

学位論文題名

cJun dominant negative mutant を用いた
AP-1阻害による非小細胞肺癌細胞増殖の抑制

学位論文内容の要旨

【背景】

AP-1 は Jun, Fos, ATF ファミリータンパク質から構成されるホモあるいはヘテロ 2 量体の転写因子であり, プロトオンコプロテインである cJun は AP-1 の主な構成成分である. これまで報告された免疫組織化学的検討によると, 正常肺組織では発現がみられない cJun が非小細胞肺癌組織で高い発現がみられ, cJun は肺癌の発癌や増殖に重要な役割を果たしている可能性がある. 最近, ヒト気管支上皮細胞株で cJun を過剰に発現させると足場非依存性増殖が増強され, 一部の肺癌細胞株で c-jun の dominant negative mutant にて AP-1 活性を阻害すると足場非依存性増殖は抑制されるが, 足場依存性増殖は抑制されないことが報告された. しかし, 乳癌や大腸癌細胞株での検討では, cJun の足場依存性増殖への関与が報告されている. また, 肺癌細胞における in vivo での腫瘍増殖に対して cJun dominant negative mutant による AP-1 阻害が与える影響については, これまで検討されていない.

【目的】

cJun の dominant negative mutant である TAM67 が, 非小細胞肺癌細胞の足場依存性・非依存性増殖および in vivo 造腫瘍能に与える影響を検討した.

【材料と方法】

非小細胞肺癌細胞株 NCI-H520 (以下, H520) と NCI-H1299 (以下, H1299) に TAM67 を一過性遺伝子導入し, ルシフェラーゼ法にて TAM67 の AP-1 活性への影響を調べ, コロニー形成法にて TAM67 による増殖能への影響を解析した. 次に TAM67 の発現がテトラサイクリンで誘導される H1299 細胞株 (H1299 Tet-on TAM67 クローン細胞) を作成し, TAM67 による足場依存性増殖への影響を MTT 法で, 細胞周期への影響をフローサイトメトリー法で調べた. H1299 Tet-on TAM67 クローン細胞の作成には, ドキシサイクリンの投与により遺伝子発現のコントロールが可能な reverse tetracycline-regulated (rtTA) system (Tet-on システム) と, 薬剤選択マーカーの blasticidin S deaminase が含まれるレトロウイルスベクターの pLRT-TAM67 を用いた. コントロールとして, テトラサイクリンで GFP が誘導される H1299 Tet-on GFP クローン細胞を作成し使用した. また, これらの細胞で TAM67 による足場非依存性増殖への影響について, ソフトアガロース法で検討した. さらに, H1299 Tet-on TAM67 クローン細胞由来の腫瘍を形成させたヌードマウスにドキシサイクリン含有水を投与し, TAM67 の in vivo における造腫瘍能への影響について検討した.

【結果】

1. TAM67 発現による AP-1 活性の変化

TAM67 を非小細胞肺癌細胞株 H520 と H1299 に一過性遺伝子導入すると, 両細胞株で AP-1 活性は抑制された.

2. コロニー形成の抑制

TAM67を一過性遺伝子導入するとH1299のコロニー形成は明らかに減少した。一方、H520ではTAM67を遺伝子導入してもコロニー形成は減少しなかった。

3. TAM67誘導H1299細胞の作成とAP-1活性の測定

H1299 Tet-on TAM67クローン細胞を作成し、実験にはTAM67の高い発現が確認された2つのクローン細胞(TAM67 #8 および TAM67 #34)を用いた。また、コントロールにはH1299 Tet-on GFPクローン細胞(GFP #1 および GFP #3)を用いた。これらの細胞にて、TAM67発現によるAP-1活性の抑制をルシフェラーゼ法で調べたところ、TAM67 #8とTAM67 #34でドキシサイクリン存在下にTAM67を誘導すると、AP-1活性が抑制されることが確認された。一方、コントロールのGFP #1とGFP #3では、AP-1活性は抑制されなかった。

