

学位論文題名

A Novel Human tRNA-dihydrouridine
Synthase Involved in Pulmonary Carcinogenesis

(非小細胞肺癌における新規分子標的治療候補遺伝子
hDUS2 の同定とその機能解析)

学位論文内容の要旨

背景と目的

肺癌は現在、日本における癌死亡率第一位を占める疾患である。肺癌組織特異的に発現が増加する遺伝子の同定および機能解析は、肺癌の発生・進展のメカニズムの解明のみならず、肺癌の新規診断法や治療法の開発を進める上できわめて重要である。そこで非小細胞肺癌 37 例の肺癌臨床検体を用いた cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルにより肺癌組織において高頻度に発現が増加する新規遺伝子を単離し、その癌細胞における機能解析により新規治療薬開発の有用な標的分子を同定することが本研究の目的である。

方法

はじめに肺癌の新規分子標的治療候補遺伝子の探索を目的として当研究室（東京大学医科学研究所）で行われた非小細胞肺癌 37 例の cDNA マイクロアレイの遺伝子発現プロファイルを比較検討し、癌組織において高頻度に発現が増加している遺伝子の単離を試みた。次に副作用の少ない治療薬開発を目的として、同じく当研究室で行われた全身正常臓器組織の遺伝子発現プロファイルにより正常臓器で発現の低い遺伝子を抽出した。抽出遺伝子に対して半定量的 RT-PCR およびノザンプロット解析によりさらに候補遺伝子の絞込みを行った。さらに RNAi 法を用いて細胞増殖に対する影響を検討し、遺伝子発現を抑制したときに細胞増殖が抑制される遺伝子の探索を行った。以上の基準を満たす遺伝子の一つとして新規遺伝子 *hDUS2* を同定し、さらにその詳細な機能解析を行った。*hDUS2* は酵母の tRNA 修飾酵素である DUS (dihydrouridine synthase) と約 40% のホモロジーを有するドメインを持つことが予想されたので、HPLC で精製した肺癌細胞の tRNA を用いて、*hDUS2* の発現に依存した tRNA 中の dihydrouridine の割合を定量化した。つづいて rabbit-reticulocyte lysate system を用いて *hDUS2* タンパク質の *in vitro* における翻訳量に与える影響を検討した。また *hDUS2* に対するポリクローナル抗体を作製し、ウェスタンブロットならびに細胞免疫染色、免疫組織染色を行った。肺癌臨床検体 332 症例を搭載した肺癌 tissue microarray を作製し、*hDUS2* 発現と臨床病理学因子、予後との相関ならびに単変量・多変量解析を

