

84. 細胞寿命制御遺伝子を標的とした革新的肺癌治療の開発

矢野 篤次郎

国立病院機構 別府医療センター 臨床研究部・外科

Key words : 非小細胞肺癌, SIRT1, 抗癌剤耐性

緒言

原発性肺癌は世界の癌死亡原因の第一位であり、本邦においても癌死の最大原因疾患（男性 52,054 人、女性 20,680 人、計 72,734 人：2013 年）である。今後も肺癌死亡数は増加し、10 年以内に年間 10 万人を超えるとも推測される。なかでも約 80 % を占める非小細胞肺癌に対する治療成績の向上は急務と考えられる。手術療法の対象となる早期の患者は約 30 % で、さらに完全切除出来ても 5 年生存率は 50 % 程度と決して満足できるものではない¹⁾。また、肺癌患者の 3 人に 2 人は診断時にすでに進行癌として発見され、化学療法や放射線療法にて治療されるものの、その平均生存期間は約 12 ヶ月程度と不良であり、新しい治療法や予防法の開発が急務である。

Sir2 (silencing information regulator 2) は NAD 依存性ヒストン脱アセチル化酵素であり、酵母や線虫において寿命を制御する重要な因子として機能する。ヒトにおいて Sir2 のホモログは、7 種類のサブタイプ (sIRT1-7) の存在が知られている。なかでも SIRT1 は、ヒストン以外にも増殖調節やストレス反応、アポトーシスに関連した様々な蛋白もジアセチル化し細胞分化や寿命や老化の制御に関わることが最近報告され、種々の腫瘍細胞で SIRT1 が過剰発現していることが確認されている²⁻⁴⁾。SIRT1 は DNA damage に対して増殖停止を誘導し、アポトーシスよりも DNA 修復プログラムを促進させて腫瘍発生を抑制し、細胞の長命を保証している。一方で、その持続的なアポトーシス抑制は修復不能であった細胞の腫瘍化を助けることにもなる。癌の発生、進展における SIRT1 の役割は複雑で未だ十分に理解されていないが⁵⁾、SIRT1 活性化あるいは抑制することで腫瘍を抑制出来る可能性がある。

本研究では、細胞寿命制御に関わるヒストン脱アセチル化酵素 SIRT 1 に注目し、非小細胞肺癌における分子発現・作用を解明し新規の分子標的治療薬へ開発を行う。

方法および結果

1. 非小細胞肺癌における SIRT1 遺伝子の蛋白発現解析

原発性非小細胞肺癌切除症例 63 例を対象とした。SIRT1 の発現は、Sir2/SIRT1 抗体 (E104; EPITOMICS®, Burlingame, CA, USA) を使用して、外科切除標本のホルマリン固定パラフィン切片を用いた免疫組織化学染色法にて染色陽性率および染色強度より評価した。染色陽性率は 0 = 0 %, 1 = 0~33 %, 2 = 33~66 %, 3 = 66~100 %, 染色強度は 0 = 陰性、1 = 弱染色、2 = 中間染色、3 = 強染色でそれぞれスコア化し、合計スコアが 3 点以上を陽性と定義した。

非癌部肺組織には SIRT1 の発現は認められなかった。一方、腺癌組織では 49 例中 24 例で核内発現を認めたが、扁平上皮癌 14 例では発現症例は 2 例のみであった (表 1)。

腺癌における SIRT1 陽性症例の平均年齢は陰性例に比較して有意に低かった (63 才 vs. 71 才)。その他、性、喫煙歴、病期進行度との関連は明らかではなかった (表 2)。

表 1. SIRT1 発現と臨床病理学的因子との関連

因子 (カテゴリー)	SIRT1陽性 (n = 26)	SIRT1陰性 (n = 37)	p 値
平均年齢 (才)	64.1	69.4	0.01
性別 (男性 : 女性)	15 : 11	21 : 16	n.s.
喫煙歴 (既喫煙 : 非喫煙)	18 : 8	23 : 14	n.s.
組織型 (線癌 : 扁平上皮癌)	24 : 2	25 : 12	0.03

SIRT1 陽性腺癌例は、陰性例と比較して腺癌の組織型が有意に多かった。統計学的有意差検定は、連続変数は Student t-検定、カテゴリー変数は Fisher 正確検定を用いた。

