

新規ヘッジホッグシグナル関連因子による

乳癌幹細胞制御機構とその生体内機能の解明

申請者：愛知医科大学医学部

病理学講座 准教授 笠井 謙次

共同研究者：愛知医科大学医学部

病理学講座 講師 稲熊 真悟

同 大学院生 陸 美穂

近年、「癌幹細胞」なる特殊な癌細胞分画が存在し、癌の発生・転移あるいは薬剤耐性に於いて重要な役割を果たしていることが提唱されている。

乳癌・大腸癌においても細胞表面抗原や各種酵素活性を指標にした癌幹細胞の同定と関連シグナルの解析が進められ、こうした癌幹細胞としての細胞特性に必要なシグナルとして、Wnt・NOTCH・Hedgehog シグナルに注目が集まっている。特に Hedgehog シグナルは、その下流転写因子 GLI1・GLI2 が BMI1・Nanog (クロマチン制御) や ABCG2 (薬剤耐性因子)、VEGF-A (血管新生)、CXCR4 (細胞遊走) など癌幹細胞に発現増強している遺伝子群を活性化することから、癌幹細胞の鍵を握るものとして重要視されているが、その活性化あるいは制御機構は十分解明されていない。

本研究課題では、当研究室にて同定され機能解析を進めている Hedgehog シグナルの新規制御因子 TSHZ2 の機能から、乳癌幹細胞の細胞特性を解析すると共に、作成した TSHZ2 および GLI 2 の遺伝子導入マウスを用いて、乳腺の形成・成熟および腫瘍化の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

まず TSHZ2 に着目する契機として、正常乳腺組織と乳癌 (DCIS を含む) 組織で異なる発現量を示す遺伝子を Oncomine データベースから抽出した。その結果、乳癌組織で過剰発現する遺伝子 3 種と乳癌組織で発現抑制された遺伝子 4 種を同定した。これら 7 種の発現パターンは同一症例での正常乳腺組織と乳癌組織との比較において概ね確認された。またヒト乳腺上皮細胞初代培養とヒト乳癌細胞株での遺伝子発現の比較においても同様の結果が得られた。これら遺伝子のうち、乳癌組織にて発現抑制されたものの一つに TSHZ2 があつた。これまで TSHZ2 は 4 つの zinc-finger ドメインを有する核内蛋白であることが知られ

ていたが、その機能解析は全くなされていなかった。そこで我々は TSHZ2 のアミノ酸配列を各種予測ソフトを用いて解析し、近接する二つの核移行シグナルを同定した。これら二カ所の変異体 TSHZ2 は核集積が低下することから、同部位依存性の核集積であることと考えた。次に乳癌での発現抑制があることから、TSHZ2 は遺伝子発現抑制機構に関与するものとの推測のもと解析すると、遺伝子発現抑制蛋白として重要な CtBP1/2 結合部位を同定した。同じく同部位の変異体 TSHZ2 では免疫沈降実験にて CtBP2 との複合体形成能を失い、また GAL4 癒合 TSHZ2 と GAL4 binding site を含むルシフェラーゼレポーターを用いた実験では TSHZ2 の CtBP 結合部位および CtBP2 依存性にルシフェラーゼ遺伝子発現抑制能が確認された。以上から TSHZ2 は元来遺伝子発現抑制に関わる核内蛋白で、乳癌での発現抑制を見ることから腫瘍抑制因子として機能していると考えた。

TSHZ2 の *Drosophila* ortholog として知られていた Teashirt は従来 Hedgehog シグナル系の転写因子 Ci による形質発現に干渉することが知られていたため、TSHZ2 も Ci のヒト homolog である GLI1・GLI2 の遺伝子発現機構に作用する可能性を検討した。培養細胞を用いた免疫沈降実験から TSHZ2 は CtBP2 と共に GLI1・GLI2 と核内において三者複合体を形成し、また GLI1/GLI2 の標的遺伝子である、CXCR4 のプロモーター活性を抑制した。このことから TSHZ2 はヒト乳癌細胞での sphere 形成性など癌幹細胞に重要な GLI1/2 の機能を抑制するものであることが推測された。たしかに TSHZ2 を強制発現させたヒト乳癌細胞株 MCF7 形成する sphere は対照に比べて小さかった。これらから我々は、TSHZ2 は癌幹細胞においてその GLI1/2 機能を抑制し、ある種「休止期」(dormancy)にさせる機能があることを推測している。

さらに我々は、乳腺上皮細胞特異的に導入遺伝子を発現させる mouse mammary tumor virus (MMTV) プロモーターを用いた遺伝子導入マウス (MMTV-TSHZ2 および MMTV-GLI2) を作成した。現在これらマウスを用いて乳腺組織の形成・成熟異常や幹細胞分画の異常および腫瘍化の検討を行っている。