

学位論文題名

Anti-tumor activity of ESX1 on cancer cells
harboring oncogenic *K-ras* mutation(腫瘍原性 *K-ras* 変異を有する癌細胞に対する ESX1 の抗腫瘍効果)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

ESX1 (extraembryonic, spermatogenesis, homeobox 1 homolog) はヒト X 染色体 Xq22.1 上の *ESX1* 遺伝子によりコードされる全長 65 kDa の paired-like ホメオドメイン蛋白である。細胞内において ESX1 はプロリンに富む反復領域をもつ 20 kDa の C 端断片とホメオドメインを含む 45 kDa の N 端断片に分解される。その後、N 端断片は核内に移行し *K-ras* 遺伝子の第一イントロン内の P3 配列 (TAATGTTATTA; REK; Repressor Element of *K-ras*) に特異的に結合し転写リプレッサーとして機能する。K-Ras は Ras ファミリー蛋白の一つで、機能獲得型 K-Ras は細胞癌化に必須の異常増殖シグナルを生成する。この遺伝子異常は細胞癌化だけではなく癌形質の維持にも必須であると推察され K-Ras は癌治療における分子標的療法の有力な標的の一つと考えられてきた。これまでの研究で培養腫瘍細胞に異所性発現させた ESX1 は *K-ras* リプレッサー機能を介して腫瘍原性 K-Ras 蛋白発現を抑制し、*K-ras* 遺伝子変異をもつ腫瘍細胞の増殖を抑制できることが報告されている。本研究では ESX1 の抗腫瘍効果を *in vivo* において検討することを目的とした。

【材料と方法】

プラスミド: pcDNA3/N-ESX1 は pcDNA3/ESXR1- Δ C 上の *ESXR1- Δ C* cDNA 終端直後にユニバーサルターミネータを挿入し作成した。pET16b-TAT/N-ESX1 は大腸菌発現ベクター pET-16b に HIV-1 TAT 蛋白の膜移行領域 (PTD: protein transmembrane domain) とその下流に *N-ESX1* cDNA を挿入し作成した。安定発現株: HCT-tet (ヒト大腸癌細胞株 HCT116 細胞にテトラサイクリン依存的に任意の遺伝子を発現させる転写因子 rtTA (reverse tetracycline transactivator) を安定発現させた細胞株) に pOPTET-BSD/N-ESX1 (*N-ESX1* cDNA を pOPTET-BSD ベクターに挿入) を導入し選択培地で培養し N-ESX1 安定発現株を樹立した。ウェスタンブロット法: 細胞溶解液の上清をサンプルとして SDS-PAGE にて分離後、免疫ブロットを行った。コロニー形成抑制法: 蛋白発現プラスミドとピューロマイシン耐性遺伝子ベクターを細胞内に導入し、ピューロマイシンを含む培地で培養した。ルシフェラーゼアッセイ: 蛋白発現ベクターとともにレポーターベクター、pRL-TK をリン酸カルシウム法でヒト骨肉腫細胞株 U2-OS 内に導入し 24 時間後デュアルルシフェラーゼアッセイにて解析した。リコンビナント蛋白精製: BL21(DE3) 大腸菌株に TAT/N-ESX1 発現ベクターを導入、0.4mM IPTG にて蛋白発現を誘導し Ni-NTA ビーズで蛋白を精製した。Xenograft assay: 6 週齢の BALBc/AJcl nu/nu (ヌードマウス) の背側に HCT-tet または N-ESX1 安定発現株 1×10^6 個を皮下接種し腫瘍径を観察した。0.17 μ M TAT/N-ESX1 または Δ TAT/N-ESX1 を含む培地で 48 時間培養した HCT116 細胞をヌードマウ

スの両背側に1カ所につき 1×10^6 個皮下接種し腫瘍生着の有無を観察した。免疫染色法：トランスフェクション後24時間に細胞を固定、免疫染色を行い観察は共焦点顕微鏡で行った。

