

主論文の要旨

**Identification of proteasomal catalytic subunit
PSMA6 as a therapeutic target for lung cancer**

〔肺がん治療標的としてのプロテアソームサブユニット *PSMA6* の同定〕

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)

各務 智彦

【緒言】

非小細胞肺癌は予後不良の疾患であり、より有効な治療法の開発が望まれる。近年、種々のがんに対する新たな治療標的の発見を目的として、プール型 shRNA を用いた網羅的スクリーニング法が利用されている。例えば、変異型 *KRAS* がん遺伝子を持つがん細胞において特異的に治療標的となる遺伝子が同定された。また、分子標的治療薬に対する耐性化に関与する遺伝子も同定されている。これらの背景より、今回我々は新規の肺癌治療標的の発見を目的として、プール型 shRNA ライブラリーを使用した肺癌細胞の増殖と生存に必須な遺伝子の機能的スクリーニングを実施した。

【方法】

プール型 shRNA ライブラリースクリーニング：5,043 個の遺伝子を標的とする 27,500 個の shRNA から構成されるライブラリーを肺癌細胞株 NCI-H460 にレンチウイルスベクターを用いてトランスフェクションした。続いて、がん細胞数の増減の定量化をベクターに組み込まれた固有のバーコード塩基配列の次世代シーケンサーによる塩基配列決定によって行った。得られた 51 個の候補遺伝子について、オンラインツール NIH-DAVID を用いてパスウェイ解析を行った。

発現および遺伝子コピー数解析：肺癌細胞株 163 株と正常気道上皮細胞株 59 株において、候補遺伝子の発現を、マイクロアレイ解析で評価した。肺癌細胞株 19 株と正常気道上皮細胞株 3 株において、候補遺伝子の発現を、ウエスタンブロットで評価した。肺癌細胞株 108 株において、候補遺伝子のコピー数を、アレイ comparative genomic hybridization (CGH) を用いて評価した。名古屋大学医学部附属病院で切除された 20 症例の肺癌切除標本の腫瘍組織および正常肺組織において、*PSMA6* のタンパク発現を免疫染色で評価した。

***PSMA6* の機能解析**：肺癌細胞株 3 株 (NCI-H460、NCI-H1299、NCI-H661) と不死化正常気道上皮細胞株 HBEC3 に、*PSMA6* を標的とする short interference RNA (siRNA) を導入した。続いて、切断型 PARP タンパクのウエスタンブロットおよび Propidium Iodid 染色細胞のフローサイトメトリー解析によってアポトーシスと細胞周期解析を行った。また、プロテアソーム活性を市販のキットを使用して定量した。*PSMA6* の悪性形質転換能の評価を目的とし、HBEC3 に *PSMA6* 発現レンチウイルスベクターを導入し、*PSMA6* 安定過剰発現株を樹立した。同細胞における増殖能とプロテアソーム活性を測定した。

【結果】

プール型 shRNA ライブラリースクリーニングを行った (Figure1A)。shRNA の導入によって、コントロール遺伝子に対して有意に増殖が抑制された 51 個の遺伝子 (減少率 25% 以下かつ *P* 値 0.05 未満) を候補遺伝子とした (Figure1B)。候補遺伝子に対して NIH-DAVID を用いてパスウェイ解析を行ったところ、リボソーム経路、プロテアソーム経路、RNA ポリメラーゼ経路、ピリミジン代謝経路、スプライソソーム経路に

関わる遺伝子が有意に多く含まれていた。近年悪性腫瘍との関連が報告されている、プロテアソーム関連の6個の候補遺伝子に注目した。

マイクロアレイ解析では、*PSMA3* と *PSMA6* が、正常気道上皮細胞株と比較して肺がん細胞株で有意に高い発現を示した (Figure2A)。また、非小細胞肺がん 111 株中、8 株(7.3%、カットオフ：正常と比較し 5 倍以上の増加)で *PSMA6* の遺伝子増幅が認められたが、他の 5 つの遺伝子では増幅は認められなかった (Figure2B)。*PSMA6* の遺伝子コピー数は、mRNA 発現量と関連していた(相関係数 0.68、*P* 値 1.6E-13) (Figure2C)。以上の結果は、*PSMA6* が最も有望な肺がん治療標的候補遺伝子の一つであることを示唆した。そこで、同遺伝子に焦点を絞りさらに解析を進めた。

