

平成21年5月30日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590358
 研究課題名（和文）Egr-1により誘導される癌抑制遺伝子の網羅的探索と癌化に伴う発現低下の原因解明
 研究課題名（英文）Exhaustive search for onco-suppressor genes induced by Egr-1 and cause-analysis of their repression in association with carcinogenesis
 研究代表者
 矢澤 卓也（YAZAWA TAKUYA）
 横浜市立大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：50251054

研究成果の概要:肺癌細胞に Egr-1 を強制発現させることにより、IGFBP-4, IGFBP-2, NGFI-A binding protein-2 (NAB2), Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) が誘導された。それぞれの遺伝子プロモーターに存在する CpG アイランドのメチル化状態について肺癌組織を用いて検討したところ、IGFBP-4 遺伝子および IGFBP-2 遺伝子プロモーターのメチル化に伴いその発現が減弱していることが明らかになった。一方、Egr-1, NAB2, VEGF-A 遺伝子プロモーターには全くメチル化が認められなかった。更に、VEGF-A プロモーターの下流域に存在する Egr-1 結合サイトに Egr-1 が直接結合すること、肺癌細胞における VEGF-A の発現は Egr-1 と NAB2 の発現バランスにより制御されていることも本研究により明らかになった。以上より、Egr-1 により誘導される分子には癌化によるエピジェネティックな変化を受け発現量が変化するもの、及び癌化によるエピジェネティックな影響を全く受けず NAB2 との発現バランスにより発現制御されているものが存在することが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：Egr-1, 癌遺伝子, 癌抑制遺伝子, 癌化, 肺癌, エピジェネティクス, プロモーター, VEGF-A

1. 研究開始当初の背景

癌遺伝子の活性化は癌の発生・進展に重要な役割を演じている。例えばRAS遺伝子の点突然変異は大腸癌、肺腺癌、膵癌で比較的高率に見られ、変異型K-RasはRas-Raf-MEK-MAPKカスケードを恒常的に活性化させる。肺上皮細胞

におけるK-rasの遺伝子変異は肺腺癌の前癌病変である異型腺腫様過形成(AAH:atypical adenomatous hyperplasia)状態から既に認められる現象であり、変異型活性化K-RasがPI3Kカスケードを活性化することにより細胞運動能を亢進させること(Am J Pathol 164:91-

100, 2004)、更に変異型K-rasがMEK-MAPK-Egr1カスケードを活性化することにより増殖活性を亢進させると同時に「細胞増殖抑制因子としての機能を有するInsulin-like growth factor binding protein-4および-2 (IGFBP-4/-2)の発現をも同時に活性化する」ことを明らかにし、また悪性化に伴いこの細胞増殖抑制機構(フィードバック機構)が破綻してくるのを見いだした(Sato H, Yazawa T et al. Am J Pathol 169: 1550-1566, 2006)。Egr-1の機能については未だ不明な点が多い。しかし近年、Egr-1はonco-suppressor geneとしての性質を有しているとの報告が散見されるようになってきており、今回我々が明らかにしたIGFBP-4/-2も、IGFのIGF receptorへの結合を阻害することにより強力な増殖抑制を引き起こすことから、Egr-1が癌細胞増殖を直接あるいは間接的に抑制する因子の一つであるとする考え方に全く矛盾しない結果となっている。

不死化気道上皮細胞への変異型K-ras遺伝子導入により有意に発現の亢進したIGFBP-4/-2遺伝子のプロモーターにはGC richな配列(CpGアイランド)が存在しており、Egr-1はWT-1やSP-1のDNA結合配列に類似した結合モチーフ(GCGGGGCG)を有する。この結合モチーフは極めてGC-richなDNA配列であるため、Egr-1はGC richな配列をプロモーターに有する遺伝子の転写を選択的に促進することが考えられる。

2. 研究の目的

そこで今回我々は、肺上皮細胞、肺癌細胞におけるEgr-1の強制発現により、どのような遺伝子が活性化されるのか、そしてそれらの遺伝子発現制御領域が癌化あるいは悪性化によりどのようなエピジェネティック変化を起こしているのかについて明らかにすることを目的とし、*in vitro*, *in vivo* 両面から以下の検討を行った。

