

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 5月2日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790753

研究課題名（和文）ヒト肺癌の発生・進展過程におけるリネジ特異的シグナルの統御メカニズムの解明

研究課題名（和文）Lineage-specific survival signal of lung adenocarcinoma on the lung development master regulator

研究代表者

山口 知也 (YAMAGUCHI TOMOYA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70452191

研究成果の概要（和文）：

末梢肺の分化に關与する TTF-1 遺伝子は、リネジ特異的マスター調節因子として細胞分化に寄与する一方で、その発現持続が肺腺癌の生存に必須であり発癌と進展に大きく關与する。我々は、TTF-1 遺伝子により特異的に調節される遺伝子 DOT-2 を同定した。DOT-2 は ROCK1 の機能調節を介してアクチンストレスファイバーの形成を阻害し、癌細胞の運動能・転移能を抑制することを明らかにした。また、このように肺腺癌の進展にとって不利に働くと考えられる DOT-2 の発現は、そのプロモーター領域の DNA メチル化によって抑制されていることが明らかとなった。今回の研究により、TTF-1 の発現が肺腺癌の生存に必須であるにも関わらず、なぜ TTF-1 を発現している肺腺癌は臨床的予後が良いのかという疑問に対して、DOT-2 というこれまで殆ど機能不明であった分子が、その原因の一端を担っている可能性が強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Sustained TTF-1 expression plays a crucial role in the survival of lung adenocarcinoma, in addition to the development and maintenance of cell lineages in normal lung. In this study, we identified DOT-2, as a TTF-1-regulated gene, and we showed that DOT-2 inhibited assembly competence-conferring phosphorylation of the myosin regulatory light chain (RLC) as well as activating phosphorylation of LIM domain kinase (LIMK), unexpectedly through its direct physical interaction with Rho kinase 1 (ROCK1) rather than with RLC. Consequently, DOT-2 inhibited ROCK1 and negatively regulated actomyosin organization, which in turn reduced single cell motility and increased collective cell migration, resulting in decreased cancer invasion and metastasis. Finally, we also show that DOT-2 is epigenetically inactivated by promoter DNA methylation in a fraction of TTF-1-positive lung adenocarcinomas, which appears to be in accordance with its deleterious functions in lung adenocarcinoma invasion and metastasis, as well as with the paradoxical association of TTF-1 expression with favourable prognosis in lung adenocarcinoma patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：肺腺癌、TTF-1、リネジ特異的マスター調節因子、リネジ特異的シグナル、発がん、遊走能、浸潤能、転移能

1. 研究開始当初の背景

癌の分子病態の基盤を成す細胞・組織システムの恒常性の破綻は、シグナル伝達機構の異常により惹起される。近年、特定の系統細胞の分化プロセスに関与するリネジ特異的マスター調節因子が、発癌プロセスにも関与するという新しい概念が提唱され、組織特異的な発癌メカニズムの解明に寄与するものとして、大きな注目を集めている。

最近、我々は末梢肺の分化に関与する TTF-1(Thyroid Transcription Factor-1)遺伝子が、リネジ特異的マスター調節因子として細胞分化に寄与する一方で、その発現持続が肺腺癌の生存にも必須であり、発癌と進展に大きく関与することを、世界に先駆けて報告した。同様の知見は、その後、海外の主要な研究グループからも相次いで報告され、肺腺癌における TTF-1 の重要性を示唆するものとなった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肺腺癌におけるリネジ特異的マスター調節因子 TTF-1 が制御する分子メカニズムを解明することであり、TTF-1 特異的な発癌プロセスを明らかにし、リネジ特異的生存シグナルという新しい癌化シグナルの本態を解明することである。

さらに、肺腺癌がリネジ特異的依存を示す TTF-1 遺伝子そのものは、肺の生理機能に必要なサーファクタントタンパク質の産生に必要なことから、必然的に肺腺癌の分子標的とはなり得ないため、肺腺癌での TTF-1 による標的遺伝子、及び標的遺伝子を介した分子機序の解明を行うことが本研究の目的でもある。

3. 研究の方法

- (1) リネジ特異的マスター調節因子 TTF-1 によって調節される遺伝子群の同定

不死化ヒト正常末梢気道上皮細胞株 (HPL1D)を用いて、マイクロアレイ解析により TTF-1 遺伝子を導入した際に発現変動が認められる遺伝子群(以下、Downstream of TTF-1 (DOT)と称す)の同定を行った。

- (2) 肺腺癌での TTF-1 による DOT-2 の発現制御機構の解析

TTF-1 発現細胞株を用いて、DOT-2 の発現誘導を調べ、また RNA 干渉法を用いて

TTF-1 の発現抑制下における肺腺癌細胞での DOT-2 の発現を調べた。さらに、レポーター解析やクロマチン免疫沈降法を通じて転写調節因子 TTF-1 による DOT-2 の転写制御の可能性を検討した。

