

肺がんにおける RASSF3 遺伝子の機能解析

愛知県がんセンター研究所

分子腫瘍学部 部長 関戸好孝

同 リサーチレジデント 深津明日樹

染色体 3p21.3 領域の高頻度欠失領域において同定された RASSF1A 遺伝子は、肺がんを始め多くの種類のヒト腫瘍においてプロモーター領域の高メチル化によって遺伝子の転写が抑制・不活性化されていることが明らかとなった代表的ながん抑制遺伝子である。RASSF1A の発見に引き続き、この遺伝子は RASSF (Ras-Associated Domain Family) 遺伝子ファミリーの一員であることが明らかにされ、現在までに 10 個の RASSF メンバーが同定されている。本研究計画において、染色体 12q14 に局在する、RASSF メンバーの一つである RASSF3 遺伝子に着目し、肺がんにおける RASSF3 遺伝子の役割について明らかにすることを目的として非小細胞がん症例および細胞株を用いて分子生物学的解析を行った。

愛知県がんセンター中央病院および名古屋大学医学部附属病院において治療目的において外科手術を受けた非小細胞肺がん患者症例の臨床検体の提供を受け、それぞれ 45 症例および 95 症例の肺がん切除標本から抽出した total RNA を解析した。最初に、同じ患者の正常肺由来の total RNA が利用可能であった名古屋大学症例 95 例を定量的 real time RT-PCR 法にて解析したところ、87 例において RASSF3 の発現低下が認められた。95 例を中央値で低発現群 (48 例) および高発現群 (47 例) に分け、臨床病理学的な因子との相関を検討した。RASSF3 低発現群はステージ II/III ($p=0.0011$)、腫瘍サイズ ($30\text{mm}<$) ($p=0.0123$)、リンパ節転移 ($pN1<$) ($p=0.0008$) および胸膜浸潤 ($p=0.0497$) と有意に相関していた。さらに、RASSF3 低発現は EGFR 変異群には有意に低頻度 ($p=0.0013$) であった。同様に RASSF3 低発現症例は女性 ($p=0.0118$)、腺がん ($p=0.0001$)、非～低喫煙者 ($p=0.0282$) に多く認められた。一方、KRAS 変異や TP53 変異との相関は認められなかった。

本解析データの再現性を確認するために、愛知県がんセンターの非小細胞肺がん症例 45 例で解析したところ 38 例において RASSF3 の発現低下が認められた。同様に中央値で低発現群 (22 例) および高発現群 (23 例) の 2 群に分けて臨床病理学的因子と検討した。本コホートでは腫瘍サイズにおいて有意差は検出されなかったが、RASSF3 低発現群は進行ステ

ージやリンパ節転移および EGFR 変異状態と有意に相関を示した。

RASSF3 の発現低下の原因を探るために RASSF3 の発現低下した臨床検体、肺癌細胞株を用いて RASSF3 遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化状態を検討した。しかし、プロモーター領域の CpG island の高メチル化は検出されず、DNA hypermethylation が RASSF3 の発現低下の主たる原因でないことが示唆された。

A549 肺癌細胞株に対して RASSF3 をノックダウンし、その細胞特性に与える影響について検討をおこなった。RASSF3 をノックダウンする siRNA を導入した A549 細胞株ではコントロール siRNA を導入した A549 細胞株に比べて EMT (epithelial to mesenchymal transition) 様の細胞形態にシフトし、さらに EMT マーカーであるファイブロネクチン、ビメンチンなどの発現が上昇する一方、上皮系のマーカーである E-カドヘリンの発現が低下した。これらの EMT 様変化は Transforming growth factor beta (TGF-beta) の添加によってさらに増強された。さらに wound healing アッセイにおいて、RASSF3 ノックダウン状態では運動能の促進が認められた。このように RASSF3 は肺癌細胞株において細胞の運動能・浸潤能を抑制する機能に関与しており、RASSF3 の発現低下により肺癌細胞の運動能・浸潤能を始めとする悪性形質が増強されることが示された。

以上の結果から、RASSF1A などの他の RASSF ファミリー遺伝子同様に、RASSF3 は非小細胞肺癌において高頻度に発現低下し、RASSF3 の発現低下は細胞の EMT、浸潤能といった細胞特性を促進し、臨床的な悪性度と相関していることが明らかとなった。RASSF3 が非小細胞肺癌において重要ながん抑制遺伝子であることが強く示唆され、RASSF3 遺伝子異常を基盤とした肺癌における新たな診断法あるいは治療法への展開が強く期待されるものと考えられた。