

	さかもとよしこ		
氏名(本籍)	坂本佳子	(東京都)	
学位の種類	博士(情報科学)		
学位記番号	情博第234号		
学位授与年月日	平成14年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科	東北大学大学院情報科学研究科(博士課程)		
専攻	人間社会情報科学専攻		
学位論文題目	包括的遺伝子発現解析によるヒト大腸多段階発癌機構の解析		
論文審査委員	(主査)		
	東北大学教授 飛田 渉	東北大学教授	井樋 慶一
	東北大学教授 野田 哲生	東北大学助教授	大原 秀一
	(医学系研究科)		

## 論文内容要旨

### 1. 序論

大腸癌の発生には腺腫を経て進行癌となる経路と de novo の経路の、主に2つの経路が存在する。特に前者は大腸癌の50%以上を占めると考えられており、その詳細な解析により多段階発癌モデルが提唱されている。

APC (adenomatous polyposis coli) 遺伝子は家族性大腸腺腫症(familial adenomatous polyposis; FAP)の原因遺伝子として単離された癌抑制遺伝子であり、この遺伝子の変異はFAP患者のみならず、一般の大腸癌においても高頻度に認められる。このAPC遺伝子の不活化は初期の腺腫の段階ですでに認められることからAPC遺伝子は腫瘍発生の最も初期の段階に深く関与する癌抑制遺伝子であると考えられている。従って腺腫を経て発生する大腸癌の発生過程においては初期のAPC癌抑制遺伝子変異が大腸腺腫(ポリープ)形成を引き起こし、さらに癌遺伝子や癌抑制遺伝子などの変異が蓄積することにより癌へと進行していくと考えられている。これまでにras癌遺伝子やp53癌抑制遺伝子の変異が報告されているが、これらの変異は進行癌のごく一部を占めるに過ぎず、他にどのような遺伝子に変異が生じているのか、また癌の発生においてこれらの複数の因子の遺伝的変異がどのような機構で癌進行をもたらすかについては不明な点が多い。近年、大腸癌罹患患者数は急増しており、癌の治療法の早急な確立が期待されている。そして腺腫以降の発癌のステップにどのような遺伝子が関与し、どのような機構で癌進行をもたらすかを解明することによって、癌の遺伝子診断や治療薬の開発等、臨床応用に役立てることが期待できる。

これまで前癌状態である大腸腺腫由来の細胞株を樹立することは困難であったが、当研究室では大腸腺腫由来細胞株を世界に先駆けて樹立し、さらに大腸癌由来細胞株も合わせて用いることにより細胞株を用いての大腸多段階発癌の各ステップの解析を行うことが可能となった。

本研究では大腸腺腫由来細胞株、大腸癌由来細胞株を用いて SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)法による包括的遺伝子発現解析を行った。SAGE 法は発現している全ての遺伝子を同定、定量する方法として開発された包括的遺伝子発現解析法である。大腸腺腫由来細胞株と大腸癌由来細胞株の両者についてそれぞれ SAGE 法を行い、これらを比較することにより大腸腺腫が癌化するステップでの遺伝子発現の変化を包括的に解析し、ヒト大腸多段階発癌のメカニズムの解明を試みた。

## 2. SAGE 法による大腸腺腫由来細胞株と大腸癌由来細胞株における遺伝子発現の変動の解析

大腸腺腫が癌化するステップでの遺伝子発現の変動を包括的に解析することによって、この癌化のステップに重要な役割を果たしている遺伝子を同定するために、SAGE 法により大腸腺腫由来細胞株(FPCK1-1)と大腸癌由来細胞株(OUMS23)の間で、その発現に変化の見られる遺伝子の同定を試みた。

その結果、OUMS23 と比較して FPCK1-1 で出現頻度が高かった遺伝子には ISG12, 6-16, MxA など、複数の I 型インターフェロン誘導性遺伝子の発現が認められた。さらに複数の細胞株を用いた定量的 RT-PCR 法によっても、これらの遺伝子は全て大腸腺腫由来細胞株で高い発現が認められ、大腸癌由来細胞株ではその発現が低下していることが確認された。以上の結果から癌化のステップにおける I 型インターフェロンシグナル伝達系の不活性化の関与が示唆された。

