

平成21年 6月1日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590347
 研究課題名（和文） 染色体脆弱部位関連がん抑制遺伝子の機能解析と発癌メカニズムの解明
 研究課題名（英文） The roles of the common fragile site-related tumor suppressors in the process of development of human malignancies.
 研究代表者
 仙波 秀峰（SEMBA SHUHO）
 神戸大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：00302092

研究成果の概要：がんは遺伝子の病気であり、染色体レベルでの欠失や転座が生じやすい部分には、『がん抑制遺伝子』と呼ばれる細胞のがん化を抑制している遺伝子が存在するのではという仮説がある。本研究は、染色体脆弱部位に存在する Fragile histidine triad (FHIT) 遺伝子、WW domain-containing oxidoreductase (WWOX) 遺伝子産物に注目し、その機能解析とヒト悪性腫瘍発生メカニズムについて各種検討を行った。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,600,000 | 780,000 | 3,380,000 |
| 2008年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：Fhit、Wwox、口腔癌、膵臓癌

1. 研究開始当初の背景

膵癌は悪性度が高く、予後の悪い悪性腫瘍である。膵前癌性病変と考えられている膵管上皮内腫瘍性病変（pancreatic intraepithelial neoplasia; PanIN）から浸潤癌に至るまで、その背景にある異常として、多くの癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異が指摘されているが、いまだに不明な点も多い。

ヒトゲノムにおける染色体脆弱部位は環境発癌物質に影響を受けやすく、また種々の悪性腫瘍において欠失が見られる。例えば、多くのヒト悪性腫瘍においてFRA3Bにおけるhomozygous欠失や染色体異常が見られ、この領域に存在するfragile histidine triad

(FHIT) 遺伝子の発現消失を引き起こす。癌細胞においてFHIT遺伝子を発現させると、アポトーシスが誘導されることから、Fhitは腫瘍抑制機能を有することが示唆されている。

2. 研究の目的

WW domain-containing oxidoreductase (WWOX) 遺伝子は、染色体脆弱部位 FRA16D に位置し、乳腺、食道やその他のヒト悪性腫瘍においてWWOX遺伝子座のヘテロ接合性の喪失 (LOH) やプロモーター領域のDNAメチル化、その結果としてのWwox発現消失が観察される。WwoxタンパクはN末端にWW domainを2

個 (WW1 と WW2) 持ち、C 末端に SDR domain を有する構造をしている。最近の研究で、Wwox はヒト悪性腫瘍において p73 や Ap-2 γ の局在を制御することによる腫瘍抑制機能を持つが、特に WW1 domain は、この部位に含まれる 33 番目のチロシンを変化させると ErbB-4 や Jun と結合しなくなることから、タンパク結合にとって重要部位であることが示唆されている。

本研究では、膵癌由来細胞にアデノウイルスベクターを用いて WWOX を発現させ、細胞増殖やアポトーシスに及ぼす Wwox の効果を調べるとともに、膵癌組織とそれに隣接する PanIN 病変における Wwox 発現についても検討し、膵癌発生過程における Wwox の役割を検討した。

3. 研究の方法

細胞培養と組織標本：

Wwox 発現陰性のヒト膵癌由来細胞株 PANC-1 細胞と、神戸大学病院にて外科的に切除された浸潤性膵管癌 32 症例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた。組織病理学的診断は膵癌取扱い規約 (第 5 版、日本膵臓学会編) に準じて行った。

免疫プロット：

抗 Wwox 抗体 (オハイオ州立大学、Kay Huebner 教授 供与)、抗 procaspase-3、procaspase-8、Smad4、Smad2/3 抗体 (Cell Signaling 社)、抗 GFP 抗体 (MBL 社)、抗 β -actin 抗体 (Sigma 社) をウエスタンプロット、免疫組織化学に用いた。

遺伝子導入：

野生型 WWOX と非特異的対照として GFP を遺伝子導入するアデノウイルスベクター (Ad-WWOX、Ad-GFP) を用いた。また、Invitrogen 社の発現ベクター pRcCMV を用いて、野生型 pWWOX、33 番目のチロシンをアルギニンに変異させた pWWOX-Y33R、SDR-domain を欠損させた p Δ WWOX、p Δ WWOX-Y33R の種々の発現ベクターを作成して使用した。

フローサイトメトリーと caspase-3 活性分析：

フローサイトメトリーには FACS キャリバーサイトメーター (BD Biosciences 社) を使用した。Caspase-3 活性は Sigma 社の測定キットを用いて分析した。

