

総説

網膜芽細胞腫遺伝子と肺癌

清水英治, 住友賢哉, 篠原明德, 並川修,
川西雅士, 曾根三郎

徳島大学医学部第三内科学教室

Retinoblastoma gene in lung cancer

Eiji Shimizu, Kenya Sumitomo, Akinori Shinohara, Osamu Namikawa, Masashi Kawanishi and Saburo Sone

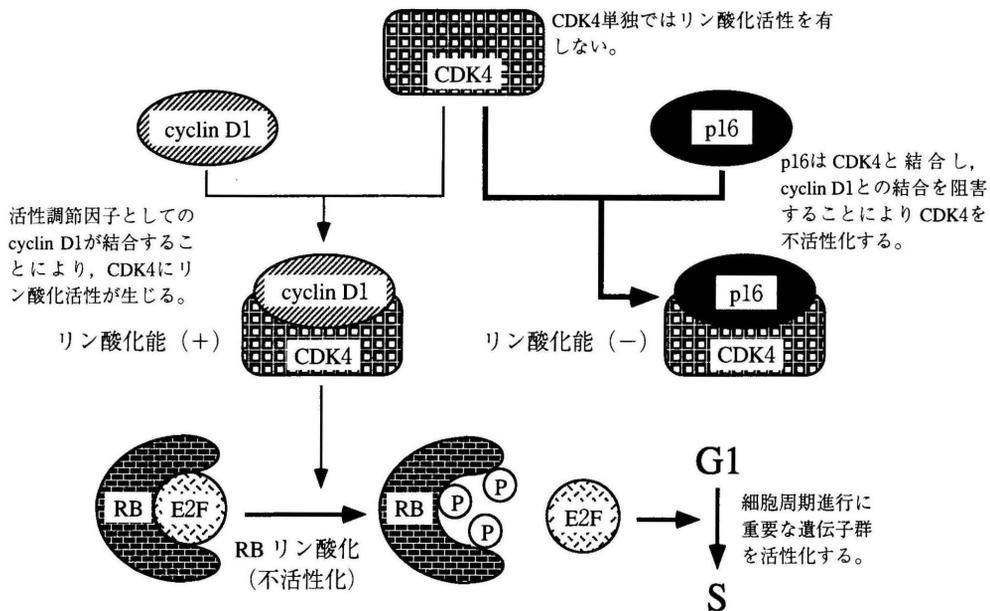
Third Department of Internal Medicine, School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima

はじめに

網膜芽細胞腫遺伝子 (retinoblastoma gene: *rb*) は13番染色体長腕上に位置する癌抑制遺伝子であり, 網膜芽細胞腫で100%に, 肺小細胞癌, 骨肉腫などで高率に *rb* 遺伝子産物 (RB) の発現異常が認められる¹⁾。家族性網膜芽細胞腫患者の家系調査に基づく遺伝子解析によりク

ローニングされたためこの名となっているが, 肺非小細胞癌, 膀胱癌, 乳癌, 甲状腺癌など広い範囲の腫瘍で RB 異常が報告されている。野生型 *rb* 遺伝子を *rb* 欠失肺癌細胞に導入すると肺癌の増殖が抑制され^{2,3)}, *rb* 遺伝子異常は肺癌の病態に深く関与すると考えられている。

図1 リン酸化によるRB機能の制御



RB 蛋白のリン酸化は CDK4/cyclin D1 複合体により行われ, リン酸化された RB 蛋白は高次構造が変化し, 結合していた転写因子 E2F を遊離する。遊離 E2F は DNA 合成に必要な遺伝子群の転写を活性化し, 細胞周期は第1休止期 (G1) より DNA 合成期 (S) に進行する。一方, CDK4/p16 複合体は RB 蛋白のリン酸化能を有さず, RB 蛋白は低リン酸化状態のままで E2F を遊離できず, 細胞周期の進行は起こらない。cyclin D1 と p16 が併存する場合, cyclin D1 と p16 のモル比に比例し, CDK4/cyclin D1 複合体と CDK4/p16 複合体の両者が形成される。

