The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Transcriptional activation of the mouse Necl-5/Tage4/PVR/CD155 gene by fibroblast growth factor or oncogenic Ras through the Raf-MEK-ERK-AP-1 pathway
Author(s)	廣田, 健
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46232
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【78】

氏　　名	廣　田　　健（ひろ　た　たけし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２０１３５　号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学　位　論　文　名	Transcriptional activation of the mouse Necl-5/Tage4/PVR/CD155 gene by fibroblast growth factor or oncogenic Ras through the Raf-MEK-ERK-AP-1 pathway （線維芽細胞増殖因子およびがん遺伝子産物 Ras による Raf-MEK-ERK-AP-1 経路を介したマウス Necl-5/Tage4/PVR/CD155 の発現制御）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　高井　義美 （副査） 教　授　金倉　　譲　　教　授　宮坂　昌之

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目的　〕

接着分子ネクチンファミリーは、ホモまたはヘテロな接着活性をもち、種々の細胞間接着の形成に重要な働きをしている。ネクチンに構造上類似したネクチン様分子 Necl ファミリーのうち Necl-5 は、ラット、マウス、ヒトの大腸がんやヒトの悪性神経膠腫において発現が上昇している。これまでに、V12Ki-Ras で形質転換した NIH3T3 細胞において、Necl-5 の発現が上昇しており、Necl-5 が細胞の運動と増殖を促進することが明らかになっている。本研究では、NIH3T3 細胞を用いて V12Ki-Ras による Necl-5 遺伝子の発現促進機構について解析した。

〔　方法ならびに成績　〕

NIH3T3 細胞における V12Ki-Ras による Necl-5 プロモーターの活性化

Necl-5 の転写開始点は ATG より 56 bp 上流であった。Necl-5 の転写開始点より上流 2400、1000、600 bp から開始コドンまでをルシフェラーゼレポーターベクターpGL3Basic に挿入したコンストラクト pGL3B-2400、pGL3B-1000、pGL3B-600 を作成した。これらの Necl-5 プロモーターコンストラクトをがん遺伝子産物である V12Ki-Ras と NIH3T3 細胞に導入してルシフェラーゼ活性を測定した。pGL3B-2400、pGL3B-1000 のルシフェラーゼ活性は、V12Ki-Ras により活性化されたが、pGL3B-600 のルシフェラーゼ活性は、V12Ki-Ras により活性化されなかった。以上の結果から、V12Ki-Ras によって活性化される制御領域は－1000～－600 bp の間にあることが示唆された。次に、pGL3B-1000 を V12Ki-Ras と NIH3T3 細胞に導入し、MEK インヒビターU0126 存在下でルシフェラーゼ活性を測定すると、Necl-5 プロモーターの活性化は阻害された。また、pGL3B-1000 を MEK 恒常活性化体（MEK-DA）と NIH3T3 細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定すると Necl-5 プロモーターは活性化された。このことから、V12Ki-Ras による Necl-5 プロモーターの活性化には MEK が関与していることが示唆された。

V12Ki-Ras による Necl-5 プロモーターの活性化への AP-1 の関与

AP-1 結合部位（-753）に変異を導入した pGL3B-1000（-753ΔAP-1）を V12Ki-Ras と NIH3T3 細胞に導入し、

ルシフェラーゼ活性を測定するとNecl-5プロモーターの活性化は消失した。このAP-1結合部位（-753）へのAP-1の結合はゲルシフトアッセイにより確かめられた。これらのことから、V12Ki-RasによるNecl-5プロモーターの活性化にはAP-1が関与していることが示唆された。

血清または各種増殖因子刺激によるNecl-5 mRNA量の変化

NIH3T3細胞を血清のない培地で24時間培養した後、血清または増殖因子（FGF；線維芽細胞増殖因子、PDGF；血小板増殖因子）を添加し、mRNAを抽出した。抽出したmRNAを鋳型として、Necl-5 mRNA量をReal-time RT-PCRにより定量したところ、血清、FGF、PDGF刺激によりNecl-5のmRNAの増加が認められた。

血清、FGFによるNecl-5プロモーターの活性化へのRaf-MEK-ERK-AP-1経路の関与

NIH3T3細胞にNecl-5プロモーターコンストラクトpGL3B-2400を導入した後、血清を含まない培地で24時間培養した。MEKインヒビターU0126存在下、非存在下で血清もしくはFGF刺激してルシフェラーゼ活性を測定した。Necl-5プロモーターはどちらの刺激によっても活性化し、いずれもMEKインヒビターによってその活性化は阻害された。またNIH3T3細胞に、AP-1結合部位（-753）に変異を導入したNecl-5プロモーターコンストラクトpGL3B-2400（-753ΔAP-1）を導入した後、血清を含まない培地で24時間培養した。血清もしくはFGF刺激してルシフェラーゼ活性を測定すると、いずれの刺激によるNecl-5プロモーターの活性化も、AP-1結合部位（-753）の変異により消失した。これらのことより血清、FGF刺激によるNecl-5プロモーターの活性化にはRaf-MEK-ERK-AP-1経路の関与が示唆された。

〔　総括　〕

Necl-5は血清またはFGFによるRas-Raf-MEK-ERK経路の活性化を促進することから、Necl-5はRas-Raf-MEK-ERK-AP-1経路を介して自身の発現をpositiveに制御していると考えられる。Necl-5は細胞運動および細胞増殖を促進することから、このNecl-5発現のpositive feedback loopが細胞増殖および運動の制御に重要な役割を果たし、V12Ki-Rasによる継続的なNecl-5遺伝子発現の上昇ががん細胞の異常増殖と運動能の亢進に関与していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

細胞間接着により細胞運動や細胞増殖は低下するが、この接触阻害は形質転換により失われる。Necl-5は、ラット、マウス、ヒトの大腸がんやヒトの悪性神経膠腫において発現が上昇している。またがん遺伝子産物Rasで形質転換されたNIH3T3細胞において、Necl-5の発現が上昇しており、Necl-5は細胞の運動と増殖を促進する。

本申請者は、本研究において、Necl-5の発現を制御するシグナル経路について解析した。がん遺伝子産物RasによりNIH3T3細胞でNecl-5プロモーター活性は上昇し、この活性の上昇はRaf-MEK-ERK-AP-1経路を通して行われていることを見出した。また血清刺激および増殖因子であるFGF刺激によってもNecl-5プロモーター活性は上昇し、この活性の上昇もRaf-MEK-ERK-AP-1経路を通して行われていることを見出した。これらのことからがん遺伝子産物Rasおよび血清の下流にあると考えられる正常Rasにより、Necl-5の発現はRaf-MEK-ERK-AP-1経路を通して制御されていることが明らかになった。

本研究は、細胞運動や細胞増殖における分子メカニズムを解明する上で重要であり、実験結果自体の意義だけでなく、今後のがん研究への発展性も期待できる。したがって、博士（医学）の学位授与に値する。