細胞増殖解析、コロニー形成分析と腫瘍形成能分析：

細胞増殖解析は、 1×10^5 の PANC-1 細胞を 100-mm plate に撒き、Ad-WWOX、Ad-GFP を感染させ、24 時間ごとに細胞数をカウントした。

コロニー形成分析は 100-mm plate に撒いた 1×10^4 の PANC-1 細胞に野生型 WWOX と種々の変異型 WWOX 発現ベクターを導入し、48 時間後に細胞をメタノール固定、ギムザ染色して可視コロニー (直径 0.5 mm 以上) をカウントした。腫瘍形成能分析は、Ad-WWOX、Ad-GFP を感染させ 24 時間経過した後、 1×10^6 の PANC-1 細胞をヌードマウスの皮下に注入し、形成された腫瘍の大きさを一週間に 2 回計測した。

免疫組織化学染色：

免疫組織化学的分析に、Dako 社の LSAB キットを用いて、Wwox と Smad4 の発現を解析した。Wwox 発現は、発現が 5%未満のものを (-)、5-50%に発現が見られるものを (+)、50%以上に発現が見られるものを (++) と判定した。Smad4 発現は、発現量が 50%未満のものを (-)、50%以上のものを (+) と判定した。

統計解析：

カイ二乗検定、スチューデントの t 検定、カプランマイヤー法、ログランク検定を使用して、P 値が 0.05 以下のとき、統計学的に有意差があるものとして判定した。

4. 研究成果

WWOX 発現回復による caspase 依存性アポトーシス誘導と腫瘍増殖抑制：

PANC-1 細胞に Ad-WWOX を感染させ 48 時間後にフローサイトメトリーにて解析すると、感染量依存的に sub G1 の割合増加がみられた。Wwox 発現陰性膵癌細胞 PK-1 にても同様の結果が得られたが、Wwox 発現陽性膵癌細胞 PK-9 ではその効果が減じていた。WWOX を遺伝子導入すると caspase-3 活性も感染量依存的に上昇し、procaspase-3、procaspase-8 の発現は共に減少した。一方、細胞増殖並びに腫瘍形成能についても解析を行ったところ、WWOX 導入群では有意な細胞増殖の抑制、腫瘍形成障害が確認された。同様に各種 WWOX 発現ベクター導入後コロニー形成を解析したところ、野生型ならびに SDR-domain 欠損群ではコロニー形成抑制効果が見られたが、Y33 変異群ではその効果が消失していた。

膵管発癌における Wwox 発現の低下：

Wwox は正常膵管上皮においては細胞質に強い発現が見られるが、膵管上皮内腫瘍性病変 PanIN grade が進むほど発現が低下する傾向にあり、膵癌組織においては大部分の症例で低下あるいは消失していた。また、Wwox 発現低下とリンパ節転移陽性との間に有意な関係がみられた ($P = 0.026$)。さらにマイクロサテライト解析、メチル化特異的 PCR を行ったところ、WWOX 遺伝子座 (D16S3029) の

LOHは22%、promoter領域のDNAメチル化は20%に観察されたのに対し、exon1領域のDNAメチル化は83%の症例に認められた。また、外科的切除が行われた膵癌32症例において、Wwox発現が低下している群(-、+)と保たれている群(+++)とで予後を比較すると、発現が保たれている群が予後良好(P=0.024)であった。

膵癌細胞におけるWwoxが介するSmad4発現の回復:

TGF- β -Smadシグナル伝達経路におけるWwoxの役割を調べるため、WwoxとSmad4発現との関係を解析した。Smad4発現消失症例ではWwox発現が低下している傾向があり、PANC-1細胞にWwoxを遺伝子導入したところ、Smad4の発現上昇が観察された。

いくつかの癌細胞株や癌組織において、FHIT遺伝子を含む染色体脆弱部位FRA3Bにおけるhemizygousあるいはhomozygous欠失がみられ、染色体脆弱部位関連遺伝子の欠失やタンパク発現の消失が、悪性腫瘍において細胞の形質転換、不死化を引き起こすと言われている。本研究では、膵癌細胞と組織標本を用いて、染色体脆弱部位FRA16Dに位置するWwox遺伝子の解析を行い、正常膵組織と比較し癌細胞ではWwoxタンパクの発現低下がみられた。Wwox遺伝子座であるD16S3029におけるLOHは22%に認めるのみであったが、Wwox発現制御部位のDNAメチル化は高頻度に観察され、メチル化によるWwoxのepigeneticな発現抑制が膵癌発生に重要であることが示唆された。