4. TAM67誘導による細胞増殖、細胞周期への影響

MTT法を用いた足場依存性増殖の検討で、TAM67 #8とTAM67 #34ではTAM67を誘導すると増殖が抑制されたが、コントロールのGFP #1とGFP #3では抑制されなかった。TAM67 #8とGFP #3を用いたフローサイトメトリー解析では、TAM67の誘導にてTAM67 #8ではS期細胞の割合が減少し、G0/G1期細胞の割合が増加したが、コントロールのGFP #3ではそのような変化はみられなかった。

5. TAM67誘導による足場非依存性増殖の抑制

ソフトアガロース法を用いた足場非依存性増殖の検討で、TAM67 #8とTAM67 #34ではTAM67を誘導すると増殖が抑制されたが、コントロールのGFP #1とGFP #3では抑制されなかった。

6. TAM67誘導によるin vivo腫瘍増殖の抑制

TAM67 #8とGFP #1をヌードマウスに皮下注射した。腫瘍形成後、ドキシサイクリンを投与されたマウスのTAM67 #8由来の腫瘍は、ドキシサイクリンを投与されなかったマウスと比べ、明らかに増殖が抑制された。しかし、コントロールのGFP #1由来の腫瘍では、ドキシサイクリン投与の有無によって腫瘍増殖に差がみられなかった。

【考察】

コロニー形成法とMTT法では、TAM67によるAP-1活性の抑制がH1299の足場依存性増殖の抑制に関与していることが示された。AP-1活性阻害による同様の細胞増殖抑制効果が、大腸癌細胞株と乳癌細胞株でも報告されており、非小細胞肺癌細胞を含む一部の癌細胞では、その足場依存性増殖がAP-1に依存していることが示唆される。この増殖抑制の主な機序は、TAM67の誘導後にG1期細胞の明らかな増加がみられたことから、G1期での細胞周期の停止であると考えられる。

本研究では、AP-1活性を抑制するとH1299の足場非依存性増殖は明らかに抑制され、in vivoでの腫瘍増殖も抑制することが示された。AP-1活性の抑制によるin vivoでの腫瘍増殖の抑制は、大腸癌や乳癌といった他の癌細胞でも報告されており、AP-1活性の抑制が非小細胞肺癌を含む癌の有望な治療戦略となりうることを示唆している。

最近、一部の肺癌細胞株でc-junのdominant negative mutantによりAP-1活性を阻害すると足場非依存性増殖は抑制されるが、足場依存性増殖は抑制されないことが報告された。しかし、本研究ではAP-1阻害によりH1299の足場非依存性増殖のみでなく、足場依存性増殖についても抑制された。乳癌細胞でも、足場依存性増殖が抑制されるのは細胞株によって異なることが報告されており、こうした増殖におけるAP-1の役割は癌種だけでなく、個々の細胞株毎に異なっていることが示唆される。

【結語】

H1299細胞では、TAM67によってAP-1活性と足場依存性増殖が共に抑制され、G1期からS期への移行が抑制された。さらに、足場非依存性増殖とin vivo造腫瘍能も抑制された。少なくとも一部の非小細胞肺癌細胞ではTAM67によるAP-1阻害によって細胞増殖が抑制され、AP-1が非小細胞肺癌の治療標的になる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 守 内 哲 也
副 査 教 授 近 藤 哲
副 査 教 授 西 村 正 治

学 位 論 文 題 名

cJun dominant negative mutant を用いた AP-1阻害による非小細胞肺癌細胞増殖の抑制

AP-1 は Jun, Fos, ATF ファミリータンパク質から構成されるホモあるいはヘテロ 2 量体の転写因子であり, cJun は AP-1 の主な構成成分である. これまでの報告によると, cJun が非小細胞肺癌組織で高い発現がみられ, cJun は肺癌の発癌や増殖に重要な役割を果たしている可能性がある. 最近, 一部の肺癌細胞株で AP-1 活性を阻害すると足場非依存性増殖は抑制されるが, 足場依存性増殖は抑制されないことが報告された. しかし, 乳癌や大腸癌細胞株での検討では, cJun の足場依存性増殖への関与が報告されている. また, 肺癌細胞における *in vivo* での腫瘍増殖に対して cJun dominant negative mutant による AP-1 阻害が与える影響については, これまで検討されていない. そこで, cJun の dominant negative mutant である TAM67 が, 非小細胞肺癌細胞の足場依存性増殖、足場非依存性増殖および *in vivo* 造腫瘍能に与える影響を検討した.

