

平成25年 3月

坂部友彦 学位論文審査要旨

主 査 村 脇 義 和
副主査 廣 岡 保 明
同 汐 田 剛 史

主論文

Identification of the genes chemosensitizing hepatocellular carcinoma cells to interferon- α /5-fluorouracil and their clinical significance

(肝癌細胞に対する interferon- α /5-fluorouracil の感受性増強遺伝子の同定とそれらの遺伝子の臨床的意義)

(著者：坂部友彦、土谷博之、神吉けい太、安積遵哉、権田一絵、水田悠介、山田大作、和田浩志、庄盛浩平、永野浩昭、汐田剛史)

平成25年 PLoS ONE 8巻 e56197

学位論文要旨

Identification of the genes chemosensitizing hepatocellular carcinoma cells to interferon- α /5-fluorouracil and their clinical significance

(肝癌細胞に対する interferon- α /5-fluorouracil の感受性増強遺伝子の同定とそれらの遺伝子の臨床的意義)

進行肝細胞癌に対して、interferon- α (IFN- α)/5-fluorouracil (5-FU)併用療法の有効性が報告されているが、その奏効率は未だ満足できるものではない。そこで、本研究では、より治療効果の高い肝細胞癌治療法開発のために、IFN- α /5-FU感受性増強遺伝子を同定し、それらの作用機序と臨床的意義を検討した。protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit (PRKAG2)、transforming growth factor-beta receptor II (TGFB2)、exostosin 1 (EXT1)の3遺伝子を同定した。また、TGFB2、EXT1の過剰発現がTGF- β シグナル活性化や小胞体ストレス誘導を介して、IFN- α /5-FU併用時のアポトーシスを促進することを示した。更に、IFN- α /5-FU併用療法を受けた肝細胞癌患者の癌部におけるPRKAG2 mRNA発現は、生存期間と有意な正の相関を示すことを見出した。これらの結果から、同定した3遺伝子が、IFN- α /5-FU併用療法の効果増強作用を有し、PRKAG2は効果予測因子としての有用性が示唆された。

方法

スクリーニングは、ランダムリボザイムライブラリーを用い、遺伝子発現抑制によるヒト肝癌細胞株HepG2における5-FU抵抗性の変化を指標に行った。約600万個よりなるリボザイムライブラリーを導入後薬剤処理を行い、生存細胞のリボザイムを回収し、細胞へ導入する操作を10回繰り返し、最終的に得られたリボザイムの標的認識配列から候補遺伝子を抽出した。肝癌細胞の生存率はWSTアッセイにより定量し、遺伝子発現はリアルタイムRT-PCR法、タンパク発現はWestern blotting法、免疫組織化学染色、免疫蛍光化学染色により評価した。カスパーゼ-3/7活性及びTGF- β シグナル活性は、レポーターアッセイにより検討した。In vivoの効果は、NOD/SCIDマウス皮下移植モデルを用い、アデノウイルスによる遺伝子導入により検討した。

結 果

スクリーニング後のリボザイムの標的認識配列より、PRKAG2、TGFBR2、EXT1を抽出し、これらの過剰発現が5-FU使用時の細胞生存率を有意に低下させ、さらにTGFBR2、EXT1についてはIFN- α /5-FU併用時の細胞生存率を有意に低下させた。また、これらの2遺伝子の過剰発現により、5-FUあるいはIFN- α /5-FU併用時のアポトーシスを促進した。また、TGFBR2過剰発現により、HepG2、HuH7におけるTGF- β 転写活性、アポトーシス促進タンパクBAX発現の亢進を認め、HepG2においてはアポトーシス抑制タンパクBCL-2とBCL-xLの発現抑制を認めた。一方、EXT1過剰発現により、HepG2における小胞体ストレスの指標であるCHOPやactivating transcription factor 4 (ATF4)、BiP/GRP78発現の亢進、オートファジーの指標であるLC3BのI型からII型への変換を認めた。また、LC3Bの変換亢進はHuH7においても認めた。以上より、これら2遺伝子はそれぞれ、TGF- β シグナル活性化、小胞体ストレス及びオートファジーを介してアポトーシスを増強していることが示唆された。加えて、IFN- α /5-FU併用治療を受けた肝細胞癌患者における各遺伝子発現を検討した結果、PRKAG2発現量は患者生存期間と有意の正の相関を示し、TGFBR2発現量は負の相関を示した。

考 察

本研究では、IFN- α /5-FU感受性増強遺伝子として、PRKAG2、TGFBR2、EXT1の3遺伝子を同定し、PRKAG2はIFN- α /5-FU併用療法の効果予測因子となりうることが示された。本研究で同定したPRKAG2は、細胞内エネルギーセンサーとして機能するAMP-activated protein kinase (AMPK)の構成ユニットであり、AMPKのリン酸化は肝細胞癌や肺癌患者の予後と相関することが報告されており、今回の結果を支持するものと考えられた。一方、TGFBR2発現が生存期間と負の相関を示したが、これはTGFBR2が腫瘍の形成や進展を促進するという報告と関連すると考えられた。また、糖転移酵素EXT1については、癌細胞においてサイレンシングによる発現低下が報告されていることから、癌抑制的に働いていることが推察されているが、本研究結果から、小胞体ストレスやオートファジーの誘導が、EXT1による癌抑制メカニズムの一つである可能性が示唆された。

結 論

肝癌細胞に対するIFN- α /5-FUの感受性増強遺伝子として、PRKAG2、TGFBR2、EXT1の3遺伝子を同定した。また、これらの遺伝子のうちPRKAG2発現量は肝細胞癌に対するIFN- α /5-FU併用療法の治療効果予測因子となりうることが示唆された。