

論 文 内 容 の 要 旨

氏 名	かね だ ひろ やす 金 田 裕 靖
学位の種類	博 士 (医学)
学位記番号	医 第 1 0 3 8 号
学位授与の日付	平 成 2 2 年 6 月 1 5 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	FOXQ1 is overexpressed in colorectal cancer and enhances tumorigenicity and tumor growth (大腸がん高発現遺伝子 FOXQ1 の機能解析)
論文審査委員 (主 査)	教 授 中 川 和 彦
(副主査)	教 授 奥 野 清 隆
(副主査)	教 授 義 江 修

【目的】

大腸癌の臨床検体を用いた DNA マイクロアレイ遺伝子発現解析により癌部組織で特異的に高発現していた癌関連遺伝子 FOXQ1 (Forkhead box Q1) を同定した。FOXQ1 は FOX gene ファミリーに属する転写因子であり、マウスでは遺伝子変異や欠失により胃粘液の分泌異常、毛根の形態形成異常や胚の胎生期死亡に関与することが報告されている。しかし、ヒトや癌細胞における FOXQ1 の機能は明らかになっていない。本研究では新規癌関連遺伝子 FOXQ1 の生物学的機能を明らかにするための機能解析を行った。

【方法】

癌細胞における FOXQ1 の転写因子としての機能と標的遺伝子を調べるために FOXQ1 の siRNA や遺伝子導入を用い real-time PCR 法や Westernblot 法、レポーターアッセイやクロマチン免疫沈降法で検討した。また、FOXQ1 過剰発現の意義を検討するためにレトロウイルスを用いて FOXQ1 強制発現細胞を作成し *in vitro* やヌードマウスを用いて *in vivo* でその影響を検討した。

【結果】

FOXQ1 の発現は大腸の正常組織ではわずかしが発現しておらず、癌組織において約 70 倍高発現していることを PCR 法で確認した。siRNA により FOXQ1 を発現低下させた大腸癌株においては細胞周期制御因子 p21 の遺伝子発現低下がみられた。この現象は mRNA の発現及びタンパク発現の検討において複数の細胞株でも再現性が認められた。この同現象は p53 非依存性的かつ直接的に p21 の転写を誘導していた。FOXQ1 を強制発現させた細胞では p21 の発現亢進と抗癌剤によるアポトーシスの抑制が観察された。また FOXQ1 強制発現細胞では細胞増殖が抑制され Cdk4、CyclinD や pRb の発現も低下していたが、*in vivo* においては腫瘍形成能と腫瘍増殖が亢進していた。FOXQ1 強制発現細胞では VEGF A の発現が亢進し、腫瘍細胞における CD31 と TUNEL による免疫染色では血管新生の増加とアポトーシスの抑制が認められた。以上の結果から、FOXQ1 は、がん細胞において p53 非依存的に p21 の発現を直接誘導する機能、アポトーシスを抑制する機能、VEGF A の発現を誘導し腫瘍血管新生を増加させる機能を有していることが示された。

【考察】

FOXQ1 の生物学的機能として 3 つの機能を見出した。いくつかの FOX 転写因子は loss of function、遺伝子の変異や過剰発現が癌の etiology に関与しており癌遺伝子または癌抑制遺伝子として機能している。本研究では FOXQ1 の過剰発現が腫瘍形成能および増殖を促進させることを示し、FOXQ1 は新たな癌遺伝子の一つであると考えられた。

【結論】

大腸がん高発現遺伝子 FOXQ1 は腫瘍形成能と腫瘍増殖を亢進させる生物学的機能を有している。

論文審査結果の要旨

がんは他疾患に比べて治療薬の奏効率がかなり低い。近年分子標的薬をはじめとする有効な治療法の出現とともに治療の効果や安全性をさらに向上させるために効果予測因子、予後因子の同定、重篤な副作用の発現予測などのバイオマーカー研究の必要性が広く理解されてきている。その中でマイクロアレイなどの分子生物学的技術は新しいツールとして癌研究に重要な役割を果たしてきている。本研究は大腸がん研究においてマイクロアレイを用いた研究戦略として治療標的分子の特定を行うためにがんセンター中央病院との共同研究で行われた。我々は大腸がん症例を250例集積しその臨床検体(癌部と非癌部のペアサンプル)を用いてDNAマイクロアレイ遺伝子発現解析を行い癌部で高発現していた遺伝子として forkhead box Q1 (FOXQ1)を同定した。