【結果】

これまでの研究で使用していたESXR1- Δ Cの3'末端にユニバーサルターミネータを挿入しESXR1- Δ CのC端末尾のpcDNA3由来の35アミノ酸を4アミノ酸に減らしたN-ESX1を作成した。HCT116に一過性導入したN-ESX1は細胞核内に発現し、ウェスタンブロットでK-Ras蛋白の発現抑制が確認された。またpGL3-Promoter ベクターに3×REK配列を挿入したレポーターのルシフェラーゼ活性の抑制を認め、コロニー形成抑制試験でK-ras変異を持つ大腸癌細胞株SW480、HCT116の増殖抑制を認めた。以上よりN-ESX1はESXR1- Δ Cと同等の生物学的活性を有すると結論づけられた。次にテトラサイクリン誘導性にN-ESX1を発現するHCT116細胞株を樹立しようと試みたが、樹立した細胞株はいずれも薬剤非依存的にN-ESX1を発現したため、これをN-ESX1構成的発現株とし研究を進めた。ヌードマウスの背側の左側にHCT-tet (親株)、右側にN-ESX1安定発現株を接種し腫瘍の増殖を比較したところ、HCT-tetは安定発現株と比べて明らかに腫瘍増大率が大きかった。安定発現株はN-ESX1の発現量も弱くK-Rasの発現抑制も軽度であったが *in vivo*の結果よりN-ESX1によるK-Ras蛋白の発現抑制は軽度でも十分に腫瘍原性を抑えると考えられた。次にN-ESX1の癌治療応用を考え、大腸菌発現系を用いてHIV-1 TAT蛋白の膜移行領域 (PTD) の下流にN-ESX1を融合させたTAT/N-ESX1蛋白を作成、精製した。TAT-PTDはその下流に任意の蛋白を融合させることにより蛋白を細胞内に直接移入することが知られている。また、コントロールとしてTAT-PTD領域を持たない Δ TAT/N-ESX1を作成した。免疫染色法にて Δ TAT/N-ESX1はHCT116細胞内には検出されなかったが、TAT/N-ESX1は細胞内に入ることが確認された。MITアッセイにおいてもTAT/N-ESX1は増殖抑制を示したことよりTAT/N-ESX1は *in vitro* においてHCT116細胞内に入り増殖抑制を来すことが示された。さらにTAT/N-ESX1で48時間培養されたHCT116は Δ TAT/N-ESX1で培養された細胞、およびコントロールと比較してヌードマウスへの生着率が有意に抑制された。

【考察】

これまでアンチセンスオリゴヌクレオチドやフラネシルトランスフェラーゼ阻害剤などのRasを標的とした抗腫瘍剤を用いた治療戦略が精力的に研究されてきたが、K-ras 遺伝子の転写調節を分子標的療法の標的とした研究は知られていない。今回の研究ではESX1のN端断片をK-rasリプレッサーとしてとらえK-ras変異をもつ腫瘍に対する*in vivo*における抗腫瘍効果を検証した。分子標的療法を考える上で、N-ESX1を細胞内に効率よく導入する手法が望まれるが、ウイルスベクターを用いた方法などでは遅発性に白血病を誘発するなど重篤な副作用が問題となる。HIV-1のTAT蛋白の膜移行領域(TAT-PTD)にN-ESX1を融合させたTAT/N-ESX1は *in vivo*の実験においてK-ras変異をもつ癌細胞の増殖を抑制することを見出した。本研究から、K-rasリプレッサーとしてのESX1を用いた新規分子標的癌治療の開発への道が開かれたと考える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

Anti-tumor activity of ESX1 on cancer cells harboring oncogenic *K-ras* mutation

(腫瘍原性 *K-ras* 変異を有する癌細胞に対する ESX1の抗腫瘍効果)

