

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 「がん関連遺伝子産物の転写後発現調節を標的とした治療法の開発」
(K-ras 変異がんに対する GST- π を標的とした新規治療法戦略)
2. 研究開発代表者： 北海道公立大学法人札幌医科大学
分子標的探索講座 特任教授 新津 洋司郎
3. 研究開発の成果

変異 K-ras (mK-ras) がんは全ての腫瘍で最も頻度の多いドライバーがん遺伝子であるにも関わらず、mK-ras がんに対する有効な治療法は未だ見つかっていない。本研究では、mK-ras がんで発現が必発である X 因子に注目し、その因子がその機能解析から、mK-ras がんの治療標的として有望であることを明らかにし、また、mK-ras がんの化学予防においても X 因子を標的とする事の正当性を示した。

まず、mK-ras がん細胞 10 種、非 mK-ras がん 6 種について X 因子の発現をウェスタンブロットで調べたところ、前者では全てが、後者では 2 種が陽性であった (研究代表者)。また、ヒト大腸がん組織での X 因子を免疫染色し、染色強度をコンピューターソフトで定量化した後、mK-ras の陽性度との相関をとったところ、強い正の相関 ($P < 0.01$) を認めた (研究分担者)。mK-ras と、X 因子発現の因果関係を明らかにするべく K-ras シグナルの下流にある転写因子 (fos) をノックダウンしたところ、X 因子の発現は有意に低下した。また非 K-ras がん細胞 (X 因子陰性) に vK-ras 遺伝子を導入したところ、X 因子の明らかな発現誘導が見られた (研究代表者)。

次に X 因子が mK-ras がんの増殖に関与しているかどうかを調べたところ、siRNAX を用いていづれかのがん細胞においても有意な増殖抑制がみられ、それらの細胞では全て K-ras の下流にある c-RAF 蛋白の減少が認められた。X 因子が c-RAF に結合し、それを安定化している可能性が想定され、c-RAF の関連蛋白である b-RAF は減少していなかったため、X 因子との結合は c-RAF 特異的である事が示唆された。Flag タグ付 c-RAF および b-RAF を Flag 抗体による免疫沈降法やピアコア法で、リコンビナント c-RAF、および b-RAF への X 因子の結合を調べたところ、前者のみとの結合が確認された。

c-RAF に X 因子が結合して安定化する機序は、X 因子をノックダウンするとユビキチン化が上昇し、プロテゾーム阻害剤で処理すると X 因子がなくても c-RAF が低下しない事実から明らかにされた。

さらに mK-ras がんにおける c-RAF の homodimer 形成について、X 因子によってその形成が促進されている可能性についても検討した。つまり Flag タグ c-RAF と、V タグ c-RAF をダブルで導入した mK-ras がんで、Flag 抗体で免疫沈降した沈殿物を、V の抗体でウェスタンブロットした際、X 因子をノックダウンする事で、V のバンドが明らかに減少していた。逆に、非 mK-ras がんに Flag c-RAF と V c-aRAF を導入しさらに X 因子を導入したところ、dimer が明らかに増加した。また、in vitro で、c-RAF + ATP + MEK の系に X 因子を加えたところ、MEK のリン酸化が促進された。つまり X 因子は c-RAF の安定化のみならず、活性化を惹起する事が明らかとなった。

次に Dox で shRNA X が誘導される mK-ras がん細胞をスキッドマウスに移植し、X 因子の in vivo 腫瘍増殖性に及ぼす影響を調べたところ、X 因子の抑制は腫瘍増殖を明らかに抑制した。さらに X 因子ノックアウトマウスを作成し、AOM 投与マウス (大腸癌発生モデル) での、大腸癌発生頻度を調べたところ、有意差をもって低下していた。なお AOM マウスの大腸癌は mK-ras 陽性、X 因子陽性である。