3. 研究の方法

(1)Egr-1発現により誘導される下流分子を明らかにするため、Egr-1発現ベクターを作成し、これを肺上皮細胞株および癌培養細胞株に導入し、安定発現株を樹立した。

(2)樹立されたEgr-1安定発現株およびGene Chip法を用い、Egr-1発現により誘導される下流分子の同定を試みた。

(3)Egr-1発現により誘導される分子として抽出したIGFBP-4, IGFBP-2両分子について、肺癌組織を用いた免疫組織化学法により肺癌細胞におけるIGFBP-4/-2の発現状態を検討するとともに、microdissection法を用いて肺癌細胞から抽出したDNAを用い、

methylation-specific PCR法(図1)により*in vivo*におけるIGFBP-4/-2プロモーターのメチル化状態について検討を行った。

(4)Egr-1自体、およびEgr-1により誘導されるNAB2, VEGF-Aの発現状態、NAB2遺伝子およびVEGF-Aプロモーターのメチル化状態について、肺癌培養細胞および肺癌組織を用いて検討した。

(5)VEGF-Aプロモーターアッセイ、Realtime PCRを行い、VEGF-A遺伝子発現へのEgr-1の直接的関与について検討した。

4. 研究成果

(1)Egr-1の強制発現により活性化される遺伝子を同定するため、まず培養肺上皮細胞および肺癌細胞に対し、レトロウイルスベクターを用いてEgr-1遺伝子の導入を試みた。しかし、複数回の施行にもかかわらず、Egr-1を安定発現する細胞を得ることはできなかった。この結果は当初の予測に合致したものであり、Egr-1の発現により複数の癌抑制遺伝子が活性化している可能性が強くと唆された。そこでtet-on systemを使用できるように改変を行ったレトロウイルス系を構築し、これを用いてEgr-1遺伝子導入を試みた。その結果、Doxycycline添加時のみEgr-1を発現する細胞を得ることに成功した(図2, 上段)。

(2)これらのEgr-1導入細胞を用い、Doxycycline添加に伴うEgr-1発現を経時的に見てみると、誘導後2時間で蛋白レベルの良好な発現が見られた。そこで、Egr-1誘導後12時間後にRNAを抽出し、このサンプルを用いて発現亢進した遺伝子をGene Chip法により解析したところ、IGFBP-4, IGFBP-2, plasminogen activator inhibitor, NAB2, VEGF-A遺伝子の発現が亢進してくることが明らかになった。

(3)肺癌組織内の癌細胞から抽出したDNAを用い、IGFBP-4/-2プロモーターのメチル化解析を行った結果、検索可能であった肺腺癌の67%にIGFBP-4プロモーターのメチル化が、71%にIGFBP-2プロモーターのメチル化が認められた。また肺扁平上皮癌の47%にIGFBP-4プロモーターのメチル化が、29%にIGFBP-2プロモーターのメチル化が認められた(図3, 4)。IGFBP-4/-2蛋白とプロモーターのメチル化との関係を見ると、図5に示すように、IGFBP-4/-2プロモーターのメチル化に伴いIGFBP-4/-2蛋白の発現が減弱していることが明らかになった。

(4)Egr-1プロモーターにはIGFBP-4やIGFBP-2と同様にCpGアイランドが存在しており、またNAB2プロモーター、VEGF-AプロモーターにもCpGアイランドが存在しているが、検討した20種以上の肺癌細胞において、Egr-1プロモーター、NAB2プロモーター

一、*VEGF-A* プロモーターには全くメチル化は見られず、肺癌組織に存在する肺腺癌細胞においても同様であった(図6)。また肺癌組織における *Egr-1*, *NAB2* の発現状態について検討を行い、肺癌細胞には豊富な *Egr-1*, *NAB2* の発現が見られることが明らかになった。このことから、*Egr-1* およびその機能調節因子である *NAB2* の発現は癌化した肺上皮においても保たれていることが示唆され、エピジェネティック変化は *Egr-1* に発現制御される更に下流の因子に起こっている可能性が考えられた。