表 2. 腺癌における SIRT1 発現と臨床病理学的因子との関連

因子 (カテゴリー)	SIRT1陽性 (n = 24)	SIRT1陰性 (n = 25)	p 値
平均年齢	63.5	71.2	0.0012
性別 (男性 : 女性)	14 : 10	10 : 15	n.s.
喫煙歴 (喫煙歴 : 非喫煙)	16 : 8	12 : 13	n.s.
EGFR 変異 (有 : 無)	14 : 10	14 : 11	n.s.
分化度 (G1-2 : G3)	23 : 1	22 : 3	n.s.
病理病期 ((IA : IB : II-III)	16 : 2 : 6	14 : 4 : 7	n.s.

SIRT1 陽性腺癌例は、陰性例と比較して年齢以外は性、喫煙歴、病期進行度に差を認めなかった。統計学的有意差検定は、連続変数は Student t-検定、カテゴリー変数は Fisher 正確検定を用いた。

2. 非小細胞肺癌組織を用いた抗癌剤感受性と SIRT1 発現との関連

In vitro 抗癌剤感受性は、新鮮切除標本から癌細胞浮遊液を作製して SDI (Succinate Dehydrogenase Inhibition) 法にて評価した。試験薬としては、現行の肺癌に対する化学療法の key drugs である cisplatin、pemetrexed、gemcitabine、5-fluorouracil、paclitaxel、irinotecan を用いた。前記の免疫組織化学染色法による SIRT1 発現と抗癌剤感受性試験結果との関連を調べた。

SIRT1 陽性腺癌症例は、cisplatin、pemetrexed、gemcitabine、5-fluorouracil、paclitaxel、irinotecan すべての抗癌剤に対して SIRT1 陰性症例に比較して有意に薬剤耐性を示した (図 1)。

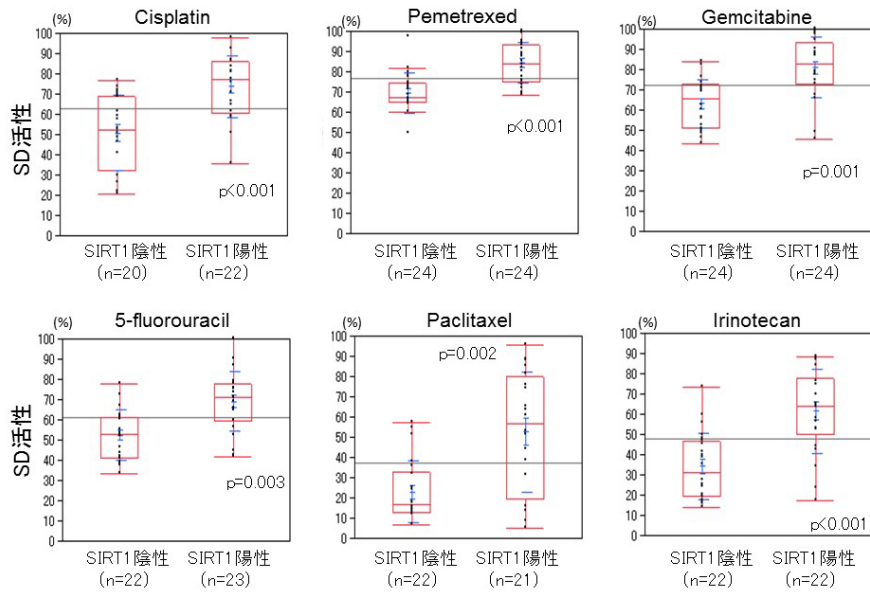


図 1. 腺癌における SIRT1 発現と抗癌剤感受性との関連

SIRT1 陽性腺癌症例は、すべての抗癌剤に対して SIRT1 陰性症例に比較して有意に薬剤耐性を示した (Mann-Whitney U 検定)。

3. 非小細胞肺癌細胞株を用いた SIRT1 発現と抗癌剤感受性との関連

肺腺癌細胞株 A549、PC-9、LK-87、II-18、YM-21 および肺扁平上皮癌細胞株 EBC-1、LK-2、QG-56 を用いて SIRT1 発現量を Western Blot 法で測定し、SDI 法による抗癌剤感受性との関連を検討した。

