

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570191

研究課題名（和文） 新規腫瘍増殖経路の解析

研究課題名（英文） Search for New Cancer Cell Growth Pathway

研究代表者

太田 力（OHTA TSUTOMU）

独立行政法人 国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：10290892

研究成果の概要（和文）：肺がんは難治がんの一つで死亡率・罹患率は増加傾向にある。そこで、肺がんの細胞増殖に関与する新規経路の探索を行った。その結果、転写因子という蛋白質が肺がんの細胞増殖能経路で重要な役割を果たしていることがわかった。さらに、乳がんの手術組織および細胞株を用いて、がん部特異的に働いている蛋白質の解析を行った。その結果、DNA複製因子という蛋白質が乳がんの細胞増殖能経路で重要な役割を果たしていることがわかった。

研究成果の概要（英文）：The lung cancer is one of intractable cancers, and a tendency to increase has the death rate, the prevalence. Therefore I searched for the new system that participated in cell proliferation of the lung cancer. As a result, I identified that the protein called the transcription factor played an important role in lung cancer cell proliferation. Furthermore, I analyzed the gene expression in tissues and cell lines of breast cancer. As a result, I identified that the protein called the DNA replication factor played an important role in breast cancer cell proliferation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：転写

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 日本では毎年 7 万人以上が肺がんによって死亡しており、更にその死亡率、罹患率は増加傾向にある。肺がんは手術による治療が中心であるが、術後再発や転移によって死亡する症例も多く、有効な抗がん剤の開発に対する期待は高い。しかし、肺がんに対して抗

がん剤の効果は非常に低いのが現状である。最近、幾つかのがんで分子標的薬がその効果を発揮することが示されているが、肺がんにおいては上皮成長因子受容体 EGFR や血管内皮細胞増殖因子 VEGF を標的とした薬剤の効果は報告されているに過ぎない。従って、肺がんにおいても主要な腫瘍増殖経路を見

出し、それら経路で働く因子を分子標的とした新薬の開発に対する期待は高い。そこで、申請者は遺伝子発現解析を利用して肺癌において発現が亢進している遺伝子を探索し、診断マーカーや分子標的として利用可能な因子の探索を行うことを目的に研究を進めてきた。肺癌由来の培養細胞 12 株を用いて転写因子 Nrf2 の下流因子の発現量を調べてみたところ、実に 6 株の培養細胞株で発現量が高いことがわかった。そこで、これら細胞 6 株を用いて Nrf2 蛋白質の細胞内局在を調べたところ全ての細胞で核内に局在していることを見出した。通常酸化ストレス非存在下において、Nrf2 蛋白質は Keap1 蛋白質によって細胞質内に留め置かれ核内に移行しないように厳密に抑制されていることから、これら細胞において KEAP1 あるいは NRF2 遺伝子に変異が入っているのではないかと予想を立て遺伝子異常を解析した。その結果、4 株の細胞で KEAP1 遺伝子に、2 株の細胞で NRF2 遺伝子に変異を見出した。次いで肺癌手術組織を解析したところ肺腺がん 30 症例中 7 症例（約 25%）で KEAP1 遺伝子に変異を同定し、また、扁平上皮肺癌 60 症例中 12 症例（約 20%）で NRF2 遺伝子に変異を同定した。さらに、見出した変異をもつ Keap1 および Nrf2 蛋白質の機能解析を行ったところ、どちらの変異においても Keap1 蛋白質と Nrf2 蛋白質の結合活性が失われていることを見出した。つまり、KEAP1 あるいは NRF2 遺伝子に変異が導入された肺癌細胞は酸化ストレス非存在下においても Nrf2 が核内に流入し、恒常的に Nrf2 が活性化されていたのである。そこで、申請者は Nrf2 の活性化が腫瘍細胞の増殖に影響しているのかをみるため、siRNA を作用させ NRF2 遺伝子の発現をノックダウンさせてみた。その結果、NRF2 遺伝子の発現をノックダウンさせた場合、腫瘍細胞の増殖が著しく阻害されることを見出した。この結果から、転写因子 Nrf2 の恒常的活性化は肺癌の細胞増殖亢進に関与することがわかった。さらに、申請者らは活性型 NRF2 遺伝子をもつ肺癌患者さんの予後が極めて悪いことを見出しており、肺癌において転写因子 Nrf2 の異常活性化による細胞増殖亢進は患者さんの予後と強く関連することがわかった。