非小細胞肺癌細胞株 NCI-H520 (以下, H520) と NCI-H1299 (以下, H1299) に TAM67 を一過性遺伝子導入し, ルシフェラーゼ法にて TAM67 の AP-1 活性への影響を調べ, コロニー形成法にて TAM67 による増殖能への影響を解析した. TAM67 を H520 と H1299 に一過性遺伝子導入すると, 両細胞株で AP-1 活性は抑制され, H520 ではコロニー形成は減少しなかったが, H1299 のコロニー形成は明らかに減少した. 次に TAM67 の発現がテトラサイクリンで誘導される H1299 細胞株を作成し, TAM67 による足場依存性増殖への影響を MTT 法で, 細胞周期への影響をフローサイトメトリー法で調べた. 実験には TAM67 の高い発現が確認された 2 つのクローン細胞 (TAM67 #8 および TAM67 #34) を用い, コントロールには GFP クローン細胞 (GFP #1 および GFP #3) を用いた. TAM67 #8 と TAM67 #34 でドキシ

サイクリン存在下に TAM67 を誘導すると、AP-1 活性が抑制された。MTT 法では、TAM67 #8 と TAM67 #34 で TAM67 を誘導すると増殖が抑制されたが、コントロールの GFP #1 と GFP #3 では抑制されなかった。TAM67 #8 と GFP #3 を用いたフローサイトメトリー解析では、TAM67 の誘導にて TAM67 #8 では S 期細胞の割合が減少し、G0/G1 期細胞の割合が増加したが、コントロールの GFP #3 ではそのような変化はみられなかった。また、ソフトアガロース法を用いて足場非依存性増殖について検討したところ、TAM67 #8 と TAM67 #34 では TAM67 を誘導すると増殖が抑制されたが、コントロールの GFP #1 と GFP #3 では抑制されなかった。さらに、TAM67 クローン細胞由来の腫瘍を形成させたヌードマウスにドキシサイクリン含有水を投与し、TAM67 の *in vivo* における造腫瘍能への影響について検討した。ドキシサイクリンを投与されたマウスの TAM67 #8 由来の腫瘍は、ドキシサイクリンを投与されなかったマウスと比べ、明らかに増殖が抑制された。しかし、コントロールの GFP #1 由来の腫瘍では、腫瘍増殖に差がみられなかった。

以上の結果から、少なくとも一部の非小細胞肺癌細胞では TAM67 による AP-1 阻害によって細胞増殖が抑制され、AP-1 が非小細胞肺癌の治療標的になる可能性が示唆された。

審査にあたり、副査守内教授から、1) 遺伝子のプロモーター領域には、どの程度 AP-1 の結合部位が存在するのか、2) AP-1 阻害による正常細胞への影響について質問があった。次いで副査近藤教授から、1) AP-1 阻害により増殖が抑制される細胞株と抑制されない細胞株では、その相違の要因は何が考えられるか、2) 臨床応用に向けて、TAM67 をどのように効率よく腫瘍細胞に発現させるかについて質問があった。また、副査西村教授から、1) 肺癌では cJun の活性化がどの程度みられるのか、2) 肺癌で AP-1 阻害は、単独で臨床に応用できるかについて質問があった。最後に主査秋田教授から、1) 肺癌細胞にて TAM67 により AP-1 を阻害すると、アポトーシスは誘導されるのか、また、他の細胞では過去に報告があるのか、2) より高い治療効果を引き出すために、他の治療方法を併用するようなアイデアはあるかについて質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自験データや過去の文献を引用し、概ね適切に解答した。

この論文は、肺癌における AP-1 の細胞増殖への影響を *in vivo* でも示した点で高く評価され、今後肺癌の治療に応用されることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。