主論文の要旨

c-Rel Promotes Invasion of Choriocarcinoma Cells via PI3K/AKT Signaling

（c-RelはPI3K/AKTシグナルを介して絨毛癌細胞の浸潤を促進する）

名古屋大学大学院医学系研究科　健康社会医学専攻
発育・加齢医学講座　産婦人科学分野
（指導　：　吉川 史隆　教授）
関谷 陽子

【緒言】

絨毛性疾患は栄養膜細胞の異常増殖をきたす疾患の総称であり、胞状奇胎、侵入奇胎、絨毛癌、胎盤部トロホブラスト腫瘍、類上皮性トロホブラスト腫瘍が含まれる。胞状奇胎以外の 4 つの疾患は寛解に化学療法や外科治療を必要とする腫瘍であり、絨毛癌はあらゆる種類の妊娠や侵入奇胎から続発する悪性腫瘍である。絨毛癌は化学療法が有効であるため生存率は 90%だが、肺以外の臓器への転移を伴う場合は寛解が非常に困難である。絨毛癌の発がんメカニズムについては、正常胎盤や胞状奇胎と比較し絨毛癌組織で高発現、または低発現しているいくつかのがん遺伝子、がん抑制遺伝子などの報告があるが、未だに解明されていない。

NF-κB は細胞の生存、増殖、接着や細胞微小環境に関わる遺伝子群の発現を調節する転写因子群の総称であり、RelA(p65)、RelB、c-Rel、NF-κB1、NFκB2 の 5 つが属している。NF-κB は主に炎症反応に関与するとされてきたが、様々ながんにおいても重要な役割を担っていることが分かってきた。c-Rel も炎症性腸疾患、関節リウマチ、さらには乳がん、胃がん、頭頸部がん、膵がんなどの固形腫瘍の悪性化に関与しているといった報告もある。また、絨毛外栄養膜細胞（EVT）や絨毛癌細胞株である Jar の核内において c-Rel と NF-κB1 が 2 量体を形成しているが合胞体栄養膜細胞には存在せず、c-Rel が栄養膜細胞の浸潤に関与している可能性があるとする報告もある。

今回の研究では、絨毛性疾患と胎盤組織での NF-κB の発現および絨毛癌における c-Rel の役割の解明を目的とした。

【方法】

1)胎盤、胞状奇胎、絨毛癌細胞株、ヒト EVT 由来の HTR-8/SVneo 細胞株における NF-κB ファミリータンパクの発現を Western blot 法及び免疫組織科学染色で確認した。また、免疫沈降法で絨毛癌細胞において c-Rel がどのタンパクと 2 量体を形成しているか確認した。

2) 絨毛癌細胞株 Jar 及び Bewo を用いて siRNA による c-Rel の発現抑制を行い、増殖能、遊走能、浸潤能への影響をそれぞれ MTS assay、trans-well assay、wound healing assay にて検討した。

3) c-Rel の発現抑制による増殖能、遊走能、浸潤能の変化のメカニズムを解析するため、ゼラチンザイモグラフィーにてトロホブラストやがんの浸潤に関与する MMP-2、MMP-9 の活性を評価した。また、トロホブラストの遊走や浸潤では MAPK、PI3K シグナルが重要な役割を果たすと報告されていることから、c-Rel の発現抑制によるこれらのシグナルの変化を Western blot 法にて検討した。

4) Bewo を用いて c-Rel の過剰発現を行い、増殖能、遊走能、浸潤能への影響を検討し、さらに AKT 阻害剤を用いて浸潤能の変化を確認した。

【結果】

1)Western blot 法では、p65 と NF-κB1 は胎盤、胞状奇胎、絨毛癌細胞株、HTR-8/SVneo

すべてにおいて高発現であり、RelB と NF-κB2 は絨毛癌細胞株と比較し胎盤、胞状奇胎で高発現であった。一方 c-Rel は絨毛癌細胞株と HTR-8/SVneo で高発現、胎盤、胞状奇胎では低発現であった(Fig.1a)。免疫沈降法では Jar、Bewo ともに c-Rel と p65 が 2 量体を形成している可能性が示唆された(Fig.1b-e)。また、免疫組織学染色では c-Rel は絨毛癌組織では高発現、正常絨毛や胞状奇胎では低発現であり、p65 は絨毛癌組織での発現は正常絨毛や胞状奇胎と同等であった(Fig.2a-l)。この結果は Western blot 法の結果と一致した。

2)siRNA を用いた c-Rel の発現抑制による MTS assay では、48 時間で Jar では 16.0%、Bewo では 8.9%、72 時間で Jar では 28.2%、Bewo では 18.3%と増殖能が抑制されたが有意差は Jar においてのみ認められた(Fig.3d; $p<0.01$)。Trans-well assay では、遊走能、浸潤能ともに Jar、Bewo で有意に抑制されたが(Fig.4a,b; $p<0.01$)、c-Rel の発現抑制による遊走能の抑制効果は Bewo より Jar で強く(40.4%, 15.6%)、浸潤能の抑制効果も同様の傾向であった(58.3%, 13.4%)。Wound healing assay でも Jar、Bewo ともに c-Rel の発現抑制で遊走能が抑制された(Fig.4c)。これらの結果から絨毛癌細胞において c-Rel の発現抑制が増殖能、遊走能、浸潤能を低下させることが示された。

3) ゼラチンザイモグラフィーでは、c-Rel の発現抑制にて Jar、Bewo ともに MMP-2、MMP-9 の変化を認めなかった(Fig.5a)。Western blot 法で MAPK、PI3K シグナルの変化を確認したところ、Jar、Bewo ともに c-Rel の発現抑制により phosphorylated AKT(pAKT)の発現の低下を認めたが、phosphorylated ERK(pERK)の発現には変化を認めなかった(Fig.5b)。このことから絨毛癌細胞において c-Rel が PI3K/AKT シグナルを介して増殖能、遊走能、浸潤能を促進していることが示唆された。また、cleaved PARP と cleaved caspase-3 の発現が増加しており(Fig.5c)、c-Rel の発現抑制が絨毛癌細胞をアポトーシスへ誘導している可能性も示唆された。

4)Bewo の c-Rel 過剰発現による MTS assay では、72 時間で増殖能が 16.7%亢進されたが有意差は認めなかった(Fig.6b)。Trans-well assay では、遊走能、浸潤能ともに 242.6%、184%と有意な上昇を認めた(Fig.6c; $p<0.01$)。Bewo に c-Rel 過剰発現しさらに AKT 阻害剤である LY294002 を添加することで浸潤能に変化があるかを検討したところ、浸潤能が有意に抑制された(Fig6e; $p<0.01$)。

【結論】

NF-κB ファミリーに属する c-Rel の発現は絨毛癌細胞で高く、正常絨毛では低く、絨毛癌細胞において c-Rel は p65 と 2 量体を形成していた。

絨毛癌細胞における c-Rel の発現抑制は、増殖能、遊走能、浸潤能、および AKT のリン酸化を抑制した。また、過剰発現では遊走能、浸潤能が亢進し、PI3K 阻害剤にて浸潤能が抑制された。

これらのことから c-Rel が PI3K/AKT シグナルを介して絨毛癌細胞の浸潤能に重要な役割を担っている可能性が示唆された。