- (3) 肺腺癌における DOT-2 プロモーター領域でのメチル化による発現抑制の検討

肺腺癌細胞株や臨床検体を用いて、TTF-1 と DOT-2 の発現の相関を確認した。さらに、同サンプルを使って、Methylation specific PCR 解析を行い、CpG 配列におけるメチル化の有無を調べた。

- (4) DOT-2 発現による遊走能・浸潤能・転移能の評価

DOT-2 導入細胞株や DOT-2 発現抑制肺腺癌細胞株を用いて、細胞運動能アッセイ、スクラッチアッセイ、マトリゲル浸潤能解析、3D-マトリゲル浸潤能解析を行い、DOT-2 発現変化における遊走能および浸潤能の評価を行った。さらに、DOT-2 導入肺腺癌細胞株あるいは DOT-2 発現抑制肺腺癌細胞株を用いたヌードマウスへの異種移植実験を行い、*in vivo* における肺への転移能を調べた。

- (5) 肺腺癌における DOT-2 発現による形態学的解析と細胞運動・細胞骨格制御分子との相互作用による分子メカニズムの解析

細胞免疫染色法により、DOT-2 導入細胞株や DOT-2 発現抑制肺腺癌細胞株における細胞骨格への影響を調べた。また、生化学的解析を通して、上記の細胞株を用いて細胞運動・細胞骨格制御分子との相互作用やリン酸化状態を調べることにより、DOT-2 の細胞運動・細胞骨格における分子機序の解明を行った。さらに、3D-マトリゲル浸潤能解析や細胞-細胞間接着能の評価を加えることでより詳細な DOT-2 の機能解析を行った。

4. 研究成果

- (1) リネジ特異的マスター調節因子 TTF-1 によって調節される遺伝子群の同定

マイクロアレイ解析によって、一過性に発現させた TTF-1 遺伝子導入によりベクターコントロールと比べて、最も有意に発現上昇が認められる遺伝子として DOT-2 遺伝子を同定した。

(2) 肺腺癌での TTF-1 による DOT-2 の発現制御機構の解析

一過性あるいは恒常的に発現させた TTF-1 発現細胞株を用いて、DOT-2 の発現誘導を調べたところ、どちらの発現系においても DOT-2 の発現誘導が認められた。また、肺腺癌細胞株を用いて TTF-1 の発現を抑制させると、特異的に DOT-2 の発現低下が認められた。さらに、DOT-2 プロモーター領域には、転写因子である TTF-1 の結合コンセンサス配列が 2 箇所存在した。そこで、このプロモーター領域を組み込んだレポーターを用いたルシフェラーゼアッセイ法と、TTF-1 結合コンセンサス配列に対するクロマチン免疫沈降法を行った。その結果、TTF-1 蛋白質はこれら 2 箇所の TTF-1 結合コンセンサス配列に直接結合し、DOT-2 の発現調節を転写レベルで行われていることを見出した。

(3) 肺腺癌における DOT-2 プロモーター領域でのメチル化による発現抑制の検討

肺腺癌細胞株や臨床検体を用いて、TTF-1 と DOT-2 の発現の相関を確認したところ、肺腺癌細胞株において TTF-1 の発現が高いにもかかわらず、DOT-2 の発現が低い細胞株が認められた。同様に、肺腺癌の臨床検体における TTF-1 と DOT-2 の発現には正の相関が見られたが、TTF-1 を高発現しているにもかかわらず、DOT-2 の発現が低い臨床検体も存在した。これらの TTF-1 高発現/DOT-2 低発現の細胞株について検討を加えた結果、プロモーター領域のメチル化によって DOT-2 の発現抑制が生じていることが明らかとなった。さらに、Methylation specific PCR 解析を行った結果、正常肺組織と TTF-1 陽性/DOT-2 陽性の臨床検体に比べて TTF-1 陽性/DOT-2 陰性の臨床検体では、TTF-1 結合部位近傍に存在する CpG 配列に高度なメチル化を認めた。

(4) DOT-2 発現による遊走能・浸潤能・転移能の評価

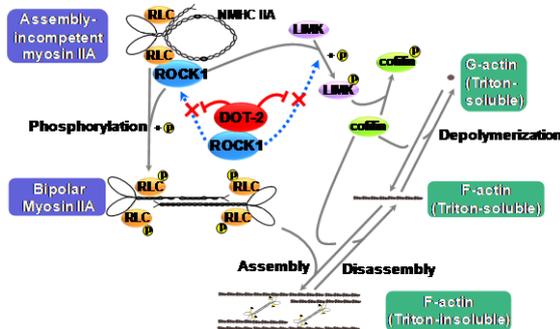
MDCK 細胞株を用いて DOT-2 を高発現させると、遊走能や浸潤能を抑制することを見出した。また、TTF-1 の過剰発現によっても細胞遊走能は抑制されたが、DOT-2 の発現抑制により部分的にキャンセルされた。さらに、DOT-2 導入肺腺癌細胞株あるいは DOT-2 発現抑制肺腺癌細胞株を用いたヌードマウスへの異種移植実験により、DOT-2 が *in vivo* において肺転移能を抑制していることを明らかにした。また、DOT-2 高発現を示す肺腺癌臨床検体では病理学的に浸潤性が低いことも見出した。

