

研究テーマ

膠芽腫の予後を規定する19q染色体上の遺伝子の同定

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

PTEN はがん抑制遺伝子の代表格とされ、多くの悪性腫瘍においてその DNA 変異が見られるものの、PTEN の異常は DNA レベルの異常よりも蛋白質レベルでの発現低下～消失であることが圧倒的多数ことから、PTEN 蛋白質の発現制御機構の解明が必須である。これまでに我々は PTEN 発現制御機構を明らかにするために、PTEN と結合する分子 PICT1 を酵母ツーハイブリッド法によって単離したが、PICT1 は PTEN と結合して PTEN 蛋白質を安定化すること(1,2)、PICT1 は神経膠腫 glioma (特に乏突起膠細胞系神経膠腫 oligodendrogliomas) で高頻度に遺伝子欠損する 19q 領域に存在すること(3)、PICT1 の発現は神経膠腫・神経芽腫 neuroblastoma などの脳腫瘍や卵巣腫瘍で低下していること (4,5,6) 等が近年報告されていた。このようなことから PICT1 は PTEN を標的とする新規癌抑制遺伝子候補であると現在考えられている。そこで我々は、生体内での PICT1 の役割を明らかにするため、PICT1 欠損マウスや PICT1 欠損 ES 細胞を作製し、解析した。さらに、ヒト神経膠腫や大腸がんなどのヒト検体における PICT1 の発現量と腫瘍の進展性や予後を比較し、発がんにおける PICT1 の役割を検討した。

2. 方法

PICT1欠損マウスは、相同組換えによりPICT1 Exon1-2領域をtargetingベクターに置き換えたES細胞を調製し、microinjection法によりマウス胚へ導入し、欠損マウスを得た。Dox添加依存性PICT1欠損ES細胞は、PICT1の両アレルをtargetingベクターで置き換え内在性のPICT1を欠損させ、Dox誘導性PICT1発現ベクターを外来性に導入することで、PICT1の発現をDox依存性に欠損できるES細胞を得た。

3. 結果 研究成果

1)PICT1欠損マウスの解析

PICT1の生理的な役割を明らかにするために、PICT1欠損マウスを作製した。PICT1欠損マウスは胎生早期に致死となること、また胚盤胞の形態をもとれないことから、発生に必須の分子であることを明らかとした(図1)。

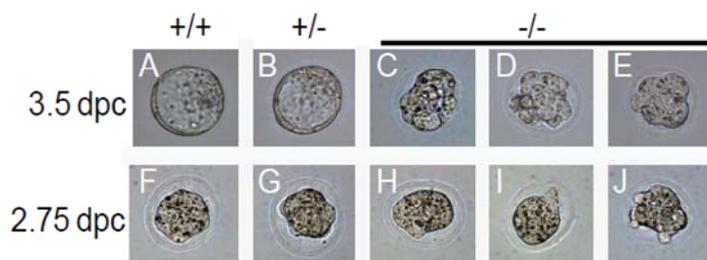


図1. PICT1欠損胚の形態異常

さらにPTEN欠損マウスより早期に致死となることから、PTEN以外の標的があることが考えられた。

2)PICT1欠損による増殖抑制とp53依存性の検討

Dox添加依存性にPICT1を欠損できるES細胞を樹立した。

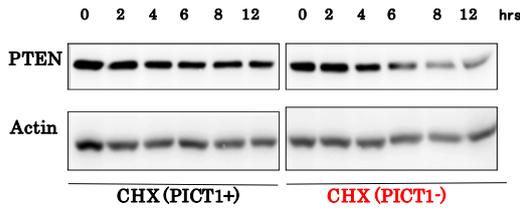


図2. PICT1 欠損による PTEN 蛋白質安定化

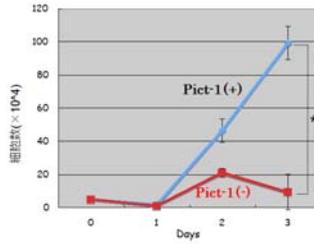


図3. PICT1 欠損による細胞増殖抑制

PICT1 欠損 ES 細胞では PTEN 蛋白質の発現減弱を認めるものの (図2)、細胞増殖は亢進せず、ES 細胞は細胞周期停止・アポトーシス亢進を呈して、5 日以上生育させることは不可能であった (図3)。