SIRT1 の発現量は細胞株ごとに様々であったが、肺腺癌細胞株の 2 種 (LK-87、II-18) に高発現を認めた (図 2)。SIRT1 低発現腺癌株 YM21、PC-9 は cisplatin に対して高い感受性を示した (図 3)。

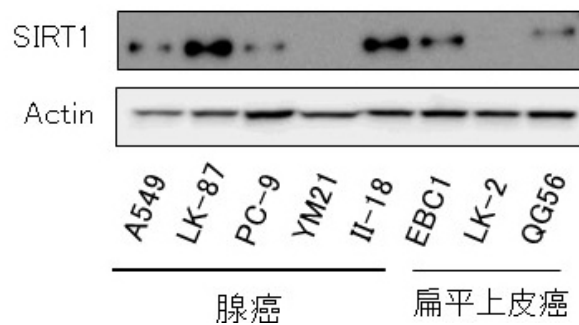


図 2. 肺癌細胞株の SIRT1 発現 (Western blot)

SIRT1 の発現量は細胞株ごとに様々であったが、肺腺癌細胞株で SIRT1 の高発現を認めた。

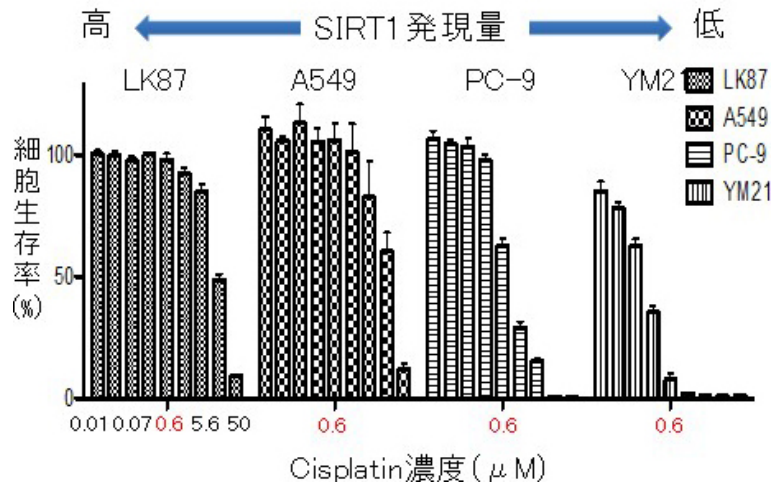


図3. Cisplatin 投与後の細胞生存率
SIRT1 低発現腺癌株 (YM21、PC-9) は cisplatin に対して高い感受性を示した。

4. 非小細胞肺癌株を用いた SIRT1 抑制阻害実験

SIRT1 に対する siRNA (GE Dharmacon, Japan) を用いた SIRT1 ノックダウンによる細胞増殖関連因子 p53、p21、Bax の発現 (Western Blot 法) および Cisplatin, Pemetrexed に対する薬剤感受性に与える影響を検討した。さらに、SIRT1 阻害剤 EX 527 (Merck Millipore, USA) による薬剤感受性に与える影響を検討した。

A549 細胞における SIRT1 ノックダウンによって、cisplatin ならびに pemetrexed 存在下の p53 のアセチル化が亢進し、pemetrexed によるアポトーシス促進タンパクである Bax 発現も亢進した (図4)。しかし、cisplatin、pemetrexed に対する感受性には変化なかった (図5)。

A549 細胞における cisplatin、pemetrexed による抗癌活性は SIRT1 阻害剤 EX 527 との併用によって変化を認めなかった。

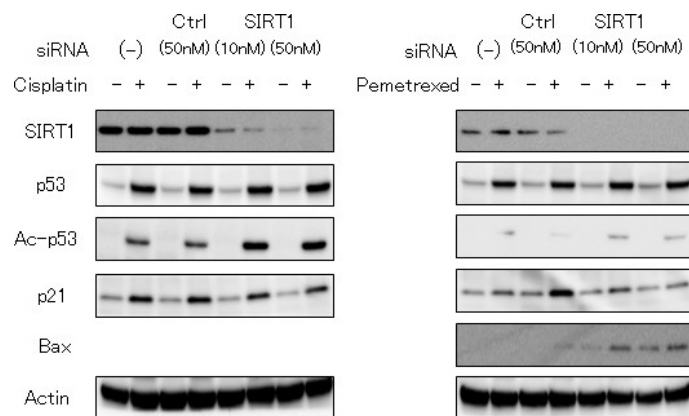


図4. SIRT1 ノックダウンによるタンパク発現の変化 (Western blot)