Forkhead box (Fox) gene は非常に良く保存された転写因子であり発生から細胞の増殖、分化や成長など生物学的成長過程において幅広く機能している。そのため、Fox 遺伝子の機能の消失や上昇が正常細胞の機能異常を起こし腫瘍形成や腫瘍増殖を引き起こしている。ヒトでは17種類のサブタイプがありその中のいくつかの Fox gene ではがんにおけるゲノム異常が分かっている。Fox 遺伝子の主なゲノム異常には loss of function, gene amplification, overexpression があり、標的遺伝子にはがんの増殖、アポトーシスや血管新生に関わる因子がある。近年、Fox 遺伝子のがん治療における治療効果の予測・モニタリングのためのバイオマーカーとしての機能や治療の標的分子としての役割が臨床ですでに評価されている。

ヒトの FOXQ1 遺伝子は2001年にクローニングされ異種間において相同性が高い遺伝子である。マウスでは FOXQ1 の遺伝子変異や欠失により胃粘液の分泌異常、毛根の形態形成異常や胚の胎生期死亡に関与している。しかし、ヒトの細胞やがん細胞における FOXQ1 の機能やゲノム異常の報告はなく明らかになっていない。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2010年3月1日 公 表	<i>Cancer Research</i> Vol. 70 No. 5 p. 2053~2063 2010年3月1日 発 行
	公 表 内 容	
	全 文	

本研究は、大腸がん高発現遺伝子 *FOXQ1* が癌部で約 28 倍と特異的に高発現している点に注目し生物学的機能を明らかにするため機能解析を行った。

方法

FOXQ1 の遺伝子発現レベルの測定

大腸がん臨床検体、正常組織、がん細胞株における *FOXQ1* mRNA の発現を各サンプルの cDNA を用いて Real-time reverse transcriptional-PCR (RT-PCR) で測定した。

FOXQ1 の標的遺伝子の探索と同定

FOXQ1 の標的遺伝子を探索するために *FOXQ1* を標的とした small interfering RNA (siRNA) を用いて大腸がん細胞株 DLD-1 の *FOXQ1* mRNA の発現をノックダウンした。同サンプルを用いて遺伝子発現解析を行い大腸がん細胞株における *FOXQ1* の標的遺伝子の探索を行った。発現解析で得られた結果を確認するために別の細胞株を用いて *FOXQ1* siRNA による特定した標的遺伝子の変化を Real-time RT-PCR と western blot 法で確認した。

FOXQ1 強制発現による細胞形態変化・機能について *in vitro* および *in vivo* での検討

がん細胞における *FOXQ1* 過剰発現の意義を検討するために *FOXQ1* 遺伝子を p53 欠失型肺がん細胞株 H1299 細胞にレトロウイルスを用いて遺伝子導入し *FOXQ1* 強制発現細胞を作成し、その細胞形態・機能について *in vitro* で細胞増殖とアポトーシスへの影響、*in vivo* で腫瘍形成能と腫瘍増殖能への影響を検討した。

結果

FOXQ1 の遺伝子発現

大腸がん臨床検体のがん部組織 50 サンプルと非がん部組織 10 サンプルにおける *FOXQ1* の発現を調べた。*FOXQ1* の発現は非がん部ではほとんど発現しておらず、がん部において特異的に発現しており発現解析の結果を裏付ける結果であった。正常組織における *FOXQ1* の発現は胃で最も発現が高く、その他気管、唾液腺、前立腺で高発現であったが、大腸での発現はわずかであった。がん細胞株における *FOXQ1* の発現は胃がん、大腸がん、肺がん細胞株で高発現であった。これらの結果より大腸がんでの *FOXQ1* の過剰発現は発現の低い正常時の段階からの発癌過程で起こると考えられ、*FOXQ1* は大腸の発癌過程や大腸がんでなんらかの機能をしていることが示唆された。

