

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 若手研究(B)
研究期間： 2008 ～ 2009
課題番号： 20790566
研究課題名(和文) ヒト肺癌の発生・進展プロセスに関わる新たなリネジ特異的生存シグナル制御機構の解明
研究課題名(英文) 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)：

末梢肺の分化に関与する 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関与する。我々は、TTF-1 遺伝子により特異的に調節される遺伝子 DOT-1 を同定し、TTF-1 遺伝子の下流で肺腺癌細胞の生存シグナルに関わる重要な遺伝子であることを明らかにした。

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-1, as a TTF-1-regulated gene, and we showed lung adenocarcinoma expressing DOT-1 are highly dependent on its expression for cell survival.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、リネジ特異的マスター調節因子、リネジ特異的生存シグナル

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。

また、我々が既に取得している非小細胞肺癌 149 症例を対象とした網羅的遺伝子プロファイルを用いて、リネジ特異的マスター調節因子である **TTF-1** と **DOT-1** の発現相関を解析した。

(2) 肺腺癌における **TTF-1** による **DOT-1** の制御機構の解析

一過性或いは恒常的に発現させた **TTF-1** 発現細胞株を用いて、**DOT-1** 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-1** の発現を調べた。さらに、レポーター解析を通じて転写調節因子 **TTF-1** による **DOT-1** の転写制御の可能性を検討した。

(3) 肺腺癌における **DOT-1** を介したリネジ特異的生存シグナルの解析

肺腺癌における **DOT-1** のシグナル経路を特定するために、恒常的に発現させた **DOT-1** 発現細胞株を作製し、細胞内伝達におけるリン酸化反応を指標にシグナル解析を行った。また、同様に肺腺癌細胞株を用いて、**RNA** 干渉法により **DOT-1** の発現抑制下でのシグナル解析を行った。

(4) **DOT-1** の肺腺癌における生理的および病態学的機能の解析

種々の肺腺癌細胞株を用いて、**RNA** 干渉法により **DOT-1** の発現抑制を行い、細胞増殖への影響を調べた。また、ヌードマウスを用いて、**xenograft** モデルを作製し、同様に **in vivo** での **DOT-1** の発現抑制による腫瘍形成能の評価を行った。さらに、我々の作製した **DOT-1** 恒常的発現細胞株を用いて細胞増殖への影響を調べ、同様に **xenograft** モデルによる **in vivo** での **DOT-1** の恒常的発現による腫瘍形成能の評価を行った。

4. 研究成果

(1) リネジ特異的マスター調節因子 **TTF-1** により調節される **DOT-1** 遺伝子の同定

マイクロアレイ解析によって、**TTF-1** 遺伝子導入によりベクターコントロールと比べて 20 倍以上の発現上昇が認められる 6 つの遺伝子を同定し、その中でも特に有意に発現上昇が認められる遺伝子として **DOT-1** を新たに同定した。また、非小細胞肺癌 149 症例を対象とした網羅的遺伝子プロファイルにより、**TTF-1** と **DOT-1** の **mRNA** の発現相関を検討したところ、有意に相関を示していることが明らかとなった ($p < 0.001$)。

(2) 肺腺癌における TTF-1 を介した特異的な DOT-1 の発現制御機構の解析

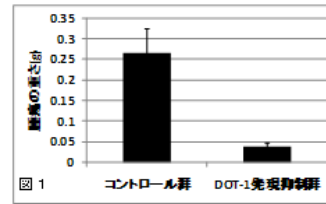
一過性或いは恒常的に発現させた TTF-1 発現細胞株を用いて、DOT-1 の発現誘導を調べたところ、どちらの発現系においても DOT-1 の mRNA およびタンパク質レベルの発現誘導が認められた。また、複数の肺腺癌細胞株を用いて TTF-1 の発現を抑制させると、特異的に DOT-1 の発現低下が認められた。さらに、TTF-1 が転写調節因子であることから、DOT-1 のプロモーター領域に結合することで、その発現を調節している可能性を検討するためにルシフェラーゼ解析を行ったところ、TTF-1 発現細胞株において有意なルシフェラーゼ活性の上昇を認めた。さらに、この活性上昇は、TTF-1 の発現を抑制させると、有意に低下することも確認した。以上の結果から、DOT-1 は肺腺癌細胞株において TTF-1 により特異的にかつ転写レベルで直接的にその発現が調節されていることが判明した。

