

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	高橋賢治
学位論文題目			
Homeobox gene CDX2 inhibits human pancreatic cancer cell proliferation by down-regulating cyclin D1 transcriptional activity.			
(ホメオボックス遺伝子 CDX2 はサイクリン D1 転写抑制を介してヒト膵癌細胞増殖を抑制する)			
共著者名 平野 史倫、松本 学也、麻生 和信、羽田 勝計			
掲載雑誌名 未公開			
研究目的			
<p>膵癌は現在我が国の癌死亡患者数の第5位を占める消化器癌である。現在までに膵癌に対してさまざまな治療法が試みられているが、その予後は未だに不良である。一方、胎生期の消化管形成に関わる重要な転写因子である Caudal related homeobox gene type2 (CDX2)は、後腸の分化に関与し、成人では主に小腸、大腸の上皮に発現を認める。近年、大腸癌に発現した CDX2 は癌細胞の増殖抑制作用を有することが報告されている。しかし、正常膵島細胞に発現する CDX2 は、前癌病変として認識されている pancreatic intraepithelial neoplasia や浸潤性膵管癌においてほとんど発現していないことが知られている。従って、一般に癌細胞に発現した CDX2 はその増殖進行を抑制する可能性が示唆されているが、特に膵癌における役割については全く不明である。そこで、CDX2 の発現と膵癌の生物学的悪性度との関連を解明するため、本研究はヒト膵癌細胞を用い CDX2 による細胞増殖能と細胞周期に関連したサイクリン D1 発現作用に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。</p>			

材 料 ・ 方 法

通常型膵管癌細胞 (Panc-1、BxPC-3、MIAPaCa-2、CFPAC-1)、膵島腫瘍細胞 (QGP-1)、膵腺扁平上皮癌細胞 (KP-3) を用いた。CDX2 mRNA と蛋白の発現はリアルタイム PCR 法とウエスタンブロット法で、細胞増殖能は WST-1 法を用いて検討した。サイクリン D1 の発現はリアルタイム PCR 法とウエスタンブロット法で、シクロオキシゲナーゼ 2 の発現はリアルタイム PCR 法で検討した。また、KP-3 細胞へ CDX2 を強制発現させることによって、CDX2 の細胞増殖能とサイクリン D1 発現に与える影響を検討した。一方、CDX2 のサイクリン D1 転写活性に与える影響はサイクリン D1 プロモーターとルシフェラーゼ遺伝子を融合させたキメラプラスミド (pD1-luc) を用いたルシフェラーゼ法で検討した。さらに、サイクリン D1 転写活性に与える CDX2 の作用部位を明らかにするために、サイクリン D1 プロモーターの遠位部および近位部 NF- κ B-p65 結合部位である D1- κ B1 部位と D1- κ B2 部位にそれぞれ変異を持つリポータープラスミド (pD1- κ B1M, pD1- κ B2M, pD1- κ B1/2M) と HIV core プロモーターに D1- κ B2 部位を結合したリポータープラスミド (pGL2HIVD1- κ B2) を用いて検討した。

成 績

CDX2 mRNA および蛋白は QGP-1 > Panc-1、BxPC-3、MIAPaCa-2、CFPAC-1 > KP-3 細胞の順に発現していた。細胞増殖能は、KP-3 > Panc-1、BxPC-3、MIAPaCa-2、CFPAC-1 > QGP-1 細胞の順で高かった。従って、膵癌細胞において CDX2 の発現と細胞増殖能は負の相関傾向を認めた。さらに、KP-3 細胞および BxPC-3 細胞に対して CDX2 発現プラスミドを導入し CDX2 を強制発現させた結果、細胞増殖能は CDX2 の発現増加とともに低下していた。また、CDX2 の発現が最も低い KP-3 細胞と最も高い QGP-1 細胞におけるサイクリン D1 の発現は KP-3 > QGP-1 細胞であった。一方、シクロオキシゲナーゼ 2 の発現量は QGP-1 > KP-3 細胞であり、膵癌細胞において CDX2 の発現、細胞増殖能との関連は認めなかった。さらに、KP-3 細胞に対して CDX2 を強制発現させた結果、サイクリン D1 の発現は CDX2 の増加とともに発現量依存性に低下した。従って、膵癌細胞の中で、CDX2 発現の低い KP-3 細胞はサイクリン D1 の高発現と細胞増殖の促進を認め、CDX2 はこれら作用を抑制していることが明

らかとなった。

次に、サイクリン D1 プロモーターとルシフェラーゼ遺伝子を融合させた pD1-luc リポータープラスミドを用いたルシフェラーゼ法による CDX2 のサイクリン D1 転写活性に与える影響について検討した。その結果、強制発現させた CDX2 は発現量依存性にサイクリン D1 の転写活性を抑制した。また、NF- κ B-p65 と CDX2 の発現プラスミドを共導入した際、NF- κ B-p65 によって増強されたサイクリン D1 転写活性は CDX2 によって発現量依存性に低下した。さらに、サイクリン D1 プロモーターの遠位部と近位部の NF- κ B 結合部位に変異を持つ pD1- κ B1M、pD1- κ B2M リポータープラスミドを用いて作用部位を検討した結果、pD1- κ B2M の転写活性は pD1- κ B1M に比べて低く、NF- κ B によるサイクリン D1 の転写活性は、NF- κ B の近位結合部位である D1- κ B2 部位がより重要であることが示唆された。また、CDX2 は HIV core プロモーターから構成されるリポータープラスミド pGLHIV の転写活性に影響を与えず、サイクリン D1 プロモーターの NF- κ B 近位結合部位を有した pGL2HIVD1- κ B2 の転写活性を発現量依存性に低下させた。従って、CDX2 はサイクリン D1 プロモーターの近位部 NF- κ B 結合部位を介してサイクリン D1 の転写活性を抑制している可能性が示唆された。