施行した。さらに免疫沈降法と質量分析法を用いて hDUS2 と相互作用する分子の同定を試みた。

結 果

1. hDUS2 遺伝子の同定と非小細胞肺癌組織ならびにヒト正常臓器組織での発現： cDNA マイクロアレイに搭載された肺癌組織で発現増加を示す候補遺伝子の cDNA 配列をもとに EST walking 法と RT-PCR で全長の決定を行い、新規遺伝子 hDUS2 を同定した。この遺伝子は染色体 16q22.1 に位置し、cDNA は 2,008 塩基、493 アミノ酸からなる分子量約 58kDa のタンパクをコードする。このタンパクは N 末端側には酵母の DUS (dihydrouridine synthase) と約 40% のホモロジーを有するドメインと、また C 末端側には DSRM (double-strand RNA binding motif) の 2 つのドメインを有していた。肺癌組織における hDUS2 の発現は臨床検体を用いた半定量的 RT-PCR により非小細胞肺癌 12 例中 11 例で正常肺に比較し癌部での高い発現を認め、肺癌細胞株における検討では 23 株中 21 株で正常上気道由来細胞株に比較し高い発現を示した。また、ノザンプロット解析により hDUS2 はヒト正常組織において特に精巣において高い発現を示した。hDUS2 に対するポリクローナル抗体を作製し、肺癌細胞株を用いた細胞免疫染色により hDUS2 タンパクは細胞質に分布し、特に小胞体に局在することがわかった。
2. RNAi 法を用いた hDUS2 の発現阻害実験： 複数の肺癌細胞株に hDUS2 に対する siRNA 発現ベクターを導入してこの遺伝子の発現を阻害したところ、著明な癌細胞の増殖抑制効果を認めた。
3. hDUS2 の発現に依存した tRNA 中の dihydrouridine の割合の検討： hDUS2 を強制発現させた肺癌細胞より HPLC を用いて tRNA を精製し、比色定量法により tRNA 中の dihydrouridine の割合を検討したところ、その割合が増加していることが明らかとなった。また、RNAi 法により hDUS2 の発現を抑制した場合はその割合が減少していることが確認された。
4. hDUS2 タンパクの翻訳に対する影響： hDUS2-GST 融合タンパク質を精製し rabbit-reticulocyte lysate system を用いて hDUS2 の *in vitro* における翻訳に対する影響を検討したところ、hDUS2 の用量依存的に翻訳効率が增加することがわかった。
5. 肺癌 tissue microarray による解析： 当研究室で作製した肺癌切除検体 332 症例を搭載した tissue microarray と hDUS2 ポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行ったところ、hDUS2 タンパクの高いレベルの発現が生存期間の短縮と相関を示し、また hDUS2 の発現は単変量・多変量解析により独立した予後因子であることが確認された。
6. hDUS2 と相互作用する分子の検索： 免疫沈降法と質量分析法を用いて hDUS2 と相互作用する分子として aminoacyl tRNA synthetase の一つである EPRS (glutamyl-prolyl tRNA synthetase) を同定した。以上より hDUS2 は tRNA、aminoacyl tRNA synthetase と complex を形成し、肺癌細胞における翻訳効率の増加に関与する可能性が示唆された。

まとめ

非小細胞肺癌において高頻度に発現増加を認める新規遺伝子 hDUS2 の機能解析を行い、この遺伝子量の増加による tRNA に対する DUS 酵素活性の上昇が、癌細胞における翻訳

効率を増加させ、肺癌の発生・進展に深く関与する可能性を明らかにした。またこの酵素を選択的に抑制することが肺癌治療における有効な方策になるものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

A Novel Human tRNA-dihydrouridine Synthase Involved in Pulmonary Carcinogenesis

(非小細胞肺癌における新規分子標的治療候補遺伝子

hDUS2 の同定とその機能解析)

肺癌は現在、日本における癌死亡率第一位を占める疾患である。肺癌組織特異的に発現が増加する遺伝子の同定および機能解析は、肺癌の発生・進展のメカニズムの解明のみならず、肺癌の新規診断法や治療法の開発を進める上できわめて重要である。そこで当研究室（東京大学医科学研究所）で行われた非小細胞肺癌 37 例の cDNA マイクロアレイの遺伝子発現プロファイルと比較検討し、癌組織において高頻度に発現が増加している遺伝子の単離を試みた。次に副作用の少ない治療薬開発を目的として、同じく当研究室で行われた全身正常臓器組織の遺伝子発現プロファイルにより正常臓器で発現の低い遺伝子を抽出した。抽出遺伝子に対して半定量的 RT-PCR 法およびノザンプロット解析によりさらに候補遺伝子の絞込みを行った。さらに RNAi 法を用いて細胞増殖に対する影響を検討し、遺伝子発現を抑制したときに細胞増殖が抑制される遺伝子の探索を行った。以上の基準を満たす遺伝子の一つとして新規遺伝子 *hDUS2* を同定し、さらにその詳細な機能解析を行った。