(3) 肺腺癌における DOT-1 を介したリネジ特異的生存シグナルの解析と重要性

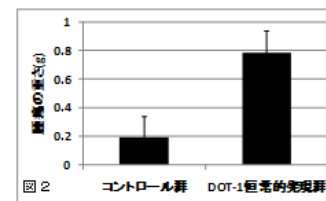
恒常的に発現させた DOT-1 発現細胞株を用いて、種々の細胞内伝達におけるリン酸化反応を解析したところ、コントロール細胞株と比べて、生存シグナルに関与する分子の経時的なリン酸化反応の有意な上昇を検出した。また、複数の肺腺癌細胞株を用いて、DOT-1 発現抑制下での生存シグナルを検討したところ、コントロール細胞株と比べて、生存シグナルに関与する分子の経時的なリン酸化反応の有意な低下を検出した。以上の結果から、DOT-1 は肺腺癌細胞における生存シグナルに深く関与していることが判明した。

(4) DOT-1 の肺腺癌における生理的機能の解析と病態学的機能の解析

種々の DOT-1 陽性肺腺癌細胞株を用いて、DOT-1 の発現抑制下での細胞増殖への影響を検討したところ、有意な増殖抑制効果が認められ、生細胞数の低下が観察された。対照的に、DOT-1 陰性肺腺癌細胞株では影響は見られなかった。また、TUNEL 解析により、DOT-1 の発現抑制はアポトーシス細胞の増加を誘発することが明らかとなった。さらに、肺腺癌細胞株を用いてヌードマウス xenograft モデルを作製し、同様に *in vivo* での DOT-1 の発現抑制における腫瘍形成能の評価を行った結果、コントロール群と比べて、DOT-1 発現抑制群において、有意な腫瘍形成能の低下を認めた(図 1)。



さらに、DOT-1 恒常的発現細胞株を用いて細胞増殖への影響をコロニーフォーメーションアッセイ法により検討を行ったところ、コントロール細胞株と比較して、DOT-1 恒常的発現細胞株において有意なコロニー形成能の亢進が認められた。さらに、足場非依存性増殖能を評価したところ、同様に DOT-1 恒常的発現細胞株において有意に増殖能が亢進することが明らかとなった。また、DOT-1 恒常的発現細胞株を用いて、ヌードマウス xenograft モデルを作製し、*in vivo* での DOT-1 の恒常的発現における腫瘍形成能の評価を行った結果、コントロール群と比べて、DOT-1 恒常的発現群において、有意な腫瘍形成能の亢進を認めた(図 2)。



以上の結果から、DOT-1 は肺腺癌細胞において生存という重要な役割を担う必須遺伝子であることが判明し、DOT-1 の発現そのものが癌化形成に関与していることを見出した。

現在の肺腺癌研究において、リネジ特異的マスター調節因子である TTF-1 遺伝子は、冒頭の研究背景においても既述したが、EGFR 変異に勝るとも劣らない肺腺癌の特性を担う遺伝子としての認識が高まりつつある。本研究において、この TTF-1 遺伝子によって制御される下流標的分子の同定およびそのリネジ特異的生存シグナルを明らかにしたことは学術的に非常に意味を成すものであり、未だエビデンスに乏しいリネジ特異的マスター調節因子の一般的な癌への普遍的関与を示唆するモデルとなる可能性を秘めている。さらに、本研究で我々が同定した DOT-1

遺伝子は、肺腺癌にとって生存シグナルを担う必須遺伝子であることから、分子標的としての有用性を期待することができる。

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)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：細胞増殖阻害剤

発明者：高橋隆

山口知也

富田秀太

権利者：国立大学法人 名古屋大学

種類：特許

番号：特願 2008-187857

出願年月日：2008.7.18

国内外の別：国内

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