RB 癌抑制遺伝子産物の機能

RB は核に存在するリン酸化蛋白であり、細胞周期の第1休止期(G1)よりDNA合成期(S)への移行を調節することにより、細胞の増殖、分化を制御している(図1)。RB は転写因子である E2F との分子結合により機能発現する。即ち、低リン酸化型の RB は E2F と結合し、E2F の転写活性を抑制するが、高リン酸化型の RB は E2F を遊離し、遊離 E2F は S 期移行に必要な各種遺伝子(cyclin A, DNA polymerase α , dihydrofolate reductase, thymidilate synthetase など)に対して転写活性を示す⁴⁾。従って、RB の細胞周期調節作用はそのリン酸化状態により制御されている。RB を細胞内でリン酸化する酵素はセリンスレオニンキナーゼの cyclin dependent kinase (CDK) family である。CDK の発現は細胞周期によらず一定であり、CDK の機能は cyclin の発現量により調節されている。CDK family には CDK1 (CDC2), CDK2, CDK4, CDK6 などが、cyclin family には cyclin A, cyclin B, cyclin D, cyclin E などが知られている。細胞内で RB は G1 後期にリン酸化され、S 期、第2休止期(G2), 分裂期(M) と高リン酸化状態が維持され、細胞分裂後再び、G1 期に入ると低リン酸化状態となる。

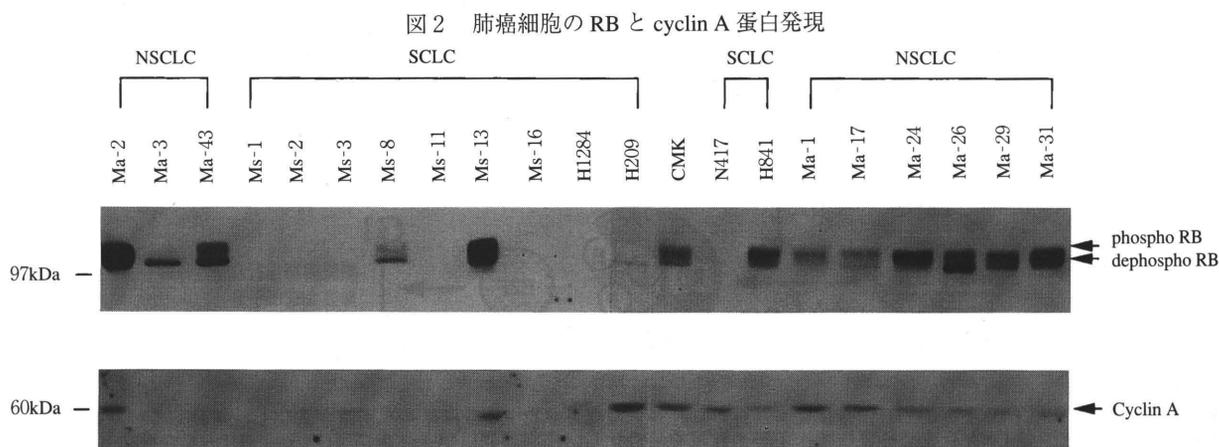
cyclin 過剰発現と肺癌

細胞内での RB リン酸化の開始は CDK4/6 と cyclin D1/2/3 が関与しており、次いで CDK2 と cyclin E が、さらに CDK2 と cyclin A が RB リン酸化に関与し、この過程で細胞は G1 期より S 期に移行する。肺非小細胞癌では cyclin D1 過剰発現により CDK4/6 の機能上昇が持続し、RB は高リン酸化型となり不活性化されると考えら