細胞周期制御因子 p21^{Waf1/Cip1} は *FOXQ1* の標的遺伝子である。

大腸がん細胞株 DLD-1 に *FOXQ1*-siRNA を transfection し siRNA の抑制効果を検討した。*FOXQ1*-siRNA の抑制効果が *FOXQ1* mRNA を 80% 以上低下させることを確認した。次に *FOXQ1*-siRNA で *FOXQ1* の発現が抑制された DLD-1 の遺伝子発現解析を行った。*FOXQ1*-siRNA により *FOXQ1* 自身の発現低下と細胞周期制御因子 p21^{Waf1/Cip1} (以下 p21) の発現低下が見られ大腸がん細胞株における *FOXQ1* の標的遺伝子として p21 を特定した。発現解析の結果を確認するため、3 種類の細胞株を用いて *FOXQ1*-siRNA による p21 の発現変化について検討した。大腸がん細胞株 DLD-1、WiDr とヒト胎児腎細胞 HEK293 において *FOXQ1* のノックダウンによる p21 の発現低下が mRNA およびタンパクレベルでも認められた。p21 は主に上流の p53 によって制御されているため *FOXQ1* による p21 の発現制御が p53 依存性かどうかを p53 status の違う 2 種類の肺がん細胞株 SBC3 (正常型)、H1299 (欠失型) を用いて western blot 法で検討した。p21 の発現を誘導するために doxorubicin を使用した。両細胞株において

siRNAによるFOXQ1のノックダウンはベースラインのp21の発現を抑制し、さらにdoxorubicinによって誘導されるp21の発現も抑制した。その抑制効果はp53正常型では小さいが、p53欠失型ではほぼ完全に抑制された。同じ細胞株H1299を用いた免疫染色でもsiRNAによるFOXQ1のノックダウンによりp21の発現が完全に抑制されていた。次にFOXQ1がp21を直接制御しているかどうかHEK293細胞を用いてluciferase assayとchromatin immunoprecipitation (ChIP) assayで検討した。2箇所のp53 binding siteを含む全長2.4kbpのp21 promoterをレポーターベクターに挿入した。そのレポーターベクターとFOXQ1発現ベクターまたはコントロールベクターをcotransfectionした。コントロールと比べFOXQ1発現ベクター存在下では約8倍、p21の転写活性の亢進が認められた。ChIP assayではFOXQ1がp21 promoterに結合していることが確認できた。以上より、FOXQ1はp21の発現をp53非依存的に直接誘導する新しい転写因子であることが証明された。

FOXQ1は血管新生作用とアポトーシス抑制作用によって腫瘍形成と腫瘍増殖を亢進させる

*In vitro*ではFOXQ1の強制発現により著明にp21の発現(mRNAおよびタンパク)が亢進し、MTT法にて細胞増殖の抑制が認められた。この細胞増殖抑制はp21の発現増加が下流の細胞周期を制御するタンパク(cdk2, cdk4, cyclinD)発現を抑制し、結果リン酸化Rbの発現が低下することによるものであった。アポトーシスの検討は抗がん剤によって誘導されるアポトーシスをフローサイトメトリーとwestern blot法で行った。抗がん剤(doxorubicin, camptothecin)暴露24時間後、フローサイトメトリーではFOXQ1強制発現細胞ではコントロールよりもアポトーシス細胞が減少していた。Western blot法では、抗がん剤の濃度依存的に増加するcleaved caspase-3とcleaved PARPの発現がFOXQ1強制発現細胞ではコントロー