## 3. 大腸腺腫由来細胞株と大腸癌由来細胞株の間での I 型インターフェロン誘導性転写活性の比較

I 型インターフェロン誘導性遺伝子は、そのプロモーター上に ISRE (interferon-stimulated response element) と呼ばれる共通の塩基配列を有し、このシスエレメントを介して I 型インターフェロンによる発現制御を受けている。そこで各細胞株におけるインターフェロン未刺激状態での ISRE を介した I 型インターフェロン誘導性転写活性化能を、ルシフェラーゼアッセイにより測定した。

その結果、4 種の大腸癌由来細胞株における I 型インターフェロン誘導性転写活性は全て腺腫由来の FPCK1-1 に比べて 1/2 以下であった。このことから大腸癌由来細胞株における I 型インターフェロン誘導性遺伝子群の発現低下は ISRE を介した転写活性の低下によるものである可能性が示唆された。

ISRE シスエレメントを介した I 型インターフェロンシグナル応答による転写活性は、IRF-1,

IRF-2, ISGF3 が転写因子として関与している。IRF-1, IRF-2 はそれぞれ単量体として、ISRE シスエレメントに結合する。ただし、IRF-1 は転写促進因子として機能し、IRF-2 は転写抑制因子として機能する。一方 ISGF3 は STAT1, STAT2, p48 から成る 3 量体として ISRE シスエレメントに結合し、これを介した転写を活性化する。すなわち I 型インターフェロン誘導性遺伝子群の転写活性化制御機構は ISGF3 複合体によるものと IRF-1 を介するもの、異なる 2 つの経路の存在が明らかとなっている。

そこで実際にこの ISRE シスエレメントを介した I 型インターフェロン誘導性転写活性の低下に寄与している因子を同定するため、ISRE をプローブとしたゲルシフトアッセイにより、各細胞内で ISRE に結合するタンパク質を同定し、その定量を試みた。大腸腺腫由来細胞株、大腸癌由来細胞株各 4 株についての全細胞抽出液を用いたゲルシフトアッセイの結果、ISRE 由来のバンドが 2 本、大腸腺腫由来細胞株にのみ特異的に検出された。スーパーシフト実験の結果、大腸腺腫由来細胞株特異的な 2 本のバンドは IRF-2 および p48 との結合体であることが明らかとなった。

IRF2 は IRF1 による転写上昇を抑制することにより ISRE を介した転写活性を負に制御し、単独では ISRE を介した転写活性を変化させない。従って大腸癌由来細胞株で内在性 I 型インターフェロン誘導性転写活性が低下している原因として IRF2 の重要性は低いと考えられ、ISGF3 構成因子である p48 の ISRE シスエレメントへの結合量の低下が重要な役割を果たしていると考えられる。

#### 4. 大腸腺腫由来細胞株と大腸癌由来細胞株の間での I 型インターフェロングナル伝達系関連転写因子群の発現量の比較

ゲルシフトアッセイの結果から、大腸癌由来細胞株で内在性 I 型インターフェロン誘導性転写活性が低下している原因として、ISRE シスエレメントへの結合する p48 の量の低下が示唆された。

I 型インターフェロンが特異的受容体に結合すると、受容体結合性タンパクリン酸化酵素である Jak1/Tyk2 が活性化される。活性化された Jak1/Tyk2 はまず受容体のチロシン残基をリン酸化し、続いてリン酸化型受容体にリクルートされた STAT2, STAT1 のチロシン残基をリン酸化する。STAT1, STAT2 はリン酸化されると二量体として受容体から遊離し、p48 と結合し、三量体 ISGF3 として ISRE を介した転写を誘導すると考えられている。