(2) 現在、日本人女性のがん罹患率のトップは「乳がん」であり、その罹患率は今後も増加することが予想されている。乳がんは転移能が高く、他の臓器に転移すると治療に困難が生じ亡くなる人も少なくない。従って、化学療法に対する期待は高い。しかし、乳がんに対する抗がん剤の効果は未だ不十分であり、有効な抗がん剤の開発が強く望まれている。近年、乳がんで過剰発現している HER2

遺伝子のがん増殖への関与が見出され、HER2 遺伝子産物を標的とした抗がん剤ハーセプチンが開発され効果を示し始めた。しかし、まだ標的となる因子の数が絶対的に不足しているため、分子標的の探索は今後重要な課題である。

## 2. 研究の目的

(1) 以上の背景(1)から、転写因子 Nrf2 の恒常的活性化による細胞増殖亢進の作用機序が理解できれば、将来、この経路で働く因子を標的とした薬剤開発に応用でき、肺癌患者さんの生存期間の延長および死亡率の大幅な減少が期待できるのではないかと考えた。そこで、本研究は転写因子 Nrf2 の下流で働く細胞増殖亢進がどのような分子機構で引き起こされているのかを解明することを目的とした。

(2) 以上の背景(2)から、乳がんで過剰発現している因子を理解できれば、将来、この経路で働く因子を標的分子とした薬剤開発に応用でき、乳がん患者さんの生存期間の延長および死亡率の大幅な減少が期待できるのではないかと考えた。そこで、乳がん特異的に発現の亢進している因子を検出し、その中から治療の標的分子となりうる因子の探索とその因子の機能解析を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 転写因子 Nrf2 の活性化によって引き起こされる肺癌細胞株の増殖制御機構のエンドポイントの探索：恒常的に転写因子 Nrf2 が活性化された肺癌細胞株（KEAP1 遺伝子および NRF2 遺伝子に変異が見出されている肺癌由来の培養細胞）において NRF2 遺伝子特異的な siRNA を作用させ（NRF2 遺伝子の発現をノックダウンさせ）、細胞増殖阻害を誘発させる。次に、増殖阻害のかかった細胞を用いてカスパーゼの活性やゲノム DNA の分解等を解析し、アポトーシス誘導が起こっているのかを観察する。また、増殖阻害のかかった細胞を FACS (fluorescence activated cell sorting) で解析し、細胞が特異的な細胞周期で停止しているのか測定し、細胞増殖阻害がどのようなメカニズムで起こっているのかを解析する。上記解析でアポトーシスや細胞周期停止が観察されない場合が想定される。その場合には、恒常的に Nrf2 が活性化された肺癌細胞株において NRF2 遺伝子特異的な siRNA を作用させ、その細胞をそのまま顕微鏡下で数日間時系列的に観察し、細胞の形状や分裂速度の変化（遅延等の変化）から細胞増殖阻害がどのように引き起こされるのかを推察する。