(5) *VEGF-A* プロモーターの下流域には *Egr-1* の結合しうる配列がタンデムに存在している(図7上段)。*VEGF-A* プロモーターアッセイを行った結果、*Egr-1* を発現誘導することによりプロモーター活性が有意に上昇することが明らかになった(図7下段)。また *Egr-1* 結合可能部位(図7上段内 site1, site2)に変異を導入することによりその活性は有意に低下した(図7下段)。またゲルシフトアッセイを行った結果、site1 および site2 に *Egr-1* が結合することが判明した(図8)。更に *Egr-1* の誘導により *VEGF-A* が誘導されること、同時に *NAB2* も誘導されることも同時に明らかになった(図2,9)。

図1. *IGFBP-4/-2* のプロモーター構造と MSP による増幅部位。

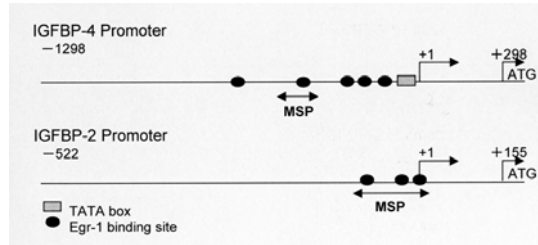


図2. Doxycycline 誘導性発現ベクターを用いた *Egr-1* 強制発現株の樹立と、*Egr-1* 強制発現状態における *VEGF-A* の誘導。

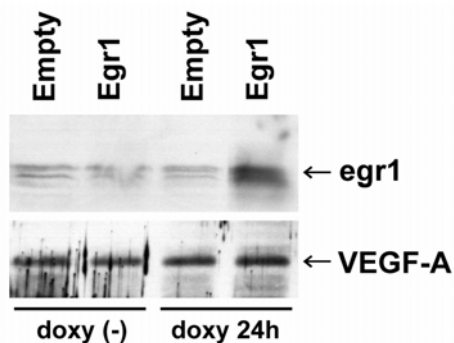


図3. 肺腺癌(Ad)および扁平上皮癌(Sq)における *IGFBP-4* プロモーターのメチル化状態(MSP法)。(M:メチル化、U:非メチル化を示す)

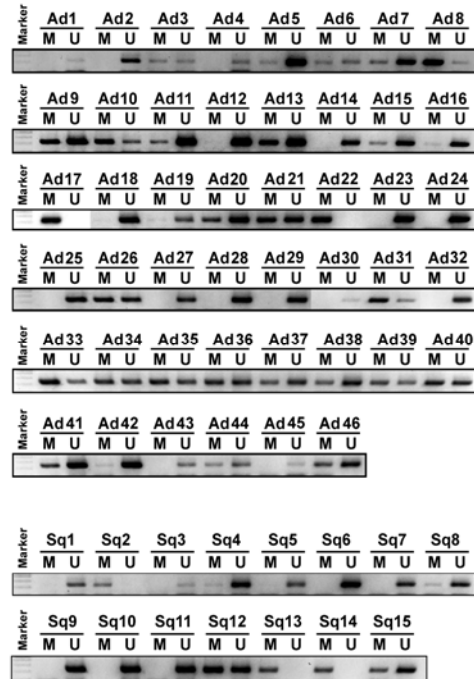


図4. 肺腺癌(Ad)および扁平上皮癌(Sq)における *IGFBP-2* プロモーターのメチル化状態(MSP法)。(M:メチル化、U:非メチル化を示す)

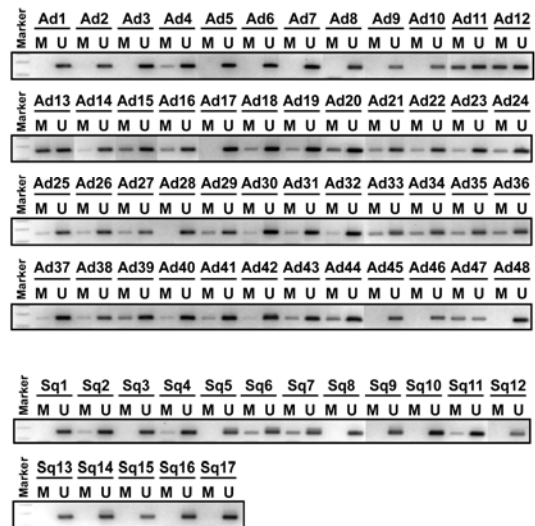


図 5. 肺腺癌(ADC)および扁平上皮癌(SQCC)における IGFBP-4/-2 の発現性とプロモーターメチル化との関連性。(UM: 非メチル化、M: メチル化を示す)

