

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790560

研究課題名（和文） 肺癌における癌抑制遺伝子の新規候補とその機能解析

研究課題名（英文） new candidates and their functional analysis of tumor suppressor gene in lung cancer

研究代表者

小松 直樹 (NAOKI KOMATSU)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：60335940

研究成果の概要：先行実験でのマイクロアレイの実験データから、肺癌細胞株において発現が抑制されており、脱メチル化剤とヒストン脱アセチル化阻害剤の処理によりその発現が回復した遺伝子を検索し、この中からいまだ報告されていない癌抑制遺伝子の新規候補の探索をおこない、いくつかの遺伝子が新規候補として挙げられた。それらの遺伝子については、実際に、肺癌組織でその発現が高頻度に抑制されていることが確認された。また、*Per1* 遺伝子の発現の有無は予後に影響せず、発癌自体に影響する可能性が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌、癌抑制遺伝子、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

肺癌は世界中で癌死亡原因の第一位になりつつあるにもかかわらず、その治療成績は現在の抗癌剤では奏効率 20～30%であり、決して満足の得られるものではない。このため治療法、特に治療薬に関しては breakthrough が急がれる。

近年、肺癌において既存の抗癌剤とはまったく違う新しい抗癌剤すなわち分子標的治療薬の開発が進んでいるが、その開発の根拠

になったのが *EGFR* 遺伝子の変異によるシグナルの恒常的活性化が発癌に関与するという知見であった。このことが gefitinib, erlotinib といった *EGFR* に対するチロシンキナーゼ阻害剤の創薬に結びつき新規抗癌剤として脚光を浴びている。この一例が示すように、癌と遺伝子異常に関する知見の集積が治療の開発や創薬に直結する。しかし肺癌に関与する遺伝子の特定についてはいまだ不十分であるため、その作業は今なお世界中

で競って行われている。

発癌に関与する遺伝子がどのようにして正常の機能を失うかについては2通りのメカニズムがある。ひとつは遺伝子の塩基配列の変化、genetic changeである。たとえば癌抑制遺伝子 *p53* の変異は肺癌でも関与しており、遺伝子の変異によりその正常の機能が失われあるいは抑制される。他方、近年は遺伝子変異以外のメカニズム、epigenetic change が注目されており、遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG islands のメチル化と、その周囲のヒストン蛋白の脱アセチル化がその代表である。これらは独立して、あるいはお互いに共役して遺伝子の発現の制御に関わっていると考えられ、この部分に異常が生じると癌抑制遺伝子は発現ができなくなり、結果、その機能を失う (gene silencing)。実際、肺癌においては例えば *p16* や *FHIT* 遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG islands に hypermethylation が報告され、さらにそのことが再発リスクの因子になりうることも示唆されている。他にも epigenetic change が報告されている遺伝子はあるものの、しかしそのほとんどは以前から genetic change が報告されている遺伝子であり、新規の遺伝子が発見されたという報告はまれである。肺癌は heterogeneous な腫瘍であるため様々な遺伝子異常が発癌に関与していると考えられているが、現在までに報告された遺伝子だけでは発癌を十分には説明できず、実際、gefitinib や erlotinib による薬剤抵抗性・耐性化が問題になり、単独の遺伝子だけをターゲットにした抗癌剤治療はうまくいっていないのが現状である。

2. 研究の目的

このため治療戦略の面からも新たな責任遺伝子群の特定が必要不可欠である。上述のように、癌抑制遺伝子は癌細胞においては epigenetic change によりその発現を抑制され機能を失っている可能性がある。逆に、CpG islands のメチル化の除去やヒストンの脱アセチル化酵素の阻害によって epigenetic change を修復できれば、抑制されていた癌抑制遺伝子の発現・機能を正常化させ、抗腫瘍効果が得られることが期待できる。このような観点から、本研究の全体構想として、肺癌において epigenetic change によって機能していない新規の癌抑制遺伝子群を明らかにし、それらの遺伝子の機能解析を行うことによって、肺癌における発癌の新たなメカニズムを解明することで新規創薬につなげることを目標とした。

筆者はまず、脱メチル化剤 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine, DAC) と、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬のひとつ、Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, vorinostat) で肺癌細胞株 (NCI-H520) を処理し、未処理の肺癌細胞株と比べて発現が多くなった遺伝子をマイクロアレイで網羅的にスクリーニングした。この結果、149 遺伝子が DAC+SAHA 後に発現レベルが上昇し、癌抑制遺伝子の候補として挙げられた。このなかで最初に注目したのは *per1* 遺伝子である。*per1* 遺伝子は生体の日内リズムを制御する遺伝子のひとつであり、最近、この遺伝子の異常が発癌に関与する可能性が報告されたが、発癌との関係やそのメカニズムに関しては大部分が未解明のままであった。筆者らは *Per1* について機能解析を行い、*Per1* が tumor suppressor としての働きをもつことを世界で初めて報告した。この報告については Developmental Cell 誌でも紹介されている。また、肺癌においてはこの癌抑制遺伝子 *Per1* はヒストンの脱アセチル化により発現が抑制され機能していないことを突き止め、これを報告した。

