

がん標的分子 RCAS1 の発現制御機構に関する研究

がん標的分子のネットワーク解析研究チーム（課題番号：117109）

研究期間：平成 23 年 7 月 22 日～平成 24 年 3 月 31 日

研究代表者：城田京子 研究員：四元房典

【緒言】

我々は平成 23 年度に推奨研究プロジェクトとして総経費 62 万円の予算を標記の研究の一部として遂行してきました。本研究を終えるにあたり、ここに研究の概要と成果を纏めました。

【研究成果】

1) 目的

RCAS1 は子宮頸癌細胞株 (SiSo 細胞) から単離された分子で、がん細胞では増殖シグナルを活性化します。一方 RCAS1 により T リンパ球はアポトーシスが誘導されるために腫瘍免疫は抑制され、線維芽細胞などの間質反応も抑制されます。これらすべての結果、RCAS1 はがん細胞が増殖・進展するのに有利な環境をつくり出します。実際に、RCAS1 は子宮頸癌・体癌のみならず脳腫瘍、肺癌、胃癌、膵癌などの 14 種類の癌で発現が亢進し、発現が高い症例は予後が悪いことも明らかとなっており、RCAS1 がこれらの癌治療の標的分子であることを、われわれはこれまでに報告してきました。しかしながら、癌化機構における RCAS1 の発現制御機構については明らかになっていないのが現状です。そこで、本研究は、癌標的分子 RCAS1 に関わる転写因子を同定し、RCAS1 が特異的に発現してくる分子機構を解明すると同時に、転写因子の発現情報に基づいたネットワーク解析から RCAS1 を標的にした治療の有効性を向上させる遺伝子情報を抽出することを目的とする。

2) 成果

(1) shRNA ライブラリーを用いた RCAS1 の発現に関わる分子のスクリーニング

まず、特定の細胞機能に関連する遺伝子を網羅的にスクリーニングする方法として注目されている short hairpin RNA (shRNA) 発現ライブラリーを用いた。

RCAS1 依存性にアポトーシスが誘導される細胞株である K562、HEK293T に shRNA 発現ライブラリーを導入し、RCAS1 濃縮液を培養上清に加えた後の生存細胞から RNA を抽出し、shRNA 特異的配列を増幅させた後、Affymetrix 社の Gene Chip を用いて解析を行った。

(2) がん細胞の 3 次元培養を用いた RCAS1 の発現に関わる分子のスクリーニング

次に 3 次元増殖環境下で RCAS1 の発現が亢進する細胞株である SiSo (子宮頸癌)、MCF7 (乳癌)、A549 (肺癌) を用いて、通常の培養皿による 2 次元培養した細胞をコントロールとしてマトリゲルによる 3 次元培養した細胞において発現亢進してくる遺伝子を DNA 発現マイクロアレイによって解析した。

(3) (1) 及び (2) の情報から RCAS1 の発現に関わる分子を同定し、RCAS1 の発現制御機構の解明を行う。

(1) 及び (2) の条件で共通に抽出された 140 遺伝子について SiSo、MCF7、A549 を用いて mRNA の発現量を Real-Time PCR 法で確認したところ、2 次元培養した細胞と比較して 3 次元培養した細胞において 10 倍以上発現が亢進している遺伝子として *FBLN2*、*TGFBR1*、*FGFR1* を同定した。siRNA 法を用いて *FBLN2*、*TGFBR1*、*FGFR1* の発現を抑制すると、RCAS1 の蛋白発現量はそれぞれ 81.0%、44.7%、76.3% 低下した。また、A549 を用いて *FBLN2*、*TGFBR1*、*FGFR1* の発現を恒常的に抑制したクローン株を作製し、xenograft model で造腫瘍能の抑制効果を確認すると、腫瘍体積はそれぞれ 35.7%、45.8%、41.2% 低下した。

現在、*FBLN2*、*TGFBR1*、*FGFR1* の臨床的意義を明らかにする目的で、子宮頸癌、乳癌、肺癌のヒト癌組織における発現を Real-time PCR 法にて解析し、RCAS1 と

の発現相関及び臨床病理学的因子との関連について評価している。また、*FBLN2*、*TGFBR1*、*FGFR1* の下流のシグナル分子と RCAS1 の発現量の変化についても確認し、癌増殖機構における RCAS1 を中心とした分子ネットワークを明らかにしていく予定である。

3) 結語

今回の研究では特定の細胞機能に関連する遺伝子を網羅的にスクリーニングする方法として注目されている shRNA ライブラリーを用いて RCAS1 発現に関連する遺伝子群を明らかにした。RCAS1 発現関連遺伝子として同定された 3 遺伝子に転写因子は含まれなかったが、3 遺伝子とも癌増殖に関連する遺伝子であり、本研究の成果から RCAS1 シグナルによる癌化機構の解明と癌標的分子としての妥当性について証明されることが期待される。

【謝辞】

本研究の一部は、福岡大学研究推進部の研究経費によるものである（課題番号：117109）。

【研究業績】

〈2011 年〉

1. Shirota K, Nagata Y, Honjou K, Tsujioka H, Yoshizato T, Miyamoto S. Involvement of anticentromere antibody in interference with oocyte meiosis and embryo cleavage. *Fertil. Steril.*, 95: 2729-2731, 2011.
2. Shirota K, Ota T, Tsujioka H, Miyamoto S. Uterine inversion due to a leiomyoma on postpartum day 41: a case report. *J Obstet Gynaecol Res.*, 37: 897-900, 2011.
3. Tsujioka H, Yotsumoto F, Hikita S, Shirota K, Ueda T, Kuroki M, Miyamoto S: Targeting the heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in ovarian cancer therapy. *Current Opinion in Obstet Gynecol.*, 23:24-30, 2011.
4. Koshikawa N, Mizushima H, Minegishi T, Eguchi F, Yotsumoto F, Nabeshima K, Miyamoto S, Mekada E, Seiki M: Proteolytic activation of heparin-binding EGF-like growth factor by membrane-type matrix metalloproteinase-1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Sci.*, 102:111-116, 2011.
5. Hikita S, Yotsumoto F, Fkami T, Horiuchi S, Sanui A, Miyata K, Nam S, Tsujioka H, Ueda T, Shirota K, Yoshizato T, Maeda K, Ishikawa T, Okuno Y, Kuroki M, Mekada E, Miyamoto S: Assessment of HB-EGF levels in peritoneal fluid and serum of ovarian cancer patients using ELISA. *Anticancer Res.*, 31:2553-2560, 2011.
6. Naganuma Y, Choijamts B, Shirota K, Nakajima K, Ogata S, Miyamoto S, Kawarabayashi T, Emoto M: Metronomic doxorubicin chemotherapy combined with the anti-angiogenic agent TNP-470 inhibits the growth of human uterine carcinosarcoma xenografts. *Cancer Sci.*, 102 : 1542-1552, 2011.
7. Kunami N, Yotsumoto F, Ishitsuka K, Fukami T, Odawara T, Manabe S, Ishikawa T, Tamura K, Kuroki M, Miyamoto S: Antitumor effects of CRM197, a specific inhibitor of HB-EGF, in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Res.*, 31:2483-2488, 2011.
8. 四元房典、深見達弥、八木裕史、船越顕博、吉里俊幸、黒木政秀、宮本新吾：Amphiregulin を標的とした肺癌治療。日本分子腫瘍マーカー研究会誌、26 (1) : 51-2, 2011.