ルと比べ抑制されていた。*In vivo*においては、FOXQ1強制発現細胞で明らかな腫瘍形成能と腫瘍増殖能の亢進が認められた。次に、このFOXQ1による腫瘍増殖に標的遺伝子であるp21が寄与しているかどうかを検討した。FOXQ1強制発現細胞にp21を標的としたshRNAをレトロウイルスを用いて遺伝子導入しp21の発現をノックダウンしたFOXQ1強制発現細胞を作成した。Western blot法にてFOXQ1強制発現細胞でp21がノックダウンされていることを確認し、*in vitro*と*in vivo*でそれぞれ細胞増殖と腫瘍増殖におけるp21の機能を評価した。p21のノックダウンにより細胞増殖および腫瘍増殖ともにコントロールと比べ亢進した結果となり、p21は*in vivo*におけるFOXQ1による腫瘍増殖に対し抑制的に作用していることが明らかとなった。FOXQ1による腫瘍増殖に関与する新たな分子を特定するためにFOXQ1強制発現細胞の遺伝子発現解析を行い52の遺伝子がFOXQ1によって発現亢進していた。その中にはFoxCやFoxMの標的遺伝子VEGFがあり、real time RT-PCRと免疫染色でもFOXQ1によるVEGFの誘導が認められた。実際に、腫瘍の血管新生をCD31抗体を用いた免疫染色で評価するとFOXQ1は血管新生を誘導していた。また、FOXQ1の発現によりアポトーシスの抑制とp21の誘導も確認できた。以上の結果より、FOXQ1強制発現細胞ではVEGF誘導を介した腫瘍の血管新生とアポトーシス抑制が認められ、これによりFOXQ1による腫瘍増殖の亢進が示唆された。

考察

本研究は大腸がんの臨床検体を用いた発現解析で同定したFOXQ1遺伝子の機能解析を行い、下記の知見を得ている。

- ・FOXQ1は大腸がんにおいて高発現していた。
- ・FOXQ1は正常の大腸では発現しておらず大腸がんにおいて特異的に

発現していた。

・FOXQ1 の標的遺伝子として細胞周期制御因子 p21^{Waf1/Cip1} と VEGF を同定した。

・FOXQ1 は p53 非依存的に p21 の発現を直接誘導した。

・FOXQ1 は腫瘍形成と腫瘍増殖を亢進させた。

・FOXQ1 は血管新生とアポトーシスの抑制を誘導した。

・FOXQ1 による腫瘍増殖には VEGF 誘導を介した血管新生作用とアポトーシス抑制作用の関与が示唆された。

本研究では FOXQ1 の過剰発現が腫瘍形成および腫瘍増殖を亢進させたことから FOXQ1 ががんの etiology に関与する FOX 遺伝子のひとつである可能性を示した。また FOXQ1 が大腸がんの前癌病変である大腸腺腫ですでに高発現しているとの報告もあり FOXQ1 ががんの進展のみではなく発癌の段階から関与していることが示唆されることより FOXQ1 は oncogenic な機能を有している可能性が十分に考えられる。FOXQ1 による腫瘍増殖に対して標的遺伝子である p21 の作用は抑制的であったものの、もうひとつの標的遺伝子である VEGF の誘導を介したメカニズムの関与を示唆し、FOXQ1 が現在大腸がん化学療法の key drug となっている抗 VEGF 阻害剤であるベバシズマブ治療の効果予測のバイオマーカーになり得る可能性を示した。

本研究はがん細胞における FOXQ1 の機能を見出した初めての研究であるとともに治療標的分子の特定を行うために始めた研究としての意義を十分に見出している。また、FOXQ1 やその標的遺伝子を標的とした新たな分子標的治療や新しい治療戦略の開発に結びつく可能性のある臨床的基礎研究であると考えられる。一方、FOXQ1 の過剰発現の原因、大腸腺腫での発現メカニズムやアポトーシスや VEGF 誘導の詳しいメカニズムの

解明の必要性がありさらなる研究も必要である。

本研究は新規性があるだけでなく臨床検体を応用したことにより大腸癌における FOXQ1 の分子生物学的重要性を示唆しこれからの腫瘍学に新しい知見を与えるものであり学位論文として価値のあるものと考えられる。