また、筆者らは *CYR61* 遺伝子にも着目した。この遺伝子は肺癌や子宮内膜癌では癌抑制遺伝子としての働きを持つことが報告されているが、脳腫瘍や乳癌では oncogenic な働きをもつという報告もあり、その機能についてはいまだ未解明な部分が残されていた。そこで筆者らは *CYR61* を発現している乳癌細胞株 (MDA-MB-231) において *CYR61* を RNA interference によりノックダウンし機能解析をおこない、その結果を報告した。また *CYR61* は、肺癌患者において、その発現の抑制が独立した予後不良因子になることも報告した。

また、筆者は DAC と SAHA が肺癌細胞株に対して殺細胞的に作用することを発見し、そのメカニズムとして p21 が関与することを報告した。Epigenetic change によって抑制されていた癌抑制遺伝子の発現・機能が、DAC や SAHA により回復し、その結果、癌細胞の増殖を抑制したり、アポトーシスを誘導したりすることが証明されたのである。

以上のような今までの研究結果を踏まえ、本研究の目的は、肺癌における新規治療薬の開発を最終目的とした基礎実験をおこなうことであり、そのなかで本研究の役割は、肺癌に関与する新規の癌抑制遺伝子を特定し、それら遺伝子の機能解析をおこなうこととした。これにより肺癌に関係するシグナル経路を明らかにすることで発癌のメカニズムを解明し、新規治療薬の開発へとつなげていくことを目標とするのである。具体的には、次の2点とした。

1). 先行実験の結果として得られた遺伝子

候補群のなかからさらに新規癌抑制遺伝子の候補を検索する。

2). 新規の癌抑制遺伝子の候補について機能解析をおこない、発癌のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

まず、最近報告した癌抑制遺伝子 *per1* 遺伝子について、肺癌との関与についてさらに深く調べるため、具体的には、*Per1* を正常に発現している群と発現していない群とで、予後に違いがあるかどうか統計学的解析をおこない調べてみた。

これとは別に、マイクロアレイのデータから得られた新規癌抑制遺伝子候補リストのなかから他の候補になりうる遺伝子の検索を行った。癌抑制遺伝子になりうる条件として考えられたのは、①正常肺組織で発現しており、肺癌組織で発現が低下していること、また本研究は遺伝子の CpG islands のメチル化により遺伝子の発現が抑制される遺伝子群の検索であることから、②CpG island を持つ遺伝子であること、である。これらの条件でまずはスクリーニングをおこなう。①については、UCLA のウェブサイト上にある GMOD で正常肺組織のデータベースのなかから発現レベルをチェックし、肺癌組織との比較については、ウェブサイト ONCOMINE 上のデータベースのなかから検索を行った。②については、UCSC のウェブサイト上にある genome browser で CpG island の有無の検索をおこなった。この2つの条件を満たした遺伝子について、どの遺伝子を解析していく候補とすることについては、それぞれの遺伝子について今まで過去に報告されてきた文献上で示唆されている機能を参考にしながら、癌抑制的に働く可能性があるかどうかを判断していた。

その後、候補の遺伝子を絞り込んだ上で、その遺伝子の発現レベルが、肺癌細胞株 NCI-H520 を使って行ったマイクロアレイの実験結果と同じように、DAC+SAHA で回復するかどうか、real time qPCR により、NCI-H520 以外の数種類の肺癌細胞株でも検討した。

肺癌細胞株レベルで DAC+SAHA 処理により遺伝子発現の回復が確認できた候補遺伝子については、さらに肺癌患者からの臨床検体、同一患者からの肺癌組織と正常肺組織を用いて、実際に発現が低下しているかどうかを real time qPCR を用いて発現レベルの解析を行った。この結果により、癌抑制遺伝子の一条件として正常肺組織で発現しており肺癌組織で発現が低下しているということが証明できた遺伝子を今後の機能解析の候補として絞り込んでいく。

また、その遺伝子の発現抑制の機序としてどのような epigenetic change が関与してい

るのかを検討した。候補遺伝子の CpG islands にメチル化が存在するかどうかを

methylation specific PCR (MSP) で確認し、存在する場合は Bisulfate sequencing PCR (BSP) を用いて DNA のメチル化の頻度や程度を評価していくこととした。

4. 研究成果

非小細胞性肺癌における癌抑制遺伝子の新規候補であると我々が報告した日内変動遺伝子 *Per1* の発現の有無が、予後に関して独立した因子になりうるかどうかについて、臨床経過が追跡可能であった症例を用いて統計学的解析をおこなった。その結果、*Per1* のメッセージ発現レベルが正常組織と比較して50%以下に抑制されている患者群と、50%以上である患者群とで全生存率を比較検討した結果、統計学的有意差は認められなかった。このことから *Per1* 発現の低下は肺癌の予後や悪性度には寄与せず、発癌自体に関与している可能性が示唆された。加えて、*Per1* を乳癌など他の癌種の細胞株で強制発現させると細胞増殖が抑制されたという実験データも考慮すると、*Per1* は肺癌のみならず、他の癌種においても発癌に寄与する普遍的な tumor suppressor である可能性が示唆された。非小細胞性肺癌においては、現在、p53 と RB の2系統の経路が癌抑制的に働くと考えられているが、*Per1* がこの経路に集約されるのか、あるいは独立した癌抑制系経路を形成しうるのかはいまだ解明されておらず、発癌に普遍的に関与する経路も考慮しながら、*Per1* の target gene に関する知見の集積が今後の検討課題であると考えられた。

