

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590909

研究課題名（和文） AP1 阻害感受性の差を利用した肺癌治療の新たな分子標的の同定

研究課題名（英文） Identification of novel molecular targets for lung cancer based on different sensitivity to AP-1 blockade

研究代表者

木下 一郎 (KINOSHITA ICHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：40343008

研究成果の概要（和文）：発癌に関わる転写因子 AP1 の阻害に対して、感受性のある肺癌細胞で特異的に発現の低下する 27 個の遺伝子をマイクロアレイを用いて同定した。この中で、DNA 複製のライセンス化に関わる MCM4 遺伝子に着目し、siRNA による発現抑制が複数の肺癌細胞株の増殖を抑制することを見出した。肺癌切除標本を用いた免疫組織化学的検討では、MCM4 蛋白質の発現が、Ki67 などの増殖マーカーと有意な相関を示した。MCM4 は肺癌の増殖に重要な役割を果たし、新たな分子標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We identified 27 genes suppressed by blockade of AP-1, an oncogenic transcription factor, in lung cancer cells sensitive to the AP-1 blockade using microarray analysis. Among them, knockdown of MCM 4, a component of DNA replication licensing complex, by siRNA reduced cell growth in multiple lung cancer cells. Immunohistochemical analysis in surgically resected lung cancers demonstrated that MCM4 expression was correlated with proliferation markers including Ki-67. MCM4 may play an important role for growth of lung cancers and be a novel molecular target for lung cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医科学

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、分子標的、AP-1、MCM4、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

近年の新規抗がん剤開発にもかかわらず進行肺癌患者の5年生存率は10%台と低く、癌の分子生物学の進歩による分子標的治療に多くの期待が寄せられている。非小細胞肺癌ではEGF受容体の遺伝子変異陽性患者におけるEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤の高

い抗腫瘍効果が我々を含め複数の施設より報告された。一方、EGF受容体変異陰性患者における効果は低く、新たな分子標的の同定に基づく治療戦略が重要である。

多くの増殖シグナルに関与する核内転写因子 AP1 の主要成分である cJun が肺癌において高頻度に過剰発現していることが報告

され、AP1 が肺癌の遺伝子・分子標的治療の強力な標的となる可能性がある。研究代表者は c-jun dominant negative mutant である TAM67 による AP1 活性の抑制が、NCI-H520 (H520) を除き、NCI-H1299 (H1299) を含む複数の細胞株の増殖を抑制することを示してきた。こうした H1299 と H520 の AP1 阻害に対する感受性の差は、細胞増殖抑制に関わる重要な下流遺伝子が、感受性細胞の H1299 のみで制御されていることを示唆している。

2. 研究の目的

(1) H1299 と H520 肺癌細胞における AP1 下流遺伝子の網羅的解析を行い、感受性細胞 H1299 のみで AP1 阻害時によって発現が抑制される遺伝子を同定すること。

(2) 同定された遺伝子の肺癌細胞における機能を siRNA を用いた knock-down 法によって検討し、AP1 阻害による肺癌増殖抑制を再現する遺伝子を同定すること。

(3) 同定された遺伝子のヒト肺癌組織における発現を検討し、正常組織と比較して高発現を認めるもの、すなわち、肺癌治療の新しい分子標的としての potential を有する遺伝子を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) TAM67 による下流の遺伝子の発現変化を GeneChip を用いて網羅的に解析を行い、H1299 のみで発現が抑制された遺伝子群をリスト化した。

(2) リスト化された遺伝子の中で、細胞増殖と関連のある遺伝子について、リアルタイム PCR 法やウエスタンブロット法を用いて TAM67 による発現の変化を確認した。

(3) 確認された遺伝子の細胞増殖に関する機能を siRNA を用いた knock-down 法によって検討した。

(4) 細胞増殖に必須な遺伝子であることが判明した遺伝子について、肺癌組織における発現異常を 159 症例の肺癌切除標本を用いた免疫組織化学法によって解析した。

4. 研究成果

(1) GeneChip を用いた網羅的に解析によって、H1299 で特異的に発現の低下する遺伝子が 27 個同定された。

(2) この中で DNA 複製のライセンス化に関わる遺伝子 minichromosome maintenance (MCM) 4 に着目し、TAM67 による発現抑制を、定量的 RT-PCR 法とウエスタンブロット法によ