SIRT1 ノックダウンによって、cisplatin ならびに pemetrexed 存在下の p53 のアセチル化が亢進した (A549 細胞)。

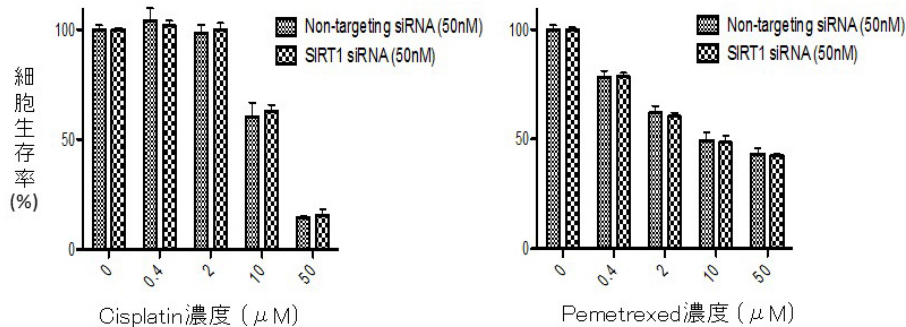


図5. SIRT1 ノックダウン細胞に対する抗癌剤感受性の変化

SIRT1 ノックダウンによって、cisplatin、pemetrexed に対する感受性に変化なかった (A549 細胞)。

考 察

本研究において、SIRT1 は非小細胞肺癌のなかでも腺癌により選択的に発現し、抗癌剤耐性に関連があることが示され、腫瘍の生物学的態度への作用を有していると考えられた。肺癌細胞株を用いた実験の結果、SIRT1 発現による抗癌剤耐性の機序と想定される p53 のジアセチル化による不活化が確認されたが、抗癌剤耐性に直接的には影響していないことが明らかになった。以上の結果より、SIRT1 高発現イコール抗癌剤耐性ではなく、SIRT1 は細胞生存に関してかなり上流にある調節遺伝子と考えられ (実際に様々な機能が知られている)、下流の色々な遺伝子の調節の総合的な結果 (総和) として抗癌剤耐性に関わっていることが示唆された。

共同研究者

本研究の共同研究者は、九州大学大学院消化器・総合外科の岡本龍郎、田川哲三、諸富洋介である。最後に、本研究のご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Yano T, Morodomi Y, Ito K, Yoshida T, Haro A, Shoji F, Koga T, Maehara Y. Verification of the newly proposed T category (seventh edition of the tumor, node, and metastasis classification) from a clinicopathological viewpoint in non-small cell lung cancer-special reference to tumor size. *J Thorac Oncol.* 2010 Jan;5(1):45-8. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181c0996c. PubMed PMID: 19884855.
- 2) Brooks CL, Gu W. How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? *Nat Rev Cancer.* 2009 Feb; 9(2):123-8. doi: 10.1038/nrc2562. Epub 2008 Dec 29. PubMed PMID: 19132007; PubMed Central PMCID: PMC2857763.
- 3) Deng CX. SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor? *Int J BiolSci.* 2009;5(2):147-52. Epub 2009 Jan 21. Review. PubMed PMID: 19173036; PubMed Central PMCID: PMC2631220.
- 4) Kim EJ, Um SJ. SIRT1: roles in aging and cancer. *BMB Rep.* 2008 Nov 30;41(11):751-6. Review. PubMed PMID: 19017485.
- 5) Yuan H, Su L, Chen WY. The emerging and diverse roles of sirtuins in cancer: a clinical perspective. *Oncotargets Ther.* 2013 Oct 8;6:1399-416. doi: 10.2147/OTT.S37750. Review. PubMed PMID: 24133372; PubMed Central PMCID: PMC3797239.