考 案

CDX2 は大腸癌細胞などでサイクリン D1 を含む β -catenin/TCF 経路の阻害や p21 活性化等による細胞増殖抑制作用が報告されているが、今回の検討から膵癌細胞において CDX2 は大腸癌細胞と同様に細胞増殖抑制作用を有していることが明らかとなった。一般に、NF- κ B は、サイクリン D1 の転写活性を促進することによって細胞増殖や発癌に関与することが報告されている。サイクリン D1 のプロモーターには、D1- κ B1 と D1- κ B2 の 2 つの NF- κ B の結合部位があり、主に NF- κ B は近位部の D1- κ B2 部位を介してサイクリン D1 の転写活性を促進し、細胞増殖能を促進することが知られている。今回の結果から、膵癌細胞においても CDX2 は D1- κ B2 部位を介したサイクリン D1 の発現低下と細胞増殖抑制作用に重要な役割を担っていることが示唆された。現在その作用機序は不明であるが、大腸癌細胞において CDX2 が NF- κ B-p-65 と蛋白-蛋白結合することにより、NF- κ B-p65 のシクロオキシゲナーゼ 2 プロ

モーターへの結合を阻害しシクロオキシゲナーゼ 2 の発現を抑制することが報告されている。従って、膵癌細胞における CDX2 によるサイクリン D1 発現抑制作用も CDX2 と NF- κ B-p-65 との蛋白-蛋白結合を介したサイクリン D1 転写抑制作用による可能性が推測された。今後さらに、膵癌細胞におけるサイクリン D1 発現と細胞増殖機能との関連を検討することによって、CDX2 による膵癌細胞増殖抑制機構がより明確になると考えられる。

結 論

膵癌細胞において、CDX2 はサイクリン D1 プロモーターの近位部 NF- κ B 結合部位を介したサイクリン D1 発現抑制と細胞増殖抑制作用を認めたことから、CDX2 は膵癌進展を抑制しうる遺伝子として作用している可能性が示唆された。

引 用 文 献

1. Li, Y.J., Wei, Z.M., Meng, Y.X. and Ji, X.R. (2005) β -catenin up-regulates the expression of cyclin D1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: relationships with carcinogenesis and metastasis. *World J. Gastroenterol.*, 11, 2117-2123.
2. Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C. And Strauss, M. (1999) NF- κ B function in growth control: Regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 2690-2698.
3. Kim, S.P., Park, J.W., Lee, S.H., Lim, J.H., Jang, B.C., Lee, S.H., Jang, I.H., Freund, J.N., Suh, S.I., Mun, K.C., Song, D.K., Ha, E.M., Lee, W.J. and Kwon, T.K. (2004) Homeodomain protein CDX2 regulates COX-2 expression in colorectal cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315, 93-99.

参 考 論 文

なし。

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博 士 (医学)	氏 名	高 橋 賢 治
<p>審査委員長 小 川 勝 洋 ㊞</p> <p>審査委員 高 後 裕 ㊞</p> <p>審査委員 羽 田 勝 計 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Homeobox gene CDX2 inhibits human pancreatic cancer cell proliferation by down-regulating cyclin D1 transcriptional activity.</p> <p>(ホメオボックス遺伝子 CDX2 はサイクリン D1 転写抑制を介してヒト膵癌細胞増殖を抑制する)</p> <p>膵癌は癌死亡患者数の上位を占める消化器癌であり、現在までに様々な治療法が試みられているが、未だ有効な治療法は見つかっていない。本学位論文提出者は様々なヒト膵癌細胞株を用いて胎生期の消化管形成に関する転写因子 <i>cand al related gene type 2</i> (CDX2) と膵癌との関わりについて検討した。</p> <p>まず、膵癌細胞株の増殖活性と CDX2 遺伝子発現との関係について検討したところ、増殖活性の高いものでは CDX2 の発現が低く、逆に低いものでは CDX2 の発現が高いという負の相関が認められた。次に、癌細胞の増殖に関する cyclin D1 と CDX2 の発現について検討したところ、同様の負の相関が見られた。このことから、CDX2 が cyclin D1 の転写抑制を介して膵癌細胞の増殖抑制に働くとの仮説に基づき、CDX2 の cyclin D1 プロモーター活性に対する影響をルシフェラーゼアッセイにより検討したところ、CDX2 は cyclin D1 プロモーター活性を抑制することが明らかになった。さらにその機序をより精しく調べるために cyclin D1 プロモーターに存在する NFκB-p65 との結合領域に変異をもつレポータープラスミドを用いて検討した。その結果、プロモーター近位部に存在する NFκB 結合部位が CDX2 による cyclin D1 発現抑制に関っていることが明らかになった。</p> <p>以上の所見は CDX2 が cyclin D1 発現抑制を介して膵癌細胞の増殖抑制に働いており、CDX2 発現低下が膵癌の進展に関することを示したものであり、有意義な発見である。本論文提出者は試問審査においても当該領域について十分な知識と見識を有していることが明らかになった。したがって、本論文審査委員会は当該論文が学位論文としてふさわしいものであると判定した。</p>			