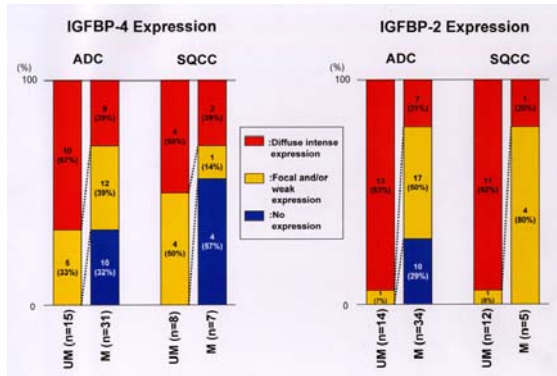


図 6. 肺腺癌(Ad)における IGFBP-2 プロモーターのメチル化状態(MSP法)。(M:メチル化、U: 非メチル化を示す)

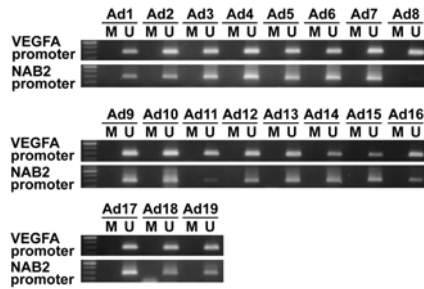


図 7. VEGF-A プロモーター構造およびプロモーターアッセイ。(赤は変異(mut)させた Egr-1 結合可能領域を示す)

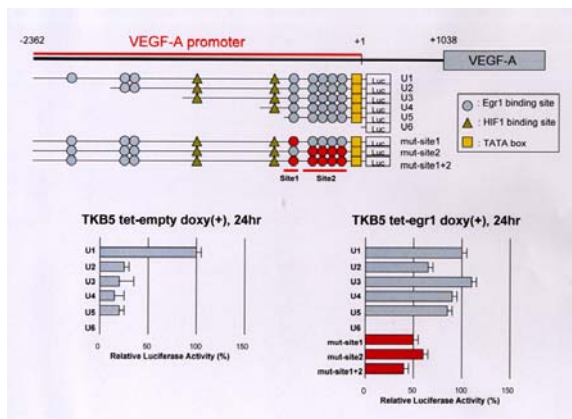


図 8. VEGF-A プロモーター内に存在する Egr-1 結合可能領域への Egr-1 結合性の検討。

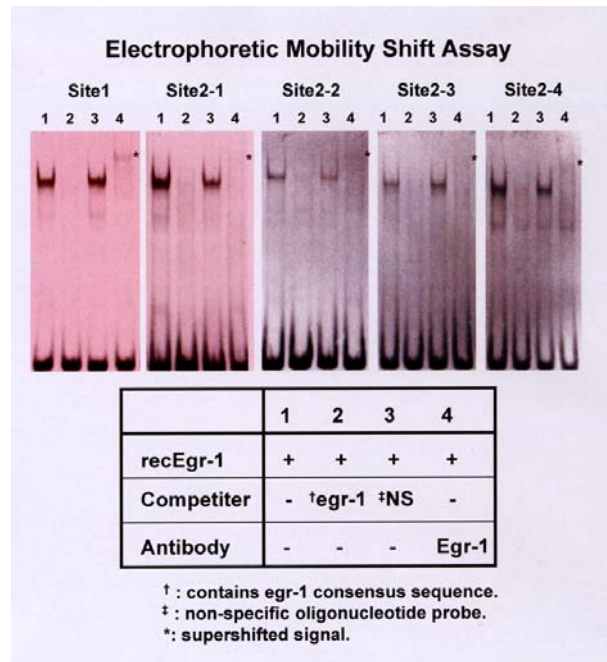
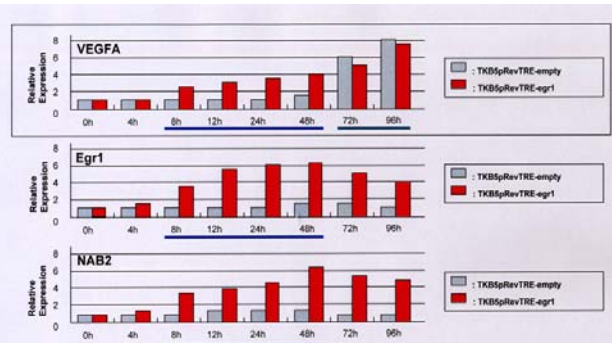


