


学位論文要旨

氏名 天泉陽介 

論文題目

「Comprehensive Exploration to Identify Predictive DNA Markers of Δ Np63/SOX2 in Drug Resistance in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma (包括的遺伝子探索によるヒト食道扁平上皮癌の薬物抵抗性因子 Δ Np63/SOX2 の同定)」

指導教授承認印

比企直樹 

Comprehensive Exploration to Identify Predictive DNA Markers of Δ Np63/SOX2

in Drug Resistance in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma

(包括的遺伝子探索によるヒト食道扁平上皮癌の薬物抵抗性因子 Δ Np63/SOX2 の同定)

氏名 大泉 陽介

【背景】

ヒストンは核に存在する DNA と結合するタンパクであり、ヒストンアセチル化は遺伝子の転写制御に深く関係している。ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤はがん抑制遺伝子の転写促進等を介して抗腫瘍効果を持つ。腫瘍特異的に作用し副作用が少ないことが期待され、臨床応用が広がっている。

OBP-801 は細菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 由来の新たな HDAC 阻害剤である。OBP-801 は既存の HDAC 阻害剤と比較して極めて強い HDAC 阻害作用を有しており、現在米国 Food and Drug Administration (FDA)で固形癌に対する臨床試験が進行中である。OBP-801 の抵抗性因子は不明である。

【目的】

OBP-801 の抵抗性因子を同定すること。

【方法】

1. ヒト癌株化細胞での薬剤抵抗性の調査

36 種の細胞株 (食道癌 9 種, 胃癌 8 種, 膵癌 7 種, 大腸癌 7 種, 甲状腺癌 5 種)を用いた。細胞を 24 時間培養した後に、OBP-801 濃度を 5nM~100nM に調整した培地で 72 時間培養し、生細胞数を計測した。食道癌細胞株では 5-FU でも同様に実験した。

2. 薬剤抵抗性遺伝子の選定と結果の検証

OBP-801 感受性株 (TE1, TE4) と、抵抗性株 (TE6, TE10, TE11) から Total RNA を抽出した。発現マイクロアレイ (Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array) により遺伝子発現量を測定した。

測定結果から、感受性株において発現が高く抵抗性株において発現が低い遺伝子を受感性に関連する候補遺伝子として選定し、感受性株において発現が低く抵抗性株において高い遺伝子を抵抗性に関連する候補遺伝子として選定した。

選定した候補遺伝子では発現マイクロアレイの結果を reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) で検証した。

候補遺伝子の一つである TP63 遺伝子は TAp63 と Δ Np63 の 2 種の isoform が存在するため、各々に特異的な Primer を設計し RT-PCR で TP63 の isoform を同定した。

3. 脱メチル化・ヒストンアセチル化処理による遺伝子発現制御様式の分類と候補遺伝子の絞り込み

培養した細胞に脱メチル化剤である 5-Aza-dC を 4 日間連日投与した。4 日目には HDAC 阻害剤である Trichostatin A (TSA) を投与した。5 日目に cDNA を抽出し RT-PCR で遺伝子発現の変化を確認した。この処理で発現に変化が見られた遺伝子を Epigenetic type に分類し、変化の見られなかった遺伝子は Genetic type に分類した。

4. 候補遺伝子の機能解析

同定した抵抗性関連遺伝子候補である Δ Np63/SOX2 遺伝子を TE10 から抽出した。プラスミド DNA を用いたリポフェクション法で感受性株である TE1, TE4 に一過性遺伝子導入した。

薬剤抵抗性評価を行い、遺伝子導入による抵抗性の変化を評価した。

細胞増殖能を WST-1 cell proliferation assay で評価した。

足場非依存性コロニー形成能は、アガロースゲル内で細胞を浮遊培養し、3 週間後にコロニー数を計測し評価した。

Small-interfering RNA により抵抗性株の Δ Np63 遺伝子のノックダウンを行い、薬剤抵抗性の変化を評価した。

5. 臨床検体における Δ Np63/SOX2 遺伝子の遺伝子増幅の頻度と臨床的意義の検討

対象症例は 1996 年から 2007 年に当院で根治切除を施行した、cStage0-III の食道癌症例 112 例とした。手術検体の腫瘍部と対照正常粘膜から Genome DNA を抽出し、Quantitative-PCR と $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて Δ Np63/SOX2 遺伝子の遺伝子増幅数を算出した。正常粘膜の 2 倍以上の遺伝子増幅であった症例を遺伝子増幅陽性症例とした。遺伝子増幅と臨床病理学的因子との関連を検討した。

手術検体を p63, SOX2 で免疫染色し、遺伝子増幅と染色強度の関連を評価した。

【結果】

1. OBP-801 は 36 種類全ての細胞株で濃度依存性に生細胞数を抑制した。10nM で 50%以上の生存を認めた細胞株は 6 種のみであった。胃癌、膵癌、甲状腺癌ではすべての細胞株で低い抵抗性が見られた。大腸癌細胞株では全体的に抵抗性が高かった。