て確認した (図 1)。

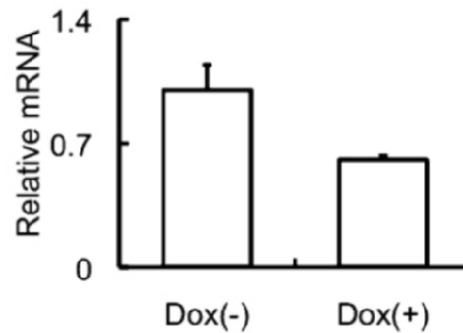


図1 TAM67によるMCM4のmRNA発現の抑制

(3) siRNA によって MCM4 蛋白質の発現を抑制すると (図 2)、H1299 を含む複数の細胞で細胞増殖抑制効果が認められた (図 3)。

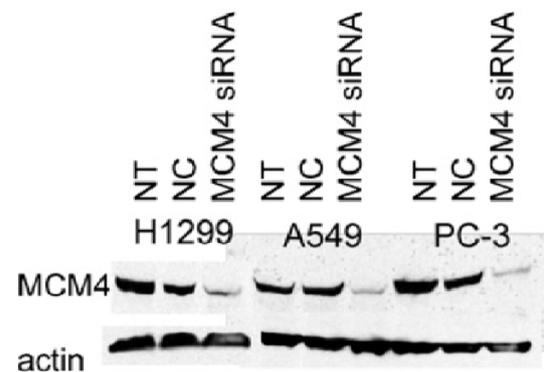


図2 MCM4 siRNAによるMCM4蛋白質発現の抑制

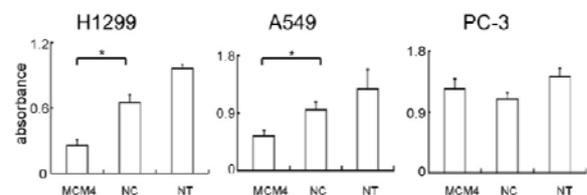


図3 MCM4 siRNAによる肺癌細胞増殖抑制

(4) 肺癌切除標本を用いた検討で、肺癌細胞における MCM4 蛋白質は、近接する正常気管支上皮細胞より、有意に発現が亢進していた (図 4 A-C)。

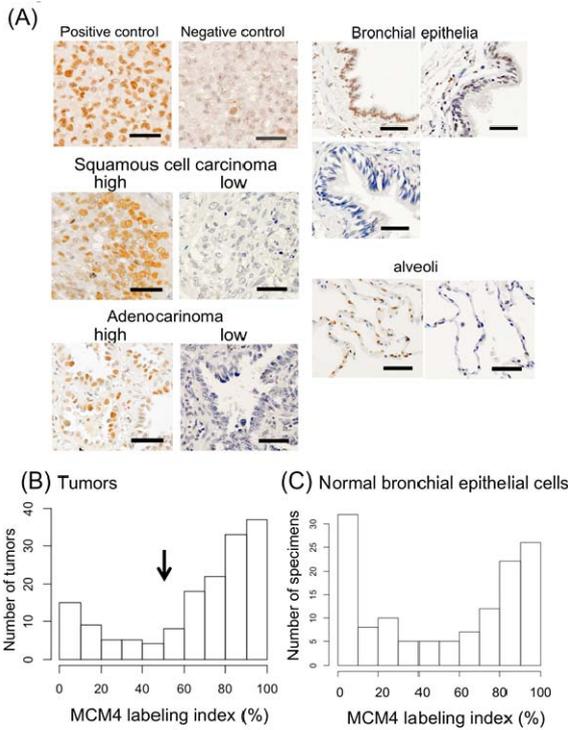


図4 免疫組織化学法による肺癌組織におけるMCM4蛋白質の発現。(A) 肺扁平上皮癌、肺腺癌、正常気管支、正常肺胞組織における代表的な染色パターン。(B) 肺癌細胞におけるMCM4染色率のヒストグラム。(C) 正常気管支細胞におけるMCM4染色率のヒストグラム

(5) MCM4 の高発現は、重喫煙、低分化、非腺癌、Ki67 陽性率、およびサイクリンE の発現と有意な相関を示した (表1)。予後との明らかな相関は認めなかった (図5)。

Characteristics	MCM4 expression		p
	Low	High	
Ki-67			
High	10	82	<0.001
Low	21	33	
p27 ^{KIP1}			
High	25	101	0.8
Low	4	13	
cyclin E			
High	3	78	<0.001
Low	28	38	

Ki-67 high; labeling indices $\geq 30\%$.
p27 low; labeling indices $\geq 5\%$.
cyclin E high; labeling indices $\geq 30\%$.

表1 肺癌組織におけるMCM4発現と細胞増殖マーカーとの関係

(6) 以上より、MCM4 は NSCLC の細胞増殖に重要な役割を果たしており、過剰発現の認められる肺癌において、新たな分子標的となる可能性が唆された。

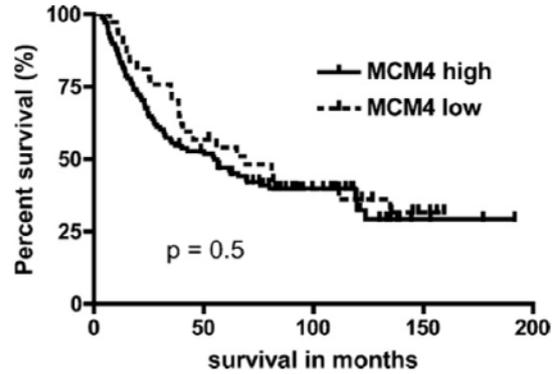


図5 MCM4発現と完全切除された肺癌患者のKaplan-Meier生存曲線

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 4 件)

- ① Kikuchi J, Kinoshita I, Birrer MJ, Dosaka-Akita H (他 7 名、2 番目、corresponding author). Minichromosome maintenance (MCM) protein 4 as a marker for proliferation and its clinical and clinicopathological significance in non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 2011;72:229-37. (査読有り)
- ② Kikuchi J, Kinoshita I, Dosaka-Akita H (他 7 名、2 番目、corresponding author). Distinctive expression of the polycomb group proteins Bmi1 polycomb ring finger oncogene and enhancer of zeste homolog 2 in nonsmall cell lung cancers and their clinical and clinicopathologic significance. Cancer 2010;116:3015-24. (査読有り)
- ③ Kikuchi J, Kinoshita I, Birrer MJ, Dosaka-Akita H (他 3 名、2 番目、corresponding author). Simultaneous blockade of AP-1 and phosphatidylinositol 3-kinase pathway in non-small cell lung cancer cells. Br J Cancer 2008;99(12):2013-9. (査読有り)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Kinoshita I. The role of minichromosome maintenance (MCM) protein 4 in proliferation and its clinicopathological significance in non-small cell lung cancers (NSCLCs).

13th World Conference of Lung Cancer,
San Francisco, USA, August 2, 2009.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://medicaloncology.med.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 一郎 (KINOSITA ICHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 40343008

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

秋田 弘俊 (AKITA HIROTOSHI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 70222528