

論文の内容の要旨

論文題目 原発性肺癌における細胞増殖抑制的なキメラ転写産物についての解析

氏名 石川理恵

序文

2011年度の統計によれば、日本人の死因の第1位は依然として癌であり、また、癌死の第1位は男女とも肺癌である。癌の発生・進展には、遺伝子異常によって生じる非生理的なシグナル伝達や代謝機構が深く寄与しているため、癌に関連する新たな遺伝子異常を同定することは、治療戦略開発の貴重な糸口となりうる。遺伝子異常はドライバー変異あるいはパッセンジャー変異に分けられるが、これまでは、主にドライバー変異が研究の対象とされてきた。最近、2つの変異が生じると致死性となるが、どちらか一方の変異のみでは致死性とならない遺伝子変異の組み合わせがあるという、合成致死性とよばれる概念が注目されている。実際、同定されたドライバー変異に対して、その変異分子と合成致死性の関係にある分子をスクリーニングし、標的とする戦略が検討されている。さらに、合成致死性の概念は、これまでパッセンジャー変異として注目されることのなかった変異についても異なった見方を与える。癌のゲノム不安定性により、新たに多くのパッセンジャー変異が出現するが、その中のいずれかの変異と合成致死性の関係にある遺伝子を見出すことができれば、その分子を標的とすることができる。

慢性骨髄性白血病に特異的に認められるフィラデルフィア染色体の発見以来、悪性腫瘍に関連する遺伝子異常として、多数のキメラ遺伝子が報告されている。2つの遺伝子が融合することにより、異常な挙動を示すキメラタンパクが出現し、これが癌の発生・進展を促進すると考えられている。

本研究においては、外科的に摘出された肺癌検体より得られた転写産物から、遺伝子融合を検索し、遺伝子融合が同定できた場合、癌細胞に対する影響が促進的か抑制的かにかかわらず、新たな治療戦略の開発に役立つ知見を得ることを目標とした。

結果

1. キメラ転写産物の検索

腫瘍に関連する遺伝子融合は、とくに血液腫瘍で多く報告されてきた。転座を起こしやすい遺伝子として、転写因子およびチロシンキナーゼを中心としたシグナル分子が挙げられる。

血液腫瘍と融合に関連する論文を検索して抽出した転写因子 28 遺伝子と、正常肺で発現亢進

のみられないチロシンキナーゼ 16 遺伝子を候補遺伝子として、肺癌臨床検体 27 症例を対象に、キメラ転写産物を検索した。候補遺伝子が融合を起こし、5' (3') 側が別の遺伝子に置き換わっているとすれば、5' (3') 側末端近傍領域と、活性ドメイン (転写因子は DNA 結合ドメイン、チロシンキナーゼはチロシンリン酸化酵素ドメイン) の発現量に差が生じると考えられる。そこで、末端近傍領域と活性ドメインの発現量の差を定量的 RT-PCR により評価し、大きな差を認めた遺伝子について、その 5' (3') の配列を同定するために、Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) を施行した。その結果、転写因子 RUNX1 の 3' RACE により、RUNX1 のエクソン 1, 2 と GLRX5 のエクソン 2 が融合しているキメラ転写産物を発見し、RUNX1-GLRX5 と命名した。

キメラ転写産物 RUNX1-GLRX5 は肺癌臨床検体 80 症例のうち 40 症例で陽性であった。ステージ IA 症例 (融合陽性症例 14 例, 融合陰性症例 14 例) の生存分析では、融合陽性症例が有意に予後良好であった。

2. RUNX1 および GLRX5 の DNA 配列の計算生物学的解析

RUNX1-GLRX5 では、RUNX1 のエクソン 2 と GLRX5 のエクソン 2 が直接結合していた。キメラ転写産物が出現する機序として、染色体転座、トランス・スプライシング、転写時スリップが知られている。トランス・スプライシングによる融合であれば、RUNX1 のイントロン 2 および GLRX5 のイントロン 1 の間で起こったこととなる。また、染色体転座あるいは転写時スリップによる融合であれば、一旦、RUNX1 のイントロン 2 配列内のいずれかの部位と GLRX5 のイントロン 1 配列内のいずれかの部位で融合した pre-mRNA が合成された後、スプライシングを受けたこととなる。そこで、RUNX1 のイントロン 2 および GLRX5 のイントロン 1 について調べた。

NCBI データベースによれば RUNX1 のイントロン 2 は 155,878 塩基、GLRX5 のイントロン 1 は 8,562 塩基で、それぞれ両端に典型的なスプライシング配列である GT-AG 配列をもっていた。ヒトのイントロンの長さは、約 70% が 3,000 塩基以下であり、RUNX1 のイントロン 2 は非常に長いといえる。RUNX1 および GLRX5 の DNA 配列を解析対象として、Blastn を用いて類似配列を検索した。GLRX5 上に 1 ヶ所、RUNX1 上に複数ヶ所存在する Alu 配列により、ふたつのイントロンは複数の位置で類似した配列をもつことがわかった。

3. RUNX1-GLRX5 と鉄代謝関連遺伝子発現

RUNX1 は分子量約 51.8 kDa の転写因子で、造血系細胞に発現しており、血球の分化に関わる。また、GLRX5 は分子量約 16.6 kDa のタンパクで、ミトコンドリアにおける鉄硫黄クラスターの生合成に関わる。そこで、RUNX1-GLRX5 が、癌細胞における鉄代謝に何らかの影響を与えている可能性について検討した。