膵管における前癌病変から浸潤癌に至る過程における分子遺伝学的分析がなされ、遺伝子異常の蓄積により細胞形態学的に悪性度が進行すると言われている。Wwoxタンパク発現低下も、癌遺伝子(KRASやHER-2)産物や癌抑制遺伝子(CDKN2A、TP53やSMAD4)産物の遺伝子異常の蓄積を促進させて、膵管病変の形質変化を引き起こす可能性が考えられる。また、Wwox発現低下はリンパ節転移陽性や予後不良といった膵癌の悪性度と相関がみられたことから、膵癌発生と膵癌の進行において重要な役割を持つことが示唆される。

本研究において、Wwox発現回復とアポトーシス誘導、細胞増殖抑制が密接に関連していることを示した。Ludes-Meyersらは、PPXY motifがWwoxのN末端に存在するWW1 domainと結合することを報告し、p73、Ap-2 γ やJunなどの転写因子がWwoxと結合するタンパクとして同定されている。興味深いことに、Wwoxを遺伝子導入するとタンパクレベルに

においてSmad4の発現増加が認められた。SMAD4遺伝子は、膵癌の50%に発現消失がみられる癌抑制遺伝子である。Smad4はTGF- β シグナル伝達経路に属し、TGF- β 受容体が活性化されるとSmad2/3と複合体を形成して核へ移行し、p15やp21などを介して腫瘍抑制機能を発揮する。Wwoxの腫瘍抑制機能にTGF- β -Smadシグナル伝達経路が関与する可能性が示唆されるが、WwoxによるSmad4発現増加機構の解明にさらなる研究が必要である。

また、本研究課題に関連して、ヒト口腔癌発生及び進展過程におけるFHIT遺伝子変異とDNAチェックポイント機構との関連についても研究を行い、①Fhitが口腔癌発生過程において非常に早期から発現低下を来すこと、②FHIT遺伝子発現回復がDNAチェックポイントの中心的役割を果たすChk2のリン酸化レベルを増加させること、③Fhitノックアウトマウスにおいても上記結果が確認されることを併せて報告した。

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 5件)

① Nakayama S, Semba S, Maeda N, Matsushita M, Kuroda Y, Yokozaki H. Hypermethylation-mediated reduction of Wwox expression in intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas. Br J Cancer 2009, May. 5;100(9), 1438-1443 査読有.

② Yutori H, Semba S, Komori T, Yokozaki H. Restoration of fragile histidine triad expression restores Chk2 activity in response to ionizing radiation in oral squamous carcinoma cells. Cancer Sci 99; 524-530, 2008 査読有.

③ Nakayama S, Semba S, Maeda N, Aqeilan RI, Huebner K, Yokozaki H. Role of the Wwox gene, encompassing fragile region FRA16D, in suppression of pancreatic carcinoma cells. Cancer Sci 9; 1370-1376, 2008 査読有.

④ Cantor JP, Iliopoulos D, Rao AS, Druck T, Semba S, Han SY, McCorkell KA, Lakshman TV, Collins JE, Wachsberger P, Friedberg JS, Huebner K. Epigenetic modulation of endogenous tumor suppressor expression in lung cancer xenografts suppresses tumorigenicity. Int J Cancer 120; 24-31,

2007 査読有.

⑤ Fuku T, Semba S, Yutori H, Yokozaki H. Increased wild-type p53-induced phosphatase-1 (Wip1 or PPM1D) expression correlated with downregulation of checkpoint kinase 2 in human gastric carcinoma. Pathol Int 57; 566-571, 2007 査読有.

〔学会発表〕(計 3件)

① 松下麻衣, 中山俊二, 仙波秀峰, 横崎宏. 大腸癌における癌抑制遺伝子 WW domain containing oxidoreductase (WWOX) の発現についての検討. 第 67 回日本癌学会総会, 10/28-30, 2008 名古屋.

② 柚島宏和, 仙波秀峰, 古森孝英, 横崎宏. 口腔扁平上皮癌細胞において FHIT 遺伝子の修復は DNA 損傷応答における Chk2 の活動性を回復させる. 第 67 回日本癌学会総会, 10/28-30, 2008 名古屋.

③ 中山俊二, 仙波秀峰, 横崎宏. 浸潤性膵管癌、膵管内乳頭粘液性腫瘍における癌抑制遺伝子 WWOX の発現の検討. 第 67 回日本癌学会総会, 10/28-30, 2008 名古屋.

6. 研究組織

(1) 研究代表者:

仙波秀峰 (SEMBA SHUHO)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 00308092

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者: なし