食道癌でのみ、抵抗性の高い細胞株と低い細胞株が混在しており、中でも低い抵抗性を示した TE1, TE4 を OBP-801 感受性株とした。逆に高い抵抗性を示した TE6, TE10, TE11 を抵抗性株とし、感受性株と抵抗性株を比較することで薬剤抵抗性因子を検索する方針とした。

2. 発現マイクロアレイを用いた候補遺伝子の選定により、抵抗性関連遺伝子候補 20 遺伝子と感受性関連遺伝子候補 5 遺伝子を選定した。

RT-PCR による検証により、抵抗性株で発現し感受性株で発現のない抵抗性関連遺伝子は STEAP1, C3orf58, SOX2, TP63, IFI16 の 5 遺伝子であった。SOX2 は抵抗性株の TE11 で発現がみられなかった。

抵抗性株で発現している TP63 遺伝子の isoform は Δ Np63 であることが判明した。

3. Epigenetic type の遺伝子は MAGEA4, SOX2, Δ Np63, ALD1H1 であり, 中でも Δ Np63/SOX2 の発現が強く抑制された. 先に選定した 5 遺伝子とで共通していた Δ Np63/SOX2, の 2 遺伝子が特に有望な候補遺伝子と考えた.

4. 一過性遺伝子導入の結果, Δ Np63 の導入で SOX2 は誘導されず, SOX2 の導入でも Δ Np63 は誘導されなかった.

薬剤抵抗性評価では, 2 遺伝子共に両方の感受性株において, 遺伝子導入による有意な抵抗性の増強を認めた. 細胞数の評価では遺伝子導入による有意な差は見られなかった. 細胞増殖能と足場非依存性コロニー形成能は, 両方の感受性株で Δ Np63 遺伝子導入による有意な増強を認めた. SOX2 では有意差は認めなかった.

Δ Np63 のノックダウンにより, TE6, TE10, TE11 全てで OBP-801, 5-FU の薬剤抵抗性が減弱したことを確認した.

5. 臨床検体における検討では, Δ Np63/SOX2 の遺伝子増幅は相関係数 0.81 ($p < 0.0001$)と強い相関関係にあり, 全体の 16%の症例で共通の遺伝子増幅が見られた.

臨床病理学的因子との検討で, pT 因子 ($p=0.03$)と術前治療の有無 ($p=0.0003$)が遺伝子増幅と関連していた. 次に術前治療を行った群 ($n=32$)での検討では術前治療の治療効果 ($p=0.03$)とのみ有意な関連があり, 治療効果 Grade2/3 の症例 ($n=7$)では全例が遺伝子増幅陰性であった.

免疫染色では, 遺伝子増幅陽性症例で染色強度が優位に強いこと ($p63; p < 0.001$, SOX2; $p=0.03$)を確認した.

【考察】

OBP-801 は細胞株の増殖を強力に抑制し, 食道癌細胞株では 5-FU の 1/1000 の濃度で同等の細胞数抑制が見られた. 膵癌や甲状腺未分化癌といった悪性度の高い癌腫でも高い感受性が見られており, 有望な抗腫瘍薬と考える.

TP63 は p53 遺伝子ファミリーに属し, TAp63 と Δ Np63 の isoform が存在する. p53 遺伝子は細胞のアポトーシスを誘導することで癌抑制性に働き, TAp63 isoform はその機能の一部を担っているが, Δ Np63 isoform は TAp63 と拮抗し癌促進性に働くことが知られている. 一方 SOX2 は扁平上皮癌の幹細胞性維持における中心的な転写因子とされている. The Cancer Genome Atlas Reserch Network は食道扁平上皮癌で最も高頻度な遺伝子増幅を認めた遺伝子として Δ Np63/SOX2 を挙げており, これら 2 遺伝子は複数の扁平上皮癌において重要な癌関連遺伝子として注目されている.

本実験で OBP-801 の薬剤抵抗性因子の探索を行い, Δ Np63/SOX2 を選出した. 5-Aza-dC 及び TSA 処理で発現の抑制が見られたことで, Epigenetic な制御を受けていることが判明した. 同時に食道癌臨床検体での検討では, 2 遺伝子の共通した遺伝子増幅が術前化学療法への抵抗性と関連したことが確認できた. 以上により Δ Np63/SOX2 は Epigenetic/Genetic 両方の制御を有する, 食道扁平上皮癌において重要な意義を持つ遺伝子であると考えた.

【結語】

OBP-801 を用いた薬剤抵抗性因子の探索により Δ Np63 と SOX2 遺伝子を同定した. Np63 と SOX2 は食道扁平上皮癌における重要な治療抵抗性因子である可能性が示唆された.