

主論文の要旨

RASSF3 downregulation increases malignant phenotypes of non-small cell lung cancer

〔 RASSF3の発現低下により非小細胞肺癌の悪性度が増加する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 呼吸器内科学分野

(指導：長谷川 好規 教授)

深津 明日樹

【目的】

非小細胞肺癌はヒトにおける代表的な悪性腫瘍のひとつであり、依然として予後が不良な疾患である。分子生物学の発展とともに様々なバイオマーカーが予後や腫瘍細胞の生物学的特徴と相関することが知られるようになり、その一部が治療標的として注目されるようになった。本研究は、非小細胞肺癌における新たな予後診断マーカーや治療標的を開発することを目指し、ヒトの臨床検体を用いた遺伝子発現解析を行った。

【背景・方法】

RASSF1A は肺癌をはじめとする複数の固形癌で腫瘍抑制遺伝子として働くことが報告されている遺伝子である。プロモーター領域にある CpG アイランドの高メチル化を通じて発現が抑制されると生命予後が不良となることが報告されている。RASSF family には RASSF1A をはじめとして 10 個のホモログが同定されており、RASSF3 はその中でも最も小さな構造を持つメンバーである。RASSF3 についてはこれまでに乳癌を発症するマウスモデルを用いた研究で、乳癌の発症が遅い個体で発現が上昇していたことが報告されている。また、最近の報告ではヒト非小細胞肺癌の細胞株で RASSF3 が MDM2 と結合しユビキチン化を促して分解を促進し、その結果 p53 の安定化を通じてアポトーシスを誘導することが示された。これらの様に RASSF3 についても他のメンバーと同様に腫瘍抑制的に働いている可能性が示唆されているが、ヒトの臨床検体を用いた解析で生存予後を含めた臨床背景との相関について調べた研究はこれまで存在しなかった。

本研究では、2004 年 3 月から 2006 年 6 月までの間に名古屋大学附属病院で肺切除術を施行された非小細胞肺癌症例から、腫瘍組織および正常肺組織を採取し、それぞれから RNA 抽出を行って定量 PCR 法を用いて RASSF3 遺伝子の発現解析を行った。その結果と予後をはじめとする臨床背景との相関関係について統計的解析を行った。

さらに、その結果を *in vitro* で検証するため非小細胞肺癌細胞株を用い RASSF3 遺伝子の機能解析を行った。

【結果】

非小細胞肺癌症例における RASSF3 の発現量は、正常組織と比較して腫瘍組織の大部分（95 例中 87 例）で低下していた。正常組織と腫瘍組織それぞれの発現量の平均値を比較すると、腫瘍組織の方が有意に低かった。

RASSF3 の発現量の中央値で 2 群に分け、臨床的背景との相関関係について統計的解析を行ったところ、腫瘍の進行と関連する項目（病期、サイズ、リンパ節転移、胸膜浸潤）で発現量の低い症例群と有意な相関を認めた。また、RASSF の発現量が低い症例群では EGFR 変異が有意に少なく、EGFR 変異症例に多いとされる組織型（腺癌）、性別（女性）、非喫煙者もそれぞれ RASSF3 の発現量が低い症例群では少数だった。

次にこれらの項目のうち最も強い相関を示す項目を評価するため、ロジスティック回帰解析を用いて多変量解析を行った。その結果、組織型、リンパ節転移、胸膜浸潤、EGFR 変異の項目がそれぞれ独立して RASSF の発現量が低い症例群と相関していた。

RASSF3 の発現低下症例がリンパ節転移や胸膜浸潤などの腫瘍の進行に関わる項目と有意な相関を示したため、生存予後とも相関を示すか確かめるため Kaplan-Meiyer 法を用いて解析を行った。しかし、RASSF3 の発現量は腫瘍関連生存期間、無再発生存期間のいずれとも有意な相関は認めなかった。

続いて RASSF3 の発現が低い症例において RASSF1A のようにプロモーター領域の CpG アイランドの高メチル化が関与しているか確かめるため、最も発現量の低い 8 症例の腫瘍検体からゲノム DNA を抽出し、バイサルファイト処理後にパイロシークエンス法で解析を行った。その結果、いずれの症例でも CpG アイランドの高メチル化は認められなかった。14 個の肺癌細胞株でも同様の解析を行ったが、やはり CpG アイランドの高メチル化は確認できなかった。

臨床検体を用いた発現解析で腫瘍における RASSF3 の発現低下が腫瘍の転移や浸潤と強く相関するという結果を得たことから、このことを *in vitro* で確かめるため非小細胞肺癌の細胞株で si-RNA を用いて RASSF3 を抑制して遊走能への影響がみられるかを調べた。はじめに細胞の接着面に対する水平方向の遊走能を評価するため wound healing assay を行った。すると si-RNA で RASSF3 を抑制された細胞では遊走能が向上することが非小細胞肺癌細胞株 3 種と不死化中皮細胞株で確認された。次に細胞の接着面に対し垂直方向の遊走能を評価するため Boyden chamber を用いた transwell migration assay を行った。その結果、垂直方向についても同様に 2 種の非小細胞肺癌細胞株と不死化中皮細胞株で si-RNA で RASSF3 を抑制すると遊走能が有意に向上した。また有意差は見られなかったが、他 2 種の非小細胞肺癌細胞株でも同様の傾向であった。

【結論】

本研究により、非小細胞肺癌症例において RASSF3 が高頻度に発現が低下しており、このことがリンパ節転移や胸膜浸潤といった腫瘍の悪性度の増加と強く相関していることが明らかになった。また、細胞株による機能解析でも RASSF3 の発現を抑制すると遊走能が向上することが示され、臨床検体の解析結果と矛盾しない結果であった。これらの結果を総合し、RASSF3 が非小細胞肺癌において腫瘍抑制遺伝子として働くことを明らかにした。