れている。一方、HB ウイルスの cyclin A 遺伝子イントロンへの挿入が cyclin A の発現異常を誘導し、肺癌の発生に関与することが知られている⁵⁾。そこで、著者らは肺癌細胞の cyclin A 発現を検討した。肺癌は化学療法や放射線療法に対する感受性の相違より肺小細胞癌と肺非小細胞癌に大別されているが、肺小細胞癌の約85%、肺非小細胞癌の約15%は、正常の構造を有する RB 蛋白を欠損していた⁶⁾。正常 RB をもつ肺癌細胞のほとんどが cyclin A を過剰発現し、しかもそれらの RB は高リン酸化型が主体であった⁷⁾ (図2)。このように、RB 正常の肺癌細胞において cyclin family member のいずれかが過剰発現することにより、構造的に正常の RB は機能的に不活性化され、癌細胞の異常増殖を抑制できないと考えられている⁸⁾。現在、これらの cyclin 過剰発現肺癌に対しアンチセンスによる cyclin 発現抑制療法が検討されている。

RB リン酸化阻害因子 p16^{INK4A} の欠失

最近、悪性黒色腫、食道癌、膵臓癌、脳腫瘍、胸膜中皮腫、悪性リンパ腫、白血病など広汎の腫瘍で9番染色体短腕上に位置する新しい癌抑制遺伝子の機能欠失が報告されている⁴⁾。臨床検体での異常頻度は高く、これまで最も高頻度に異常のみられる p53 癌抑制遺伝子に次ぐものである。この癌抑制遺伝子産物 p16^{INK4A} は 16kD の核蛋白であり、CDK4/cyclin D1 による RB のリン酸化を阻害する機能を有することが明らかになった。肺癌では非小細胞癌で欠失、変異による p16^{INK4A} の機能喪失が高頻度に認められる。正常の RB をもつ肺癌細胞ではその90%以上が p16^{INK4A} を欠失しており、RB を欠失する肺



肺小細胞癌 (SCLC) の多くは野生型 RB 蛋白を欠損しており、cyclin A の発現量も低い。一方、肺非小細胞癌 (NSCLC) はほとんどが野生型 RB 蛋白を保有するとともに高レベルの cyclin A を発現している。NSCLC の RB 蛋白は高リン酸化型が主体である。phospho RB, 高リン酸化型 RB; dephospho RB, 低リン酸化型 RB

癌細胞では、ほぼ全例で p16^{INK4A} を発現する^{9,10}。さらに、RB 欠失肺癌細胞は p16^{INK4A} を過剰に（蛋白レベルで正常細胞の10倍以上）発現することが明らかにされている。RB 欠失肺癌細胞では E2F の多くが遊離型となり、この E2F が p16^{INK4A} の転写を促進するためと考えられている¹¹。われわれは RB 正常 p16^{INK4A} 欠失の肺癌細胞に p16^{INK4A} 遺伝子をリポフェクション法にて導入する実験を行った。G418を含む選択培地で長期間培養すると肺癌細胞のコロニー形成はコントロールに比し10分の1より100分の1に減少し、強い増殖抑制活性を有することが示された。Western blot 法では、遺伝子導入後 p16^{INK4A} の高発現とともに RB の低リン酸化がみられ、p16^{INK4A} 遺伝子導入による腫瘍増殖抑制効果は RB を介するものと考えられた。この腫瘍抑制効果は cyclin D1 過剰発現肺癌細胞でもみられ、外因性 p16^{INK4A} の高発現は内因性の cyclin D1 過剰発現を克服すると考えられた¹²。p16^{INK4A} 遺伝子導入前後の細胞周期調節関連遺伝子産物の変化を図3に示す。p16^{INK4A} は RB、E2F を介して、細胞周期の進行を強く抑制するので、癌に対する遺伝子治療の有力な標的分子と考えられている¹³。また、p16^{INK4A} 類似的作用をもつ薬剤が精力的に探索されており¹⁴、癌化学療法剤の作用メカニズムを明らかにする上でも興味深い分子である。