(5) 肺腺癌における DOT-2 発現による形態学的解析と細胞運動・細胞骨格制御分子との相互作用による分子メカニズムの解析

細胞免疫染色法を用いて、DOT-2 を MDCK 細胞に発現させると、アクチン・ミオシンの配交が乱れることを見出した。また、生化学的機能解析により、この現象はアクチンのストレスファイバーの形成が阻害されていることで起きていることが分かった。さらに、DOT-2 導入細胞株では、それらの配交の形成・維持を司る myosin regulatory light chain (RLC) と LIM domain kinase (LIMK) のリン酸化反応が低下していることが分かった。DOT-2 の分子機序を明らかにするために、生化学的機能解析を行った結果、DOT-2 は Rho kinase 1 (ROCK1) と直接結合し、RLC のリン酸化を抑制すると同時に ROCK1 と RLC の結合も阻害することが明らかとなった。我々はさらに DOT-2 における ROCK1 との結合部位を同定し、そのドメインを欠損させた DOT-2 を細胞株に発現させたところ、アクチン・ミオシンの配交の乱れは認められなくなることを確認した。また、前述の DOT-2 による細胞遊走能の抑制も ROCK1 の機能抑制を介したものであることを確認した。次に、我々は 3D-マトリゲル浸潤能解析を行い、DOT-2 の詳細な機能解析を行った。DOT-2 を過剰発現させた場合、細胞浸潤能が有意に低下し、その際に各々の細胞は塊を形成し集団性の細胞運動 (collective cell migration) を呈した。対照的に、DOT-2 発現抑制肺腺癌細胞株では、ROCK1 の機能を介して個々の細胞はそれぞれが単一単位としてマトリゲル内を浸潤することが分かった。さらに、細胞-細胞間接着能を調べたところ、DOT-2 発現抑制肺腺癌細胞株では、ROCK1 を介して有意に細胞間接着能が低下していた。対照的に、DOT-2 を過剰発現させた場合には増加していることが明らかとなった。また、DOT-2 の発現を抑制させると、E-cadherin の発現量に変化はないが、細胞膜表面への E-cadherin の局在が低下することが判明した。

以上の結果から、今回我々は、DOT-2 が TTF-1 によって転写レベルで発現調節を受け、ROCK1 の機能調節を介してアクチンストレスファイバーの形成を阻害し、癌細胞の運動能・転移能を抑制することを明らかにした。また、このように肺腺癌の進展にとって不利に働くと考えられる DOT-2 の発現は、そのプロモーター領域の DNA メチル化によって抑制されていることが明らかとなった。今回の研究により、TTF-1 の発現が肺腺癌の生存に必須であるにもかかわらず、なぜ

TTF-1 を発現している肺腺癌は臨床的に予後が良いのかという疑問点に対して、DOT-2 という今まで殆ど機能の分かっていなかった分子が、その原因の一端を担っている可能性が強く示唆された。



【図 肺腺癌における DOT-2 の分子機序】

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 2 件)

- ① Yasuyuki Hosono, Tomoya Yamaguchi, Eri Mizutani, Kiyoshi Yanagisawa, Chinatsu Arima, Shuta Tomida, Yukako Shimada, Michiyo Hiraoka, Seiichi Kato, Kohei Yokoi, Motoshi Suzuki, Takashi Takahashi
MYBPH, a transcriptional target of TTF-1, inhibits ROCK1, and reduces cell motility and metastasis
The EMBO Journal 31; 481-493 (2012)
査読有
- ② Tomoya Yamaguchi, Kiyoshi Yanagisawa, Ryoji Sugiyama, Yasuyuki Hosono, Yukako Shimada, Chinatsu Arima, Seiichi Kato, Shuta Tomida, Motoshi Suzuki, Hirotaka Osada, Takashi Takahashi
NKX2-1/TITF1/TTF-1-Induced ROR1 Is Required to Sustain EGFR Survival Signaling in Lung Adenocarcinoma Cancer Cell, (2012) in press 印刷中
査読有

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/molcar/jp/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
山口 知也 (YAMAGUCHI TOMOYA)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70452191
- (2) 研究分担者
研究分担者なし
- (3) 連携研究者
連携研究者なし