図 9. Egr-1 誘導に伴う NAB2, VEGF-A の発現変化(Realtime PCR法)。



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 8 件)

- (1) Yazawa T, Sato H, Shimoyamada H, Okudela K, Woo T, Tajiri M, Ogura T, Ogawa N, Suzuki T, Mitsui H, Ishii J, Miyata C, Sakaeda M, Goto K, Kashiwagi K, Masuda M, Takahashi T, Kitamura H. Neuroendocrine cancer-specific up-regulating mechanism of insulin-like growth factor binding protein-2 in small cell lung cancer. *Am J Pathol*, 2009 (in press).
- (2) Okudela K, Yazawa T, Woo T, Sakaeda M, Ishii J, Shimoyamada H, Sato H, Tajiri

- M, Ogawa N, Masuda M, Takahashi T, Sugimura H, Kitamura H. Down-regulation of DUSP6 expression in lung cancers - its mechanism and potential role in carcinogenesis. Am J Pathol, 2009 (in press)
- (3) Okudela K, Yazawa T, Tajiri M, Omori T, Takahashi K, Woo T, Shimoyamada H, Ogawa N, Kitamura H. A case of epithelial-myoepithelial carcinoma of the bronchus - a review of reported cases and a comparison with other salivary gland-type carcinomas of the bronchus. Pathol Res Pract, 2009 (in press).
- (4) Okudela K, Woo T, Yazawa T, Ogawa N, Tajiri M, Masuda M, Kitamura H. Significant association between EGFR-mutated lung adenocarcinoma and past illness from gastric cancer or uterine myoma: its implication in carcinogenesis. Lung Cancer, 2009 (in press).
- (5) Woo T, Okudela K, Yazawa T, Wada N, Ogawa N, Ishiwa N, Tajiri M, Rino Y, Kitamura H, Masuda M. Prognostic value of KRAS mutations and Ki-67 expression in stage I lung adenocarcinomas. Lung Cancer, 2009 (in press).
- (6) Okudela K, Yazawa T, Suzuki T, Sugimura H, Kitamura H. Role of 3'-phosphoinositides in oncogenic KRAS-induced modulation of shape and motility of airway epithelial cells. Pathol Int 59: 28-37, 2009.
- (7) Kitamura H, Yazawa T, Sato H, Okudela K, Shimoyamada H. Small cell lung cancer: significance of RB alterations and TTF-1 expression in its carcinogenesis, phenotype, and biology. Endocr Pathol 20: 101-107, 2009.
- (8) Okudela K, Suzuki M, Kageyama S, Bunai T, Nagura K, Igarashi H, Takamochi K, Suzuki K, Yamada T, Niwa H, Ohashi R, Ogawa H, Mori H, Kitamura H, Kaneko T, Tsuneyoshi T, Sugimura H. PIK3CA mutation and amplification in human lung cancer. Pathol Int 57: 664-671, 2007.

[学会発表] (計3件)

- (1) 矢澤卓也. 肺小細胞癌における IGFBP-2 過剰発現メカニズムの解析および腫瘍マーカーとしての有用性に関する基礎的検討. 第 97 回日本病理学会総会. 2008.05.15. 金沢.

- (2) 佐藤華子. 肺癌細胞における Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1) 発現と TTF-1 promoter のメチレーションとの関連. 第 97 回日本病理学会総会. 2008.05.17. 金沢.
- (3) Yazawa T. Growth regulation via insulin-like growth factor binding protein-4 and -2 in lung epithelial cells and cancers. 12th world conference on lung cancer. 2007.09.04. Seoul, Korea.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢澤 卓也 (YAZAWA TAKUYA)

横浜市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：50251054

(2) 研究分担者

奥寺 康司 (OKUDELA KOJI)

横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：10326027

下山田 博明 (SHIMOYAMADA HIROAKI)

横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：60381472

佐藤 華子 (SATO HANAKO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
研究者番号：60438132

北村 均 (KITAMURA HITOSHI)

横浜市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20094302

(3) 連携研究者

なし