(2) 転写因子 Nrf2 の恒常的活性化によって引き起こされる肺がん細胞株の増殖亢進カスケードの探索：上記 (1) と同様に恒常的に Nrf2 が活性化された肺がん細胞株 (KEAP1 遺伝子および NRF2 遺伝子に変異が見出されている肺癌由来の培養細胞) において NRF2 遺伝子特異的な siRNA を作用させ、NRF2 遺伝子の発現をノックダウンさせる。次に、NRF2 遺伝子の発現がノックダウンした細胞から RNA を抽出し、DNA チップ (アフィメトリックス社) を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行なう。この解析から、恒常的に Nrf2 が活性化された肺がん細胞内で、Nrf2 依存的に活性化されている遺伝子を抽出する。上記解析で Nrf2 依存的に活性化されている遺伝子の数が多数出てきて絞り込みが出来ない場合が想定される。その場合には、肺がん手術組織を用いた遺伝子発現解析から得た遺伝子リストや NRF2 欠失マウス-Keap1 欠失マウスの遺伝子発現解析から得た遺伝子リストを用いて Nrf2 依存的に活性化されている遺伝子を絞り込む。

(3) 転写因子 Nrf2 蛋白質複合体の解析：これまでの研究から、細胞核内では Nrf2-sMaf ヘテロ複合体蛋白質が形成されていること、CBP 蛋白質や ATF4 蛋白質等が Nrf2 蛋白質の活性化を助けることが知られている。最近、申請者は BRG1 蛋白質も上記補助因子として働くことを見出しており、細胞核内において Nrf2 蛋白質は他の多くの蛋白質と複合体を形成していることが予想される。そこで、N 末端に His6-Flag-tag を挿入した NRF2 遺伝子を発現させた細胞を作成し、細胞核内において形成される Nrf2 蛋白質複合体を分離し、Flag 抗体を用いたアフィニティーカラム精製を行い、Nrf2 蛋白質複合体を精製する。精製票品を質量分析器を用いて解析し、その構成因子を見出す。

(4) 乳がんで過剰発現している因子の探索：乳がんの手術検体および培養細胞株の DNA マイクロアレイによる網羅的解析を行い、乳がん特異的に発現の亢進している因子を抽出し、その中から治療の標的となりうる因子の探索を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 転写因子 Nrf2 の活性化によって引き起こされる肺がん細胞株の増殖制御機構のエンドポイントの探索：恒常的に Nrf2 が活性化された肺がん細胞株 (KEAP1 遺伝子および NRF2 遺伝子に変異が見出されている肺癌由来の培養細胞) において NRF2 遺伝子特異的な siRNA を作用させ (NRF2 遺伝子の発現をノ

ックダウンさせ)、細胞増殖阻害を誘発させ、カスパーゼ活性の変化を調べてみたが、コントロール siRNA を作用させた場合と差がなくアポトーシス誘導は起こっていないことがわかった。そこで、恒常的に Nrf2 が活性化された腫瘍細胞において NRF2 遺伝子特異的な siRNA を作用させ、その細胞を生きのまま顕微鏡下で 2 日間時系列的に観察したところ、ある特定の細胞周期で止まるのではなく、細胞周期全体の速度が遅延することがわかった。

(2) 転写因子 Nrf2 の活性化によって引き起こされる肺がん細胞株の増殖亢進カスケードの探索：恒常的に Nrf2 が活性化されている肺がん細胞株 (KEAP1 遺伝子および NRF2 遺伝子に変異が見出されている肺癌由来の培養細胞) において NRF2 遺伝子特異的な siRNA を作用させ、NRF2 遺伝子の発現をノックダウンさせた。この細胞から RNA を抽出し、DNA チップ (アフィメトリックス社) を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行なった。その結果、恒常的に Nrf2 が活性化された肺がん細胞内で、Nrf2 依存的に活性化されている遺伝子約 200 個を抽出した。これら遺伝子の中には解毒カスケードや酸化ストレスカスケードで働く因子が 80% 以上含まれていた。これら 2 つのカスケードで働く因子を除く遺伝子約 40 個の siRNA を用いて、腫瘍細胞の増殖亢進に関与する遺伝子探索を行っているが、足場依存細胞増殖能、あるいは、足場非依存細胞増殖能に影響する遺伝子の発見には至っていない。

