



Oncogenic ras induces gastrin/cckb receptor gene expression in human colon cancer cell lines lovo and colo320hsr

堀, 博之

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2848

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002848>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 2 2 】

氏 名 ・(本 籍) 堀 博之 (京都府)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1517号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成15年3月31日

【 学位論文題目 】

Oncogenic ras induces Gastrin/CCKB receptor gene expression
in human colon cancer cell lines LoVo and Colo320HSR
(癌遺伝子rasは、ヒト大腸癌細胞株LoVo、Colo320HSRにおいて、
ガストリン/CCKBレセプターの遺伝子発現を促進する)

審 査 委 員

主 査 教 授 馬場 久光

 教 授 千原 和夫

 教 授 前田 盛

緒 言

ペプチドホルモンであるガストリンは胃壁細胞からの酸分泌を刺激するが、また一方で大腸癌細胞などに対する増殖促進効果も認められている。しかし、血中ガストリンは大腸癌の腫瘍形成における関与は低いとされる。なぜならば、高ガストリン血症のZollinger-Ellison症候群の患者は大腸癌のリスクの増加はなく、また、最近のケースコントロールスタディーでも高ガストリン血症の大腸癌への寄与は8.6%と報告されているからで、ガストリンは他の機構により大腸癌の進展に関わっている可能性が考えられる。

さらに、ガストリン/CCKBレセプターは、主として中枢神経系と胃に発現し、正常の大腸粘膜には存在しないが、大腸癌ではしばしば発現していることがある。最近のRT-PCRを用いた報告では、大腸腺腫性ポリープにガストリン、ガストリン/CCKBレセプターはそれぞれ78%、81%発現し、ガストリン/CCKBレセプター遺伝子を発現するポリープの97%はガストリンとレセプターを共発現していた。これらのことは、ガストリンがガストリン/CCKBレセプターを介してオートクラインに大腸癌の腫瘍増殖に関与している可能性を示唆している。

癌遺伝子であるrasは細胞の増殖、分化に関与し、活性化されれば、プロテインキナーゼカスケードを介して遺伝子発現を支配する転写因子に作用する。近年、rasの活性化変異が大腸癌において頻度が高いということより、活性化rasがRas-Raf-MEK-ERKシグナル伝達経路の活性化を介してガストリン遺伝子の発現を促進することが報告されている。

大腸癌細胞において、ガストリンが活性化rasによって誘導され、オートクラインによって細胞増殖が促進される場合、活性化rasはガストリン/CCKBレセプターの遺伝子発現をも促進している可能性が考えられる。多くの研究が大腸癌の腫瘍形成、細胞増殖におけるガストリン/CCKBレセプターの関与について示しているが、関与の様式については未詳である。この研究では、活性化rasがガストリン/CCKBレセプターの遺伝子発現を促進するという仮説の下に、2つのヒト大腸癌細胞株Colo320HSRとLoVoにおいて、ガストリン/CCKBレセプターの遺伝子発現に関する癌遺伝子rasの効果について検討した。

方 法

ガストリン/CCKBレセプターの遺伝子発現

ネステッドRT-PCRを用いて、LoVo、Colo320HSRより抽出した総RNAにおけるガストリン/CCKBレセプターの遺伝子発現を検討した。

活性化rasによるガストリン/CCKBレセプター遺伝子転写活性への影響

野生型のRas遺伝子をもつColo320HSRに、ヒトガストリン/CCKBレセプターの遺伝子プロモーター-514塩基(-533から-20)を含むルシフェラーゼレポーター-GaR-Luc、恒常的に野生型Ha-Ras蛋白を発現するpCMV-Ras、または残基12のグリニンがバリンに変異した活性化型のHa-Ras蛋白を発現するpCMV-RasV12をトランスフェクションし、培養後ルシフェラーゼアッセイを行った。また、特異的なMEK阻害剤であるPD98059を加えてその影響を検討した。さらに活性化ras遺伝子をもつLoVoを用いて、同様の検討を行った。

活性化rasによるガストリン/CCKBレセプターmRNAへの影響

LoVoにおいて、pCMV-RasV12による内因性ガストリン/CCKBレセプター遺伝子の発現に対する影響をRNase protection assay (RPA)を用いて検討した。さらにPD98059を加えてその影響を検討した。

結 果

ガストリン/CCKBレセプターの遺伝子発現

LoVo、Colo320HSRにおいて506bpの特異的なガストリン/CCKBレセプター遺伝子の発現が認められた。

活性化rasによるガストリン/CCKBレセプター遺伝子転写活性への影響

Colo320HSRにおいて、pCMV-RasV12はpCMV-Rasに比べてガストリン/CCKBレセプターの転写活性を約2倍促進した。PD98059は癌遺伝子rasにより促進された転写活性を抑制した。また、LoVoにおいては、pCMV-RasV12はpCMV-Rasに比べてガストリン/CCKBレセプターの転写活性を約1.4倍促進した。さらに、PD98059は癌遺伝子rasにより促進された転写活性を抑制した。

活性化rasによるガストリン/CCKBレセプターmRNAへの影響

LoVoにおいて、pCMV-RasV12はコントロールと比較して、ガストリン/CCKBレセプターmRNAの発現を約1.45倍促進した。さらに、PD98059はコントロールと比較してガストリン/CCKBレセプターmRNAの発現を約0.84倍に抑制した。

考 察

大腸癌細胞に対するガストリンの細胞増殖作用については、数々の研究がなされている。また、大腸癌に進展する大腸ポリープにおいても、ガストリン、ガストリン/CCKBレセプターの発現が高率に認められ、Vogelsteinらが提唱した大腸癌におけるadenoma-carcinoma sequenceにガストリンが関与する可能性が考えられる。また、遺伝子変異により活性化したrasがガストリン遺伝子の発現を促進することが見い出されている。これに対してKohらは、APC遺伝子の下流にある β catenin/TCF-4細胞内情報伝達系がガストリン発現を促進すると報告した。さらに、ガストリン欠失マウスとコントロールマウスの大腸ポリープの間でrasの変異に差がないことを理由に、ガストリンはrasに由来するポリープの増殖に関与しないと結論づけている。彼等はK-ras遺伝子の第12コドンのみの検討を行っているが、rasの活性化を引き起こす遺伝子変異は第13、61コドンなどにも高率に生じている。事実、ヒト大腸癌細胞で第13、61コドンの変異は第12コドンに匹敵する高率で見い出されている。従って、ガストリンはrasに由来するポリープの増殖に関与しないという彼等の主張の根拠は不十分である。一方、大腸癌において、アミド化された最終産物のガストリンではなく中間産物のグリシン-ガストリンやプロガストリンが細胞増殖作用をもつという意見もあり、それらの受容体についても報告がなされている。しかし、これらの新たな受容体の詳細は明かにされず、これらの受容体が細胞増殖に関与する証明はなされていない。これに対し、ガストリン/CCKBレセプターは大腸癌細胞のみならず、各種の細胞で細胞増殖促進作用が示されており、大腸ポリープの大腸癌への進展において重要な役割をもつ可能性が高い。

今回の研究では、ヒト大腸癌細胞株LoVo、Colo320HSRにおいて、活性化rasはガストリン/CCKBレセプター遺伝子発現を促進した。RasV12およびPD98059の効果はLoVoよりColo320HSRにおいて大きく、その理由として活性化K-rasをもつLoVoに対してColo320HSRは野生型のK-rasであることがあげられる。さらに、特異的なMEK阻害剤であるPD98059により活性化rasのガストリン/CCKBレセプターの転写促進が部分的に抑制されたため、ガストリン/CCKBレセプター転写活性を刺激するras由来の細胞内シグナル伝達経路はRas-Raf-MEK-ERK経路のように、MEKを含む情報伝達系である可能性が推測される。こうしたことから、大腸癌細胞でしばしばみられる活性化rasは、ガ

ストリン遺伝子発現と同様に、ガストリン/CCKBレセプター遺伝子発現を促進し、ガストリンを含むオートクライン機構により細胞増殖が促進されている可能性が考えられた。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1503 号	氏 名	堀 博之
論文題目	<p>Oncogenic ras induces Gastrin/CCKB receptor gene expression in human colon cancer cell lines LoVo and Colo320HSR</p> <p>癌遺伝子 ras は、ヒト大腸癌細胞株 LoVo、Colo320HSR において、ガストリン/CCKB レセプターの遺伝子発現を促進する</p>		
審査委員	<p>主 査 馬 場 久 光</p> <p>副 査 千 原 和 夫</p> <p>副 査 前 田 盛</p>		
審査終了日	平成 15 年 2 月 21 日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

ペプチドホルモンであるガストリンは胃壁細胞からの胃酸分泌を刺激するが、大腸癌細胞などに対する増殖促進効果を有することが知られている。しかし、高ガストリン血症を呈する Zollinger-Ellison 症候群の患者に大腸癌リスクの増加はなく、ケースコントロールスタディーでも高ガストリン血症の大腸癌への寄与は 8.6% と報告されている。一方、ガストリン/CCKBレセプターは正常の大腸粘膜には存在せず、主として中枢神経系と胃において発現しているが、大腸腺腫性ポリープにおいてはガストリンとガストリン/CCKBレセプターが各々 78%、81% の症例で発現し、ガストリン/CCKBレセプター遺伝子を発現するポリープの 97% はガストリンとガストリン/CCKBレセプターを共発現していることが報告されている。

癌遺伝子である ras は細胞の増殖、分化に関与し、活性化されればプロテインキナーゼカスケードを介して遺伝子発現を支配する転写因子に作用する。活性化 ras がガストリン遺伝子の発現を促進することが見い出されているが、大腸癌細胞において活性化 ras によってガストリンが誘導され、オートクライン機構によって細胞増殖が促進されると仮定すると、活性化 ras はガストリン/CCKBレセプターの遺伝子発現をも促進する可能性がある。そこで本研究者は、2つのヒト大腸癌細胞株 LoVo と Colo320HSR を用い、活性化 ras がガストリン/CCKBレセプター遺伝子の発現に及ぼす効果について検討した。

【方 法】

① ネステッド RT-PCR 法を用いて、LoVo、Colo320HSR より抽出した total RNA 中のガストリン/CCKBレセプター遺伝子の発現を検討した。

② 野生型の K-ras 遺伝子をもつ Colo320HSR に、ヒトガストリン/CCKBレセプター遺伝子のプロモーター領域 514 塩基対(-533 から -20)を含むルシフェラーゼレポーター GaR-Luc と、恒常的に野生型 Ha-ras 蛋白を発現する pCMV-Ras または第 12 アミノ残基がグリシンからバリニンに変異した活性型 Ha-ras 蛋白を発現する pCMV-RasV12 をトランスフェクションし、培養後ルシフェラーゼアッセイを行った。また、特異的な MEK インヒビターである PD98059 の影響を検討した。さらに活性化 K-ras 遺伝子をもつ LoVo を用いて、同様の検討を行った。

③ LoVo において、pCMV-RasV12 が内因性ガストリン/CCKBレセプター遺伝子の発現に及ぼす影響を RNase protection assay (RPA) を用いて検討した。また、PD98059 の影響を検討した。

【結 果】

① LoVo、Colo320HSR の両者において、特異的なガストリン/CCKBレセプター遺伝子の発現が認められた。

② Colo320HSR におけるガストリン/CCKBレセプターの転写活性は pCMV-RasV12 によって pCMV-Ras に比して約 2 倍に促進され、活性化 ras によって促進された転写活性は PD98059 によって抑制された。また LoVo におけるガストリン/CCKBレセプターの転写活性も pCMV-RasV12 によって pCMV-Ras に比して約 1.4 倍に促進され、活性化 ras によって促進された転写活性は PD98059 によって抑制された。

③ LoVo におけるガストリン/CCKBレセプター mRNA の発現は、pCMV-RasV12 によってコントロールの約 1.45 倍に促進され、PD98059 によって約 0.84 倍に抑制された。

【考 察】

ヒト大腸癌細胞株 LoVo および Colo320HSR において、活性化 ras (RasV12) はガストリン/CCKBレセプター遺伝子の発現を促進した。活性化 ras および PD98059 の効果は LoVo より Colo320HSR において顕著であったが、それは Colo320HSR が野生型 K-ras を有しているのに対して、LoVo が元々活性化 K-ras を有していることによるものと考えられた。また、特異的 MEK 阻害剤である PD98059 によって、活性化 ras によるガストリン/CCKBレセプター遺伝子の転写活性の促進が部分的に抑制されたことから、ガストリン/CCKBレセプター遺伝子の転写活性を刺激する ras 由来の細胞内シグナルは、Ras-Raf-MEK-ERK 経路のように MEK を含む情報伝達系を介していることが推測された。

本研究は活性化 ras がガストリン/CCKBレセプター遺伝子の発現を促進し、ガストリン遺伝子の発現促進と併せてオートクライン機構により大腸癌細胞増殖を促進している可能性があること、ならびに活性化 ras によるガストリン/CCKBレセプター遺伝子発現の促進が Ras-Raf-MEK-ERK シグナル伝達経路の活性化を介していることを初めて明らかにしたもので、価値ある集積と認める。よって、本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。