外マトリクスのヘパリンと結合する糖タンパク質であり、多様な細胞に対して多様な作用を発揮する。HGF のチロシンキナーゼ型受容体 c-Met は上皮細胞に広く発現している。HGF が標的細胞膜上の c-Met に結合するとそのチロシンキナーゼ活性が上昇し、細胞の増殖、運動性亢進、管腔形成、血管新生などを引き起こす。しかし、HGF はその細胞増殖の制御において、細胞の種類に応じて 正反対の作用をもたらす。すなわち、HGF はある種の癌細胞の増殖を促進する一方で、他の癌細胞の増殖を抑制する。異なる細胞に対する HGF のこの正反対の作用は、細胞内に生じるシグナル伝達経路の違いによると考えられている。したがって、これらの異なる作用を引き起こすシグナル伝達経路の解明は、癌細胞の形質を抑制する癌治療法の開発につながることを期待される。

私の研究室では、HGF がヒト肝癌細胞株 HepG2 の増殖を阻害することを報告している。HGF のこの作用を引き起こすサイクリン依存性キナーゼ (CDK) インヒビター p16 は、転写因子 Ets により発現誘導され、Ets の発現は Id1 (inhibitor of DNA binding 1) タンパク質により阻害される。当研究室の先行研究において、HGF は MAP キナーゼの 1 つである ERK の活性化に依存的に Id1 の発現を抑制して p16 の発現上昇をもたらすことにより、細胞増殖を阻害することが明らかとなっている。しかし、HGF 刺激から p16 の発現上昇に至る一連のシグナル伝達機構の全貌はこれまで解明されていなかった。

もう 1 つの重要な CDK インヒビターである p27 もまた HGF によって発現上昇することから、私は HGF による p27 の発現上昇のメカニズムの解明を目的として本研究を開始した。p27 は、他の多くの癌細胞におけるユビキチンリガーゼ複合体 SCF^{Skp2} の主要な基質である。私は、HGF 刺激した HepG2 細胞において SCF^{Skp2} 複合体の構成タンパク質でありいくつかの癌の予後因子である Skp2 の発現が低下することを見出した。Skp2 の mRNA およびタンパク質レベルを ERK 経路の阻害剤 PD98059 で処理した細胞において調べた結果、Skp2 の発現低下は ERK 経路の活性化に依存した mRNA レベルの低下によるものであった。Skp2 の過剰発現は HGF による HepG2 細胞の増殖阻害をレスキューしたことから、HGF の細胞増殖阻害作用に Skp2 の発現抑制が必要であることが明らかとなった。しかし、Skp2 の過剰発現は HGF 刺激による p27 の発現上昇を阻害することはなかった。これは、HGF による Skp2

の発現抑制と細胞増殖阻害を回復させた PD98059 が HGF による p27 の発現制御には影響を及ぼさなかったことと合致した。これらの結果は、Skp2 の発現低下を介する HGF の細胞増殖抑制作用に p27 を含まないシグナル伝達経路が関与することを示唆した。HGF による ERK 依存的な Skp2 の発現抑制は HGF により増殖抑制される別のヒト肝癌細胞株 HuH7 においても観察されたことから、HGF による細胞増殖制御における Skp2 の働きは多様な肝癌細胞に共通したものであることが示唆された。

他の癌細胞株において、Skp2 によって肝癌の発症に重要な役割を果たす転写因子 Myc が活性化されること、あるいはユビキチン化されることが報告されている。Myc 応答性エンハンサー配列を用いたレポーター・アッセイにおいて、私は Myc の転写活性が HGF 刺激により ERK 依存的に抑制されること、また Skp2 のノックダウンが HGF 非刺激時の Myc 活性を低下させることを見出した。重要なことに、野生型 Skp2 のみならず SCF 複合体を形成できない Skp2 変異体も Myc 活性を回復させた。これらの結果は、HGF が Skp2 の発現抑制を介して Myc 活性を低下させることを示しており、Skp2 がそのユビキチンリガーゼ活性と独立に Myc を活性化する因子であることを示唆するものであった。

当研究室の過去の研究から、Id1 の発現は HGF 刺激により ERK の活性化を介して抑制されることがわかっている。一方、他の癌細胞株において、Id1 は Myc により転写誘導される Myc の標的遺伝子であることが報告されている。そこで、HepG2 細胞においても Myc により Id1 の転写が制御されているか調べるため、Myc をノックダウンした細胞における Id1 の発現を調べた結果、Myc ノックダウンが Id1 mRNA の発現を抑制することが示された。Skp2 のノックダウンもまた Id1 の発現を抑制した。Myc のレポーター・アッセイの結果と合致し、野生型 Skp2 のみならず SCF 複合体を形成できない Skp2 変異体の過剰発現も HGF による Id1 の発現抑制を回復させた。これらの結果から、Skp2 はユビキチンリガーゼ活性に非依存的に Myc の転写活性を上昇させることにより、Id1 の発現を上昇させることが示唆された。最後に、転写因子 Ets 依存的に HGF によって発現上昇し Id1 によって発現低下する細胞周期停止因子 p16 の遺伝子のプロモーター活性が Skp2 の過剰発現により低下することが示され、HGF 刺激した細胞において Skp2 が Id1 の発現制御を介して p16 遺伝子のプロモーター活性の制御に関与することが示唆された。

以上、本研究は肝癌細胞における HGF による ERK 依存的な Skp2 の発現抑制が Myc の転写活性を低下させること、そしてそれによって Id1 の発現抑制と p16 の発現上昇を介して細胞増殖の抑制を引き起こすことを解明したものである。