初代正常気道上皮細胞 1 検体、正常気道上皮細胞株 2 株と肺癌細胞株 19 株において、ウエスタンブロットで *PSMA6* の発現を評価した。肺がん細胞株で発現の増加を認めた (Figure3A)。切除標本を用いた免疫染色では、20 症例中 18 症例 (90%) において、正常組織と比較して腫瘍組織で *PSMA6* タンパクの発現増加を認めた (Figure3B、3C)。公共データベースを用いた解析では、*PSMA6* の mRNA の高発現は予後の短縮に関連している傾向が認められた (Figure3D)。

PSMA6 の機能解析を行うため、H460 に加え、2 つの肺癌細胞株、H1299、H661、と不死化正常気道上皮細胞株 HBEC3 を用いた。H661 は *PSMA6* の遺伝子増幅が 6.5 倍認められる細胞株であり、*PSMA6* の遺伝子増幅とノックダウンによる効果の関連性を評価するために使用した。*PSMA6* のノックダウンにより、肺癌細胞株 H460 と H1299 においては切断型 PARP の発現が増加しておりアポトーシスの誘導が示唆された。HBEC3 と H661 では変化を認めなかった (Figure4A)。細胞周期解析では *PSMA6* のノックダウンにより H460 ではアポトーシスが誘導され、H1299 では G2/M 停止が誘導されたが、HBEC3 と H661 では変化を認めなかった (Figure4B)。*PSMA6* のノックダウンにより、H460、H1299、HBEC3 ではプロテアソーム活性が 50%程度に抑制されたが、H661 では抑制されなかった (Figure4C)。

HBEC3 において、*PSMA6* の過剰発現が増殖能に与える影響を評価した。レンチウイルスを用いて *PSMA6* を導入し、過剰発現をウエスタンブロットで確認した (Figure5A)。HBEC3 において *PSMA6* の過剰発現は、プロテアソーム活性や増殖能に影響を与えなかった (Figure5B、5C、5D)。

【考察】

プロテアソームはユビキチンにより標識されたタンパク質の分解を行う酵素複合体である。がん細胞では正常細胞と比較してプロテアソーム活性が亢進しており、その抑制によりアポトーシスが導かれることが知られている。*PSMA6* は酵素複合体を形成するサブユニットタンパクの一つである。

2 つの先行研究は、プール型 shRNA スクリーニング法によって *PSMA6* が悪性胸膜中皮腫と膠芽腫において腫瘍細胞の生存に必須な遺伝子であると報告している。また、肝細胞がんにおける *PSMA6* の過剰発現も報告されている。これらは *PSMA6* がヒトが

んにおいて重要な役割を果たす事を示す。本研究では shRNA を用いた網羅的スクリーニング結果から PSMA6 に着目し、肺癌細胞株と臨床検体の両方で、発現が高いことを示した。また、7.3%に遺伝子増幅があることを初めて報告した。さらに肺癌細胞株を用いた機能解析において、PSMA6 のノックダウンが、肺癌細胞株においてアポトーシスと G2/M 停止を起こすが、一方で正常気道細胞株にはいずれもおこさないことを見出した。PSMA6 のノックダウンにより、H460、H1299、HBEC3 ではいずれも同程度にプロテアソーム活性が抑制されたことは、アポトーシスの誘導がプロテアソーム活性の抑制程度と必ずしも相関しないことを示した。最後に、PSMA6 の過剰発現は単独では増殖能に影響を与えないことを示した。

【結論】

PSMA6 は非小細胞肺癌において高い発現と遺伝子増幅を示し、その発現抑制により肺癌細胞株でアポトーシスまたは細胞周期停止が導かれた。これらの結果は PSMA6 が非小細胞肺癌の治療標的となる可能性を示唆する。