RUNX1-GLRX5 の鉄代謝への影響をみるために、前述の融合の有無を調べた臨床検体 80 症例を対象に、鉄代謝関連遺伝子であるフェリチン (FTL)、トランスフェリン受容体 (TFR1)、二価金属輸送体 (DMT1)、フェロポルチン (FPN1) と、正常型 GLRX5 の定量的 RT-PCR を行った。各遺伝子の発現量を融合陽性症例、融合陰性症例で比べると、TFR1、DMT1 の発現量は融合陽

性症例で有意に低かったが、GLRX5 の発現量は両者で差がみられなかった。融合陽性症例、融合陰性症例とも、TFR1 - DMT1, TFR1 - FPN1, DMT1 - FPN1 の間には正の相関が認められた。病期ごとにみると、融合陽性症例では、病期が進行すると、TFR1, DMT1 の発現量は低下しており、融合陰性症例と逆のパターンを呈していた。

4. RUNX1-GLRX5 キメラタンパクの機能解析

キメラ転写産物あるいはキメラタンパクの存在が鉄代謝関連遺伝子の発現に与える影響を検討するため、培養細胞にキメラ遺伝子発現ベクターを遺伝子導入し、鉄代謝関連遺伝子の発現量や増殖能の変化を観察することとした。

RUNX1-GLRX5 と正常型 GLRX5 を組み込んだレンチウイルスベクター、およびブランクのレンチウイルスベクターを、RUNX1-GLRX5 を発現していない肺癌細胞株である A549, H1975, H1792, H1755 に導入した。A549 については、導入後にさらにペニシリンカップ法を行い、より発現量の多いコロニーを選択した。4 細胞株および A549 コロニー由来の細胞いずれにおいても、鉄代謝関連遺伝子に対する RUNX1-GLRX5 導入の影響はみられなかった。A549 コロニー由来の細胞については、その比増殖速度も検討したが、RUNX1-GLRX5 導入の影響はみられなかった。

最後に、RUNX1-GLRX5 を組み込んだベクターからタンパクを抽出したところ、ウエスタンブロットにてベクター由来のタンパクが検出されたことから、このキメラ転写産物は生体内でもタンパクに翻訳されうると考えられた。

考察

本研究で発見されたキメラ転写産物の RUNX1-GLRX5 は、癌組織に対し抑制的に働いていることが示唆された。

遺伝子融合の促進因子は明らかでないが、文献的には、長いイントロンやイントロン間の共通配列の存在が挙げられている。RUNX1 および GLRX5 の当該イントロンについては、どちらの条件も満たしていた。キメラ転写産物が出現した機序を特定することはできず、染色体レベルで存在するものなのか、転写時に生じたものなのか判明しなかった。

RUNX1-GLRX5 キメラ転写産物あるいはキメラタンパクの存在が正常型 GLRX5 の機能を阻害している可能性がある。GLRX5 は 4 量体を形成して鉄硫黄クラスター生合成に関わるとされているが、この 4 量体を構成する GLRX5 のうちのいくつかは RUNX1-GLRX5 に置き換わり、4 量体としての機能が落ちるなどの機序が考えられる。

遺伝子融合陰性症例および融合陽性症例の間で鉄代謝関連遺伝子の発現パターンに差が生じた原因について、遺伝子融合を主因とした相関、鉄代謝関連遺伝子発現の異常を主因とした相関、正あるいは負の選択によって生じた相関などの可能性が挙げられた。培養細胞へ RUNX1-GLRX5 の発現ベクターを導入したが、臨床検体で得られた結果は誘導されなかった。得られた結果と矛盾が少ないと考えられるのは、負の選択が関与した可能性である。RUNX1-GLRX5 をもつ症例では、TFR1/DMT1 高発現の症例が少ないことから、TFR1/DMT1 発現量増加と RUNX1-GLRX5

融合とが合成致死性様の関係にあることが示唆される。ひとつの仮説を以下に示す。GLRX5は鉄硫黄クラスター合成に関わることから、RUNX1-GLRX5は鉄硫黄クラスター合成回路を阻害する。RUNX1-GLRX5をもたず、鉄硫黄クラスター合成能が正常な癌細胞が何らかの原因でTFR1の発現量を増加させた場合、過剰に取り込まれた鉄は鉄硫黄クラスターとなり、有効に利用される。その結果、この癌細胞は増殖能を高める(正の選択)。一方、RUNX1-GLRX5をもつ癌細胞では過剰に取り込まれた鉄は鉄硫黄クラスターに組み込まれず、細胞にとって不利な遊離鉄が増える。その結果、この細胞は、細胞毒性により増殖できない(負の選択)。これら正および負の選択によって、融合陽性細胞では、融合陰性細胞に比べてTFR1/DMT1の発現が少ない細胞が優位となる。

RUNX1-GLRX5をもつ肺癌症例では、TFR1/DMT1の発現量が減少すると悪性度が上がる可能性がある。細胞内鉄量が下がらない管理が必要と考えられる。癌細胞では、とくに悪性度の高いものでTFR1の発現量が増加することが多いとされている。このような症例に対しては、GLRX5の阻害薬、あるいは、鉄硫黄クラスター合成阻害薬の投与が有効である可能性がある。

今回同定されたRUNX1-GLRX5はドライバー変異ではないが、その解析から癌治療に役立つ可能性のある知見が得られた。一見パッセンジャー変異と判定される多くの変異についても、今後さまざまな視点から解析されるべきと考えられた。