(3) 転写因子 Nrf2 蛋白質複合体の解析：N 末端に tag を挿入した NRF2 遺伝子を発現させた細胞を用いて細胞核内における Nrf2 蛋白質複合体の精製を試みたが、質量分析解析に使える量を得ることが出来なかった。この理由として、Nrf2 は細胞内で分解が速く起こっていることが挙げられる。そこで、Nrf2 蛋白質の分解に関わっている N 末端領域の 100 アミノ酸を欠失し、その N 末端に tag を挿入し、細胞内での分解が抑制される変異型 NRF2 を恒常的に発現する細胞の構築に成功した。この細胞株を用いて細胞核内における Nrf2 蛋白質複合体の部分精製を行ったところ、分子量は 2 Md を超す、巨大な複合体を形成していることがわかった。現在、この細胞株の大量培養を行っており、今後、転写因子 Nrf2 蛋白質複合体の分離・精製を行い、質量分析器を用いてその構成因子を見出す予定である。

(4) 乳がんで過剰発現している因子の探索：5 人の患者さんのがん部および非がん部組織から mRNA を精製し、DNA マイクロアレイによる網羅的発現解析を行った。その結果、

5人中3人で共通してがん部組織特異的に発現亢進している遺伝子が約40個見出した。これら40個の遺伝子の発現を、乳がん細胞株で解析したところ、12個の遺伝子が正常乳腺細胞株より発現が亢進していることがわかった。12個の遺伝子の中から、今までがんと関係が報告されていなかった *Psf1* 因子に注目し、siRNAを用いて、乳がん細胞株での影響を観察したところ、細胞の増殖抑制効果があることがわかり、乳がん治療の標的分子となりうる可能性を見出した。

#### 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 1件)

(1) Nakahara I, Miyamoto M, Shibata T, Akashi-Tanaka S, Mogushi K, Oda K, Ueno M, Takakura N, Mizushima H, Tanaka H, and **Ohta, T\***. (**Ohta, T\* is a corresponding author.**) Up-regulation of *PSF1* Promotes the Growth of Breast Cancer Cells. *Genes Cells* **15**, 1015 -1024 (2010). Doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01442.x

[学会発表] (計 5件)

(1) 大野 (宮本) 麻美子、太田 力 Molecular Analysis of Synovial Sarcoma (滑膜肉腫発症機構の解明). 第70回日本癌学会学術総会. 2011年9月3日. 名古屋.

(2) 太田 力. 網羅的遺伝子発現解析を用いた抗がん剤抵抗性機構の解明. 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同大会. 2010年12月14日. 神戸.

(3) 宮本麻美子、太田力. Constitutive activation of Nrf2 provides advantages for lung cancer cell growth. (Nrf2の恒常的な活性化は肺癌細胞の増殖亢進に働く). 第69回日本癌学会学術総会. 2010年9月7日. 大阪.

(4) 山本雅之、柴田龍弘、太田 力、Kit Tong, 黒河博文、鈴木貴史、田口恵子、本橋はずみ. Double-edged Sword of the Nrf2-Keap1 stress Response System: Carcinogenesis and Cancer Chemoprevention. (Nrf2-Keap1 ストレス応答系は両刃の剣: 発癌獅子作用と化学発癌予防作用). 第68回日本癌学会学術総会. 2009年9月9日. 横浜.

(5) 中原 泉, 柴田龍弘, 鈴木華絵, 水島洋, 上野将也, 高倉伸幸, 田中 博, 太田力. Comprehensive analysis of new

therapeutic targeting gene in Breast Cancer. (乳がんにおける新規治療ターゲット因子の網羅的探索と機能解析). 第68回日本癌学会学術総会. 2009年9月8日. 横浜.

[その他]

ホームページ等

[http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/omics\\_bioinformatics/omics\\_bioinformatics.html](http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/omics_bioinformatics/omics_bioinformatics.html)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

太田 力 (OHTA TSUTOMU)

独立行政法人 国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号: 10290892

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: