

Palona Iryna 論文内容の要旨

主 論 文

BRAF^{V600E} Promotes Invasiveness of Thyroid Cancer Cells through NF- κ B Activation.

(BRAF 遺伝子変異による NF- κ B 活性化と甲状腺がん細胞浸潤亢進の関係)

パローナ・イリーナ、難波裕幸、光武範吏、ディミトロ・スタレンキ、
アレクセイ・ポドチェコ、イリア・セドリャロウ、大津留晶、
ウラジミール・サエンコ、永山雄二、梅澤一夫、山下俊一

(Endocrinology 2006 Sep 7; [Epub ahead of print])

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻
(主任指導教員代理：朝長万左男教授)

緒 言

RAF 蛋白のアイソフォームの一つである BRAF は、細胞増殖や分化などを制御する細胞内情報伝達系である MAP キナーゼ (MAPK) の活性化に関与している。成人発症甲状腺乳頭癌 (PTC) の約 30~60% に、*BRAF* 遺伝子コドン 600 に限局した活性化型点突然変異 (*BRAF^{V600E}*) が検出され、その結果、MAPK 経路の恒常的な活性化が示唆されている。*BRAF^{V600E}* 変異を有する PTC は、リンパ節転移、甲状腺外への浸潤など進行した病期が多いことを報告してきたが、詳細な悪性化の分子機構は不明である。そこで *BRAF^{V600E}* 変異が甲状腺癌細胞の悪性化にどのように関与するかを明らかにする為、*BRAF^{V600E}* を強制発現させた甲状腺癌細胞の細胞内情報伝達系と浸潤能との関係について解析を行った。

対象と方法

- 1) ヒト甲状腺癌細胞株; 濾胞癌由来の WRO 細胞(野生型 BRAF)、乳頭癌由来の NPA 細胞(*BRAF^{V600E}*)、未分化癌由来の KTC-3 細胞(野生型 BRAF)を使用した。
- 2) テトラサイクリン誘導 *BRAF^{V600E}* 細胞 (*Tet-BRAF^{V600E}* 細胞); WRO 細胞に Tet 応答プラスミド *pTRE-BRAF^{V600E}* と調節プラスミド *pTet-On* (*Tet-On* システム; クローンテック社) を二重導入し、薬剤選択後 *Tet-BRAF^{V600E}* 細胞株を樹立した。
- 3) *BRAF^{V600E}* アデノウイルスベクター作成; E1 欠損アデノウイルスベクターに *BRAF^{V600E}* 遺伝子を組み込み、HEK293 細胞で増殖させた後、CsCl 濃度勾配法にて精製した。
- 4) NF- κ B の活性解析; 核タンパクを細胞から抽出し、I κ B- α 、NF- κ B、p65、p50 のそれぞれのウエスタンブロットと NF- κ B DNA binding assay を行なった。

5) 浸潤能の解析；ケモタキセル（クラボウ株式会社）を用いて *In vitro* 細胞培養下における移動度を計測した。

結 果

- 1) *Tet-BRAF^{V600E}*細胞および *BRAF^{V600E}*アデノウイルスを感染させた細胞いずれにおいてもリン酸化 ERK およびその下流遺伝子サイクリン D1 の発現レベルが増加し、MAPK 経路の活性化を確認した。
- 2) *BRAF^{V600E}* を強制発現させた細胞群では、NF- κ B の活性化調節分子である I κ B- α の分解が促進され、NF- κ B の構成分子 p65 と p50 の DNA 結合能増強が証明された。この *BRAF^{V600E}* による NF- κ B 活性化は、NF- κ B 特異的阻害薬 DHMEQ により阻害されたが、MEK 阻害薬 U0126 では阻害されなかった。
- 3) *BRAF^{V600E}* を強制発現させた細胞群では、NF- κ B の下流に位置する抗アポトーシス関連遺伝子 *IAP-1*、*-2* や浸潤能に関与する遺伝子群 *MMP-1*、*-9* の発現増加がみられた。ケモタキセルを用いて浸潤能を比べたところ、*BRAF^{V600E}* 強制発現細胞 (WRO、KTC-3、NPA) において、コントロール細胞に比べ有意な浸潤能の増強を認めた。

考 察

成人発症甲状腺乳頭癌(PTC)の約 70%においては、*RET/PTC*、*Ras*、*BRAF*遺伝子のいずれかに遺伝子異常を認め、最終的に MAPK を恒常的に活性化していると考えられる。しかし、同じ PTC の診断でも、潜伏微小癌から、大半予後良好な臨床癌に加えて、少ないながら低分化、未分化転化の可能性を有するものまで幅広く存在する。さらに病理組織型でも異なる特徴を有しており、*RET/PTC*再配列異常をもつ PTC では、Solid variant、*Ras* 遺伝子変異をもつ PTC は、Follicular variant そして *BRAF* 遺伝子変異をもつ PTC では、Classical papillary type と Tall cell variant が主たる病理亜型であり、genotype-phenotype の関係解明が進んでいる。この事実は、PTC の各遺伝子変異に伴う共通の MAPK 経路活性化だけではなく、*RET/PTC*、*Ras*、*BRAF*遺伝子異常に、それぞれ特有な細胞内情報伝達経路の活性化の違いの存在が示唆される。実際、DNA マイクロアレイ解析によりこれら変異遺伝子の違いにより一部の遺伝子群で発現量変化の違いが認められている。

本研究は、*BRAF^{V600E}*変異により甲状腺外浸潤やリンパ節転移を引き起こす機序を探求することを目的とし、そのために *Tet-BRAF^{V600E}*細胞と *BRAF^{V600E}*アデノウイルス感染細胞を作成し細胞内情報伝達系の解析をおこなった。その結果、*BRAF^{V600E}*により MAPK 経路の活性化のみならず、NF- κ B の活性化も誘導されることが判明した。この NF- κ B 経路の活性化は、MEK-MAPK 経路の活性化によっては誘導されないことが確認された。さらに NF- κ B 経路の活性化により下流標的遺伝子として抗アポトーシス作用や浸潤作用を持つ IAPs や MMPs の発現増加が証明された。さらに *In vitro* 培養系で浸潤能を検討し、*BRAF^{V600E}*強制発現細胞がより有意に浸潤能が亢進していることを証明した。

以上、本研究成果により、*BRAF^{V600E}*を有する PTC では、MAPK 活性化以外に NF- κ B の活性化を介して直接浸潤能が亢進するという新知見が明示された。今後、甲状腺癌分子標的治療の展開へつながるものと期待される。