論文の内容はヒト X 染色体 Xq22.1 上の *ESX1* 遺伝子によりコードされる ESX1 (extraembryonic, spermatogenesis, homeobox 1 homolog)の N 端断片が *K-ras* 遺伝子の第一イントロン内の P3 配列 (TAATGTTATTA; REK; Repressor Element of *K-ras*) に特異的に結合し、転写リプレッサーとして機能することを介して腫瘍原性 *K-ras* 変異をもつ腫瘍細胞の増殖を *in vitro* において抑制することを背景に、この抗腫瘍効果を *in vivo* において検討することを目的としたものであった。これまで研究に用いられて来た ESX1- Δ C を改変した N-ESX1 が ESX1- Δ C とほぼ同等の抗腫瘍効果を *in vitro* において示すことを確認した後、以後の実験に用いていた。N-ESX1 構成的安定発現細胞株を用いた実験において、N-ESX1 のヌードマウス生体内における抗腫瘍効果を示し、HIV-1 の TAT 蛋白の膜透過領域 TAT-PTD と N-ESX1 の融合蛋白を用いて細胞内に N-ESX1 を導入し、*in vitro* における抗腫瘍効果および、ヌードマウス生体内における抗腫瘍効果を明らかにした。この論文における研究は、*K-ras* 遺伝子を分子標的として N-ESX1 の *K-ras* リプレッサー機能を利用し、*K-ras* の転写抑制を介した腫瘍原性 *K-ras* 変異を有する癌細胞に対する抗腫瘍効果を利用した新規治療戦略の開発の可能性を初めて示唆するものであった。

申請者はこれらの内容をスライドにまとめ約 15 分の発表を行った。発表においては論文には掲載されていなかったデータも含め提示し、論文の内容を補足していた。発表の後、副査の浅香教授より、この N-ESX1 が臨床応用された場合、腓癌を含む固形癌における複数の遺伝子異常に対して *K-ras* リプレッサー機能だけで果たして単剤で治療効果が得られるのか、また ESX1 のリプレッサー機能は他の遺伝子にも影響しており、この抗腫瘍効果については他の遺伝子の影響もあるのではないかと、との質問があった。これに対し申請者は、これまでの研究および本研究から腫瘍原性 *K-ras* 変異に生存を強く依存している腫瘍に対して ESX1 は特異的に抗腫瘍効果を発揮すると推察され、他の遺伝子の転写を抑制することや腫瘍自体が他の遺伝子異常を有する場合においてもこれらを考慮せず単剤で治療効果が得られることが予想されると回答した。つづいて副査、小池教授より全身投与する場合、癌種に特異的な薬剤投与の治療戦略(Drug delivery system)はあるのかとの問いがあり、申請者は血管造影などを利用した動脈注射などによる至近距離からの投与を検討していると回答した。さらに主査、秋田教授より *EGFR* 遺伝子異常や *Her-2/neu* 遺伝子増幅などによって Ras 上流からの異常増殖亢進シグナルが存在し、*K-ras* 遺伝子が野生型である場合に

N-ESX1 は効果があるのか、また K-Ras 蛋白質発現の抑制の程度が軽度にもかかわらず著明な抗腫瘍効果を示していたのはなぜかと言う質問に対し、申請者は先の柳原らの論文の実験で、野生型 K-ras 遺伝子をもつ腫瘍に対しては ESX1- Δ C による K-Ras 発現抑制は他の Ras ファミリーによる代償作用により抗腫瘍効果を示さなかったことを引用し、野生型 *K-ras* 遺伝子を持つ場合、N-ESX1 によって K-Ras 蛋白質発現を抑制しても他の Ras ファミリーによって代償され下流にシグナルは伝わる可能性があることや、Ras より上流からの増殖シグナルは必ずしも Ras-MAPK 経路を介するものだけではなく他のシグナル経路を経由する場合もあるため、Ras より上流からの増殖シグナルに対しては N-ESX1 は効果がないかあっても部分的なものであることが予想されると回答した。また、K-Ras 蛋白質の発現抑制が軽度であっても、今回の実験に用いた腫瘍細胞は腫瘍原性 K-Ras 蛋白質に生存を強く依存しており(K-Ras addiction)、極少量その K-Ras の発現を阻害するだけで、addiction の状態を解除させ、腫瘍増殖を抑制しうる可能性があるとは回答した。

この論文は、腫瘍原性 *K-ras* 変異をもつ腫瘍に対する新規治療戦略開発への可能性を示した点で高く評価され、今後の研究の発展が期待される。

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。