

A comprehensive screening of the Fra-1 regulatory genes

in esophageal squamous cell carcinoma

(食道扁平上皮癌における Fra-1 制御遺伝子の検索)

千葉大学大学院医学薬学府

先端生命科学専攻

(主任：松原 久裕 教授)

豊住 武司

【目的】

食道癌は予後が不良とされ、その罹患率と死亡率が近接し、今日においても難治性の消化器癌の一つとされる。新たなモダリティーによる診断技術の向上や、手術手技、周術期管理、放射線治療、化学療法の発達などにより予後は改善傾向にあるものの、未だに治療後の再発率も高く、また再発後の治療手段が得られないことも多い。転写因子 AP-1 (activator protein 1) グループの一つである Fra-1 (Fos-related antigen 1) は、ヒト正常線維芽細胞に過剰発現させると足場非依存的増殖能を獲得すると報告され、Fra-1 発現により浸潤転移能を獲得する可能性が示唆される。我々はこれまでに食道扁平上皮癌細胞株の Fra-1 発現を抑制することで増殖能、浸潤能が低下し、120 例の食道癌臨床検体を用いた検討において Fra-1 の高発現がリンパ節転移に関連し、さらには独立した予後不良因子であることを報告した (Usui, et al. Cancer. 2011;118)。今回、Fra-1 に関連して発現調節される制御遺伝子をマイクロアレイおよび遺伝情報学に基づく Biobase Upstream Analysis によって解析し、複数の Fra-1 制御遺伝子候補を選択した。また、それら制御遺伝子発現の臨床病理学的意義を検討した。

【方法】

1) 食道扁平上皮癌細胞株 9 株における Fra-1 発現をリアルタイム PCR 法およびウェスタンブロット法で確認した。2) 食道扁平上皮癌細胞株 (TE10、TE11) についてエレクトロポレーション法を用いた siRNA 導入により Fra-1 発現を抑制し、Fra-1 ノックダウンモデルを得た。ノックダウン効率はリアルタイム PCR 法およびウェスタ

ンブロット法で確認した。3) Fra-1 発現を抑制した細胞株で発現変化する下流遺伝子を Human gene 1.0 ST Array を用いたマイクロアレイで網羅的に検索し、Biobase Upstream Analysis を用いて解析した。解析結果から Fra-1 制御遺伝子の候補を決定した。4) Fra-1 抗体を用いた ChIP-PCR を行い、Fra-1 制御遺伝子のプロモーター領域に対する Fra-1 の結合を確認した。また、Fra-1 ノックダウンモデルにおける Fra-1 制御遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR 法およびウェスタンブロット法で確認した。5) 食道扁平上皮癌細胞株 (TE10、TE11)についてエレクトロポレーション法を用いた siRNA 導入により Fra-1 制御遺伝子の発現を抑制し、細胞株の増殖能、遊走能および浸潤能の変化を確認した。6) 臨床検体における Fra-1 制御遺伝子発現をリアルタイム PCR 法、免疫染色法で確認し臨床病理学的検討を行った。

【結果】

1) いずれの細胞株においても Fra-1 の高発現が確認されたが、TE10、TE11において優位に高い Fra-1 発現を確認した。2) TE10、TE11 について siRNA 導入により Fra-1 発現を抑制し、Fra-1 ノックダウンモデルを得た。ノックダウン効率は良好であった。3) Fra-1 発現抑制による下流遺伝子発現変化のマイクロアレイおよび Biobase Upstream Analysis により、HMGA1 (high mobility group protein at hook 1)を含む複数の Fra-1 制御遺伝子候補を同定した。4) Fra-1 抗体を用いた ChIP-PCR により、HMGA1 のプロモーター領域に Fra-1 が直接結合することを確認した。また siRNA を用いた Fra-1 発現抑制による HMGA1 発現抑制を確認した。5) TE10、TE11 について siRNA 導入により HMGA1 発現を抑制し、HMGA1 発現抑制により細胞株

の増殖能、遊走能および浸潤能が抑制されることを確認した。6) 臨床検体における HMGA1 発現を臨床病理学的に検討し、食道扁平上皮癌腫瘍細胞において HMGA1 発現と Fra-1 発現が正の相関関係にあることを確認した。また HMGA1 の高発現が食道扁平上皮癌患者の予後と関連し、さらには独立した予後不良因子であることを示した。

【結語】

Fra-1 の制御遺伝子として HMGA1 を同定した。その発現は食道扁平上皮癌の独立した予後不良因子であり、新たな治療法、診断法のツールと成り得ると考えられた。

Cancer Research

平成 26 年 12 月 投稿中