生化学的には p53 や p21 蛋白質の著しい発現亢進を認め (図4)、p53 経路が活性化されていることを明らかとした。また PICT1 欠損による細胞周期の停止や細胞死の亢進は、p53 の発現を siRNA で

抑制するとほ

ぼ完全に回復したことから (図5)、これら PICT1 欠損による表現型

は p53 にほぼ完全に依存性であることを示した。

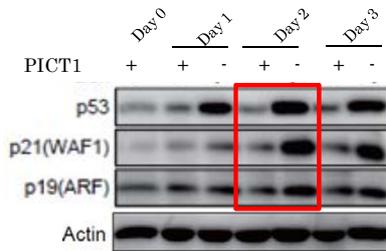


図4. PICT1 欠損による p53 経路の活性化

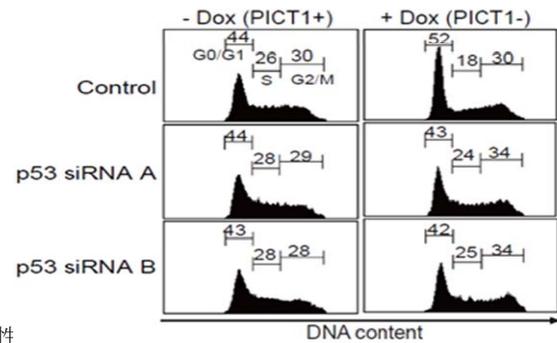


図5. PICT1 欠損による細胞周期停止の p53 の依存性

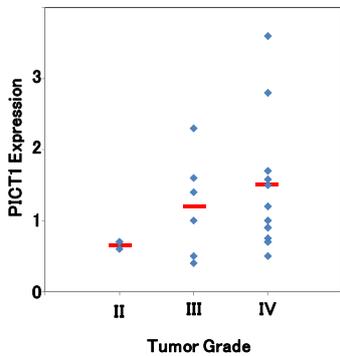


図6. 低グレードの神経膠腫では PICT1 蛋白質発現が低い

4) ヒトがん組織での PICT1 の発現解析

前述のように PICT1 はがん抑制遺伝子と考えられているが、ES 細胞において p53 を高発現し、細胞周期が停止するにも関わらず、本当はがん抑制遺伝子として作用するであろうか？そこでがんでの PICT1 の役割を検討するため、ヒト神経膠腫、大腸がんでの PICT1 発現と癌の進展性や予後との相関を検討した。その結果、未だ例数は少なく有意差は不明であるが、PICT1 の発現は、進展性の低い低グレードのグリオーマで発現が低いこと (図6)、大腸がんでは PICT1 低発現群で有意に生存期間が延長することを明らかとした (図7)。これらのことから、PICT1 の発現低下は腫瘍抑制に作用することが予想された。

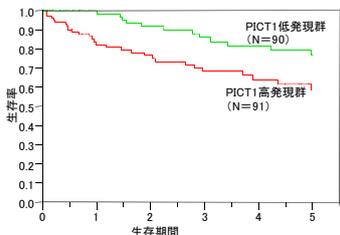


図7. PICT1 の発現が低い大腸がんは生存期間が延長

5) PICT1 の発がんでの役割解析

次に p53 に変異のないグリオーマや大腸がん細胞株を用い、shRNA

で PICT1 の発現を抑制し、p53 量や細胞増殖能を検討した。その結果、PICT1 を発現抑制すると、p53 量の増加を認め、細胞増殖能が有意に抑制された (図8)。次に PICT1 をヘテロ欠損するマウスを用いて DMBA/TPA による皮膚乳頭腫形成を検討したところ、PICT1 ヘテロ欠損マウスは野生型と比較し、腫瘍形成を抑制した (図9)。これら腫瘍細胞や