従って、I 型インターフェロン誘導性遺伝子の発現を誘導する為には ISGF3 を構成する各因子が細胞内にあらかじめ十分量存在していなければならない。つまり ISRE を介した転写活性の制御には I 型インターフェロン受容体、STAT1、STAT2 の一連のリン酸化による制御に加えて、各転写因子のタンパクの発現制御が深く関与している。従って大腸癌由来細胞株で観察さ

れた ISRE へ結合する p48 の低下が、癌化のステップでの I 型インターフェロン誘導性転写活性の低下の原因であることが十分に考えられる。そこで次にこの p48 蛋白レベルの低下の原因を検討するため、まず大腸腺腫由来細胞株 4 株、大腸癌由来細胞株 4 株を用いて p48 の mRNA レベルでの発現量を定量的 RT-PCR 法により比較した。その結果、p48 遺伝子は大腸癌由来細胞株に比べ大腸腺腫由来細胞株で多く発現している傾向が認められ、大腸癌由来細胞株ではほとんど発現が認められなかった。従って、大腸癌由来細胞株においては p48 の mRNA レベルの発現低下が ISRE に結合する p48 の量を低下させ、結果として ISRE を介した転写活性の低下をもたらしている可能性が示唆された。

## 5. 考察

本研究では、大腸腺腫由来細胞株に比べ大腸癌由来細胞株で ISRE を介した I 型インターフェロン誘導性転写活性が低下していること、その原因として大腸癌由来細胞株における p48 の転写レベルの低下が関与している可能性を示した。ゲルシフトアッセイにおいて p48 が大腸腺腫由来細胞株特異的に検出され、大腸癌由来細胞株で認められなかったことから、大腸癌由来細胞株では ISGF3 複合体形成が低下していると考えられる。このことは大腸腺腫が癌化するステップにおいて ISGF3 を介した I 型インターフェロン誘導性転写活性の低下が重要である可能性を示唆している。しかし本実験においては ISGF3 のバンドは検出されなかったことから、大腸腺腫由来細胞株における ISGF3 複合体形成は恒常的であるが低レベルであると考えられる。皮膚黒色腫や膀胱癌由来の癌細胞では恒常的な ISGF3 形成能の低下により I 型インターフェロンに対する感受性が低下しているという報告がある。これらの事実は癌の進行において ISGF3 複合体の低下が重要であるという考えを支持しているが、大腸癌由来細胞株では I 型インターフェロン応答性が保持されており、皮膚黒色腫や膀胱癌とは異なっている。

本研究では大腸癌発癌に伴う遺伝子発現の変化を培養細胞株を用いて検討した。本研究で利用した細胞株は全て APC 遺伝子に変異をもつことから、得られた結果は APC 遺伝子の変異後に生じる変化を反映していると考えられる。しかしインターフェロン誘導性遺伝子の発現低下のメカニズム、その生物学的意義については不明な点が多い。本研究では大腸癌由来細胞株での I 型インターフェロン誘導性転写活性低下に p48 が関与する可能性を示した。今後 p48 の重要性を裏付けるため、大腸癌由来細胞株に p48 遺伝子を導入し、I 型インターフェロン誘導性遺伝子の発現、ISRE を介した転写活性が回復するかどうか、さらに細胞増殖能の変化、ヌードマウスへの移植による腫瘍形成能の変化等を調べることにより、癌としての形質を抑制するかどうか検討する必要がある。また癌組織、正常組織を用いて免疫組織染色を行い、生体内での現象を反映しているかどうか検証しなければならない。

本研究で得られた結果が生体内での現象を反映し、かつ p48 が発癌の抑制に寄与しているこ

とが明らかとなれば、癌化のステップでの p48 の発現低下のメカニズムを解明することにより、腺腫からの発癌を未然に防ぐことが可能となるかもしれない。

本研究で用いた細胞株は各々大腸腺腫と大腸癌の性質を反映し、かつ遺伝子導入、クローニング等が可能であることから、p48 遺伝子の 大腸癌由来細胞株への導入を含め、今後さらに詳細な解析によるヒト大腸多段階発癌機構の解明が期待される。

## 論文審査の結果の要旨

大腸癌の発生には腺腫を経て進行癌となる経路が50%以上を占めており、他は新しく起こるde novoの経路と考えられている。前者の経路の説明として多段階発癌モデルが提唱されている。すなわち、初期のAPC(adenomatous polyposis coli, APC)癌抑制遺伝子変異が腺腫形成を引き起こし、さらに癌遺伝子や抑制遺伝子などの変異が蓄積することにより癌へと進行するという考え方である。しかしながら、如何なる遺伝子の変異がどのような機序で癌への進行がなされるのか、その詳細については未だ解明されていない。本論文は大腸腺腫由来細胞株と大腸癌由来細胞株を用いて包括的遺伝子発現解析を行い、大腸腺腫が癌化する各ステップにおける遺伝子発現の解析からヒト大腸癌の多段階発癌のメカニズムを明らかにしようとしたもので全編5章よりなる。

第1章は緒論であり本研究に関わる背景と目的を述べている。

第2章では、培養細胞株、ベクター、抗体等の本研究に使用した材料と包括的遺伝子解析法として用いたSerial Analysis of Gene Expression(SAGE)法、定量的RT-PCR、ルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイの各方法について述べている。

第3章では本研究における核とも言える結果が述べている。

第一に二種類の培養細胞株、大腸腺腫由来細胞株であるFPCK1-1と大腸癌由来細胞株であるOUMS23においてSAGE法により両株の遺伝子解析を行い、OUMS23に比べFPCK1-1に発現頻度の高い遺伝子およびFPCK1-1に比べOUMS23に発現頻度の高い遺伝子を決定した。それぞれ発現頻度の高い遺伝子について定量的RT-PCR法を用い、mRNAの発現量のレベルでも高いことが示された。

第二に大腸癌株に多く見られた5種類の遺伝子(PARG1, eIF5a, HMG Y, BMP7, C3G)および腺腫に多く見られた8種類(ISG12, MMP7, 6-16, Id-1, TRIP1, PP1,  $\beta$  ig-h3, STAT2)の遺伝子について、他の細胞株(腺腫4細胞株、腺癌4細胞株について検討)にも同様な遺伝子の発現が見られるかどうかの定量的RT-PCR法を用い検討した。その結果、大腸癌株に多く見られた5種類の遺伝子については両細胞株群で一定の傾向が見られなかったが、腺腫に多く見られた8種類の両細胞株群間の比較ではうち6遺伝子が腺腫株に発現が多いことを明らかにした。

第三に大腸腺腫由来細胞株で発現量が多かった遺伝子ISG12, 6-16, STAT2はいずれもI型インターフェロン誘導遺伝子であるといわれており、その説に基づいて、腺腫4細胞株、腺癌4細胞株について実際I型インターフェロン誘導遺伝子群の発現量を検討し、腺腫細胞株にはその発現が多く、癌細胞株では少なかったことを明らかにした。また、ISRE(interferon-stimulated response element)シスエレメントを介した転写活性が大腸癌由来細胞株で低下していることを明らかにした。しかしながら、両者に於いてインターフェロン $\alpha$ 刺激に対するI型インターフェロン誘導遺伝子の反応は見られなかった。更に著者はI型インターフェロン伝達系関連転写因子群の発現量をも検討して、ISREを介した転写活性を制御する転写因子としてp48が重要であることを示した。

第4章はこれらの研究結果に対する考察である。

第5章は結語であり、本論文の総括と将来の研究の方向性を示している。

以上要するに、本論文は、大腸腺腫から大腸癌へのヒト大腸多段階発癌過程進行のメカニズムとしてp48遺伝子発現の減少及びそれに伴うISRE依存性転写活性の減少が重要であるという新知見を示したものであり、遺伝子レベルにおける情報科学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(情報科学)の学位論文として合格と認める。