1. *hDUS2* 遺伝子の同定と非小細胞肺癌組織ならびにヒト正常臓器組織での発現： cDNA マイクロアレイに搭載された肺癌組織で発現増加を示す候補遺伝子の cDNA 配列をもとに EST walking 法と RT-PCR で全長の決定を行い、新規遺伝子 *hDUS2* を同定した。この遺伝子は染色体 16q22.1 に位置し、cDNA は 2,008 塩基、493 アミノ酸からなる分子量約 58kDa のタンパク質をコードする。このタンパク質は N 末端側には酵母の *DUS* (dihydrouridine synthase) と約 40% のホモロジーを有するドメインと、また C 末端側には DSRM (double-strand RNA binding motif) の 2 つのドメインを有していた。肺癌組織における *hDUS2* の発現は臨床検体を用いた半定量的 RT-PCR 法により非小細胞肺癌 12 例中 11 例で正常肺に比較し癌部での高い発現を認め、肺癌細胞株における検討では 23 株中 21 株で正常上気道由来細胞株に比較し高い発現を示した。また、ノザンプロット解析により *hDUS2* はヒト正常組織において特に精巣において高い発現を示した。*hDUS2* に対するポ

リクローナル抗体を作製し、肺癌細胞株を用いた免疫細胞染色により hDUS2 タンパク質は細胞質に分布し、特に小胞体に局在することがわかった。

2. RNAi 法を用いた hDUS2 の発現阻害実験： 複数の肺癌細胞株に hDUS2 に対する siRNA 発現ベクターを導入してこの遺伝子の発現を阻害したところ、著明な癌細胞の増殖抑制効果を認めた。

3. hDUS2 の発現に依存した tRNA 中の dihydrouridine の割合の検討： hDUS2 を強制発現させた肺癌細胞より HPLC を用いて tRNA を精製し、比色定量法により tRNA 中の dihydrouridine の割合を検討したところ、その割合が増加していることが明らかとなった。また、RNAi 法により hDUS2 の発現を抑制した場合はその割合が減少していることが確認された。

4. hDUS2 タンパク質の翻訳に対する影響： hDUS2-GST 融合タンパク質を精製し rabbit-reticulocyte lysate system を用いて hDUS2 の in vitro における翻訳に対する影響を検討したところ、hDUS2 の用量依存的に翻訳効率が上昇することがわかった。

5. 肺癌 tissue microarray による解析： 当研究室で作製した肺癌切除検体 332 症例を搭載した tissue microarray と hDUS2 ポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行ったところ、hDUS2 タンパク質の高いレベルの発現が生存期間の短縮と相関を示し、また hDUS2 の発現は単変量・多変量解析により独立した予後因子であることが確認された。

6. hDUS2 と相互作用する分子の検索： 免疫沈降法と質量分析法を用いて hDUS2 と相互作用する分子として aminoacyl tRNA synthetase の一つである EPRS (glutamyl-prolyl tRNA synthetase) を同定した。以上より hDUS2 は tRNA、aminoacyl tRNA synthetase と complex を形成し、肺癌細胞における翻訳効率の上昇に関与する可能性が示唆された。

以上より、非小細胞肺癌において高頻度に発現増加を認める新規遺伝子 hDUS2 の機能解析を行い、この遺伝子の発現増加による tRNA における dihydrouridine の割合の上昇が、癌細胞における翻訳効率を上昇させ、肺癌の発生・進展に深く関与する可能性を明らかにした。またこの酵素を選択的に抑制することが肺癌治療における有効な方策になるものと考えられた。

口頭発表において副査今村雅寛教授より①この遺伝子の発現を調節する上流遺伝子について、②in vivo で強制発現させた場合とそうでない場合に増殖あるいは形態に変化があるかどうかについて、③治療に向けて今後の研究の進め方について、④正常臓器でも発現しているが、正常と癌での作用の違いについて質問があった。続いて副査近藤 哲教授より①この遺伝子の他の癌腫における発現について、②治療に向けて今後の戦略について、③肺癌全体での陽性率に関して質問があった。最後に主査秋田弘俊教授より、①前癌病変である扁平上皮化生や AAH での発現について、②その他の組織型、たとえば carcinoid や large cell neuroendocrine carcinoma などでの発現に関しての質問があったが、いずれの質問に対しても、申請者は主旨をよく理解し自らの研究データと文献的考察を混じえて適切な回答をした。

肺癌の新規分子標的候補遺伝子 hDUS2 に関する本研究の意義は大きく、また hDUS2 の新しいバイオマーカーとしての臨床的有用性も高く、審査員一同協議の結果、申請者が博士（医学）の学位授与に値するものと判定した。