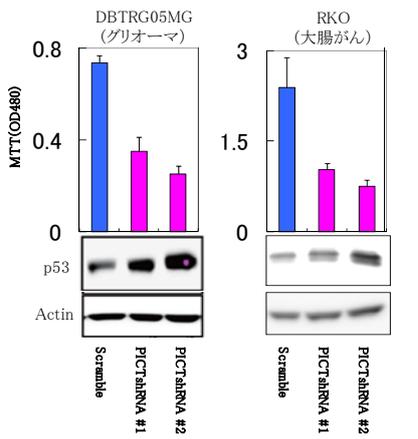


図8. PICT1 の発現が抑制は p53 の増加と癌細胞の増殖を抑制

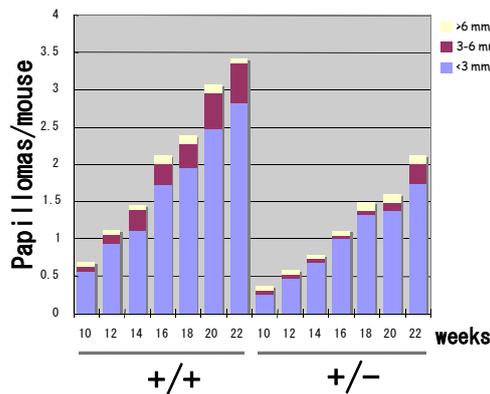


図9. ヘテロ変異マウスにみられる乳頭腫形成の抑制

欠損マウスにおいて、PICT1 の発現低下は p53 発現量を増加させ、細胞増殖を抑制することから、PICT1 が癌抑制遺伝子として働く可能性は低いと考えた。

4. 考察 まとめ

近年、神経膠腫で高頻度に遺伝子欠損する 19q 領域のうち、さらに高頻度に共通して欠損する 150kb の領域に PICT1 は存在すること(3)、PICT1 遺伝子の変異や欠失は、神経膠腫や悪性末梢神経鞘腫に認められること(1,2)、PICT1 の発現は、神経膠腫や神経芽腫などの脳腫瘍や、卵巣腫瘍で低下していること(5,6)等が報告されていた。これらに加えて PICT1 が PTEN の安定化に関わるとの報告から(1,2)、PICT1 は PTEN を標的とするがん抑制遺伝子であると考えられている。一方、星状膠細胞系神経膠腫 astrocytic gliomas では 19q の欠損と病期の進行とが相関するものの、乏突起膠細胞系神経膠腫 oligodendrogliomas では 19q 欠損は化学療法の反応性や予後の良好さと高く相関することから(7)、神経膠腫で欠損する 19q には腫瘍進展の加速や抑制に関わる複数の遺伝子が存在するであろうと示唆されている。とくに 19q 領域を欠損したヒト乏突起膠細胞系神経膠腫の予後は明らかに良好であることがわかっているが、PICT1 欠損 ES 細胞で細胞増殖が抑制されること、p53 に変異のないグリオーマや大腸がん細胞で PICT1 を抑制すると p53 量の増加と細胞増殖抑制を引き起こすこと、神経膠腫において PICT1 の発現は腫瘍の進展性と正に相関をすること、大腸がんにおいて PICT1 の発現減少は予後良好となることを考えると、PICT1 がこれら腫瘍の予後規定遺伝子である可能性がある。

5. 発表論文、参考文献

発表論文)

以上の結果は現在論文作成中である。

参考文献)

1. F. Okahara, H. Ikawa, Y. Kanaho, T. Maehama, *J Biol Chem* **279**, 45300 (Oct 29, 2004).
2. F. Okahara *et al.*, *Mol Biol Cell* **17**, 4888 (Nov, 2006).
3. J. S. Smith *et al.*, *Genomics* **64**, 44 (Feb 15, 2000).
4. Y. J. Kim *et al.*, *J Pathol* **216**, 218 (Oct, 2008).
5. Y. Nakagawa *et al.*, *Oncol Rep* **15**, 297 (Feb, 2006).
6. M. A. Merritt *et al.*, *BMC Cancer* **9**, 378 (2009).
7. J. S. Smith *et al.*, *J Clin Oncol* **18**, 636 (Feb, 2000).