一方、マイクロアレイ実験から得られている遺伝子リストのなかから *Per1* 以外で新規癌抑制遺伝子の候補について検索を行った。上述した方法で、癌抑制遺伝子としての条件に合致する遺伝子のなかで特に未報告の新規候補になりうるものについて絞り込んでいった結果、6つの遺伝子、*ATF3*、*GADD45β*、*RAI3*、*NDRG1*、*SNN*、*DSIPI* がその可能性が非常に高いと推測された。これら6つの遺伝子はすべて、マイクロアレイによる実験データで DAC+SAHA 処理後にその遺伝子発現が2倍以上に回復しているものだった。これらの遺伝子について、まず種々の肺癌細胞株 (NCI-H520、NCI-H460、NCI-H522、Calu6) で DAC+SAHA 処理による発現の変化を調べた結果、マイクロアレイで使用した NCI-H520 はもちろん、すべての肺癌細胞株で同様に発現が低下していることが確認され、かつ DAC+SAHA 処理した肺癌細胞株では遺伝子の発現が2倍以上に回復することがいくつかの細胞株で確認され、総じて発現が回復する傾向があることも確認された。なかでも、*ATF3*、*GADD45β*、*RAI3*、*NDRG1* においてその傾向が

はっきりしていた。このため、*ATF3*、*GADD45β*、*RAI3*、*MDR1* については肺癌患者の臨床検体を用いて発現の解析を行った。real time qPCRにより、各遺伝子の肺癌組織内での発現を同一患者の正常肺組織と比較した結果、*ATF3*では58% (14/24)、*GADD45β*では55% (6/11)、*RAI3*では48% (12/25)、*MDR1*では27% (3/11)の症例で肺癌組織での発現が正常肺組織よりも50%以下に低下していた。

このなかでまず、*ATF3* 遺伝子に着目した。この遺伝子は現時点では転写因子であるCREB 蛋白ファミリーのひとつであり、他の遺伝子の転写活性を調節していると考えられている。現在までに p53 の安定性を調節したり (cell cycle 2006;5:926)、p53 のユビキチン化を抑制することで活性を維持したり (EMBO J 2005;24:2425) と、p53 に関する報告がされており、また、前立腺癌で知られる癌抑制遺伝子 KLF6 のアポトーシスを誘導する働きを持つことも報告されている (J Biol Chem 2008;283:29795)。総じて、癌抑制遺伝子としての可能性が考えられ、本研究でも肺癌組織で発現が抑制されていることが確認されていることから、この遺伝子についてどのようなメカニズムで発現が抑制されているのか検討を行った。本実験では肺癌細胞株を DAC+SAHA で処理した後に遺伝子発現の回復がみられていることから、遺伝子のメチル化について methylation specific PCR 法でメチル化の定性を試みた。その結果、デザインしたプライマーでは非メチル化だけが確認されメチル化は確認できなかった。これに関しては本当にメチル化がないのか、あるいはプライマーをデザインした CpG island の場所に問題がある可能性も残されており、確定のためには bisulfite sequencing PCR 法で CpG island 全体をチェックしてみることが今後の検討課題となった。いずれにせよ、この遺伝子の癌抑制遺伝子としての可能性は、他の癌腫を含めいまだ報告はないものの、現在までの報告によるその機能を考慮すると、十分に可能性は高く、実際、肺癌組織では発現がおちていることは本実験で明らかとなった。Tumor suppressor であることを証明するため、遺伝子の機能解析を行うことが急務である。

このように肺癌においては多くの癌抑制遺伝子とその発現を抑制され、発癌や腫瘍増殖に関与していることが示唆されており、本実験結果からその可能性の高い遺伝子群を同定することができた。そのどれもが、現在までに癌抑制遺伝子の可能性が示唆されるような報告がではじめてはいるものの、まだ特定の癌腫では報告がなく、本研究内容から肺癌での tumor suppressor としての報告ができることを確信している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

①小松 直樹、ヒストン脱アセチル化阻害剤である SAHA は非小細胞性肺癌細胞株の増殖を抑制する、第 48 回日本呼吸器学会学術講演会、平成 20 年 6 月 17 日、神戸コンベンションセンター、神戸

②小松 直樹、日内変動蛋白 Per1 は非小細胞性肺癌における新規癌抑制遺伝子の候補である、日本癌学会学術総会、平成 19 年 10 月 5 日、パシフィコ横浜、神奈川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 直樹 (NAOKI KOMATSU)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：60335940