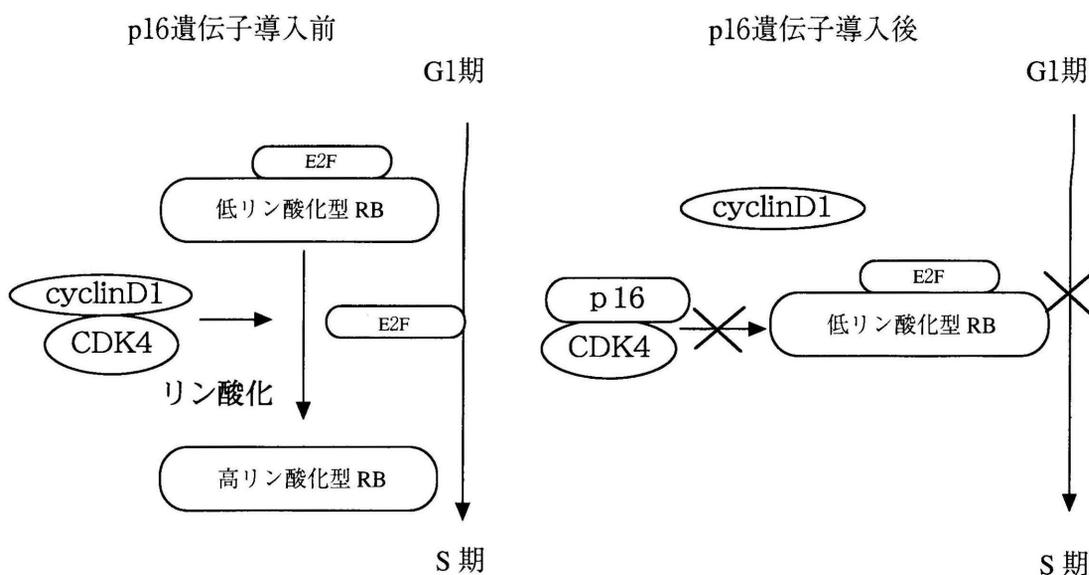
変異型 RB

遺伝子欠失、遺伝子点突然変異、CpG のメチル化などによる機能性 RB 分子の欠失により RB 機能は失われる。肺癌における RB 機能異常のほとんどは RB 欠失に基づくが、約10%の肺癌では構造遺伝子の変異による変異型 RB の出現に基づくことが知られている¹⁵。ほとんどの変異型 RB は特定のエクソンや C 末端を欠如しているが、単一アミノ酸の置換による変異型 RB も存在する。その代表として NCI-H209 肺小細胞癌株の保持する RB は706番目のアミノ酸がシステインよりフェニルアラニンに変化したもので、この変異型 RB はアデノウイルス E1A、ヒトパピローマウイルス E7、SV40 大型 T 抗原との結合能や被リン酸化能を失っており、G1 期より S 期への細胞周期移行抑制活性も失っている^{16,17}。しかし、変異型 p53 と異なり、これら変異型 RB が優性癌遺伝子として働くという報告はみられない。

RB 欠失肺癌細胞への rb 遺伝子の導入

RB を欠失する肺小細胞癌培養株 (NCI-N417, NCI-H187) 肺非小細胞癌 (NCI-H2009) にリポフェクション法にて rb 遺伝子を導入し、RB 蛋白を再発現する安定クローンが得られた^{2,6}。RB を再発現する肺癌細胞は免疫不全マウスに移植されると RB を発現しない肺癌細胞

図3 p16^{INK4A} 遺伝子導入による細胞周期の制御



p16を欠損する肺非小細胞癌の p16遺伝子導入前の細胞周期の制御状態を左図に示す。p16を欠損しているため、CDK4は cyclin D1と複合体を形成し、RB 蛋白をリン酸化し、高リン酸化型 RB 蛋白は転写因子 E2F を遊離するため、細胞では G1 期より S 期への移行が起こっている。p16遺伝子導入後、発現した p16は CDK4と複合体を形成し、RB 蛋白リン酸化を抑制する (右図)。E2F が低リン酸化型 RB と結合し、DNA 合成に必要な遺伝子に対する E2F の転写活性が抑制され、G1 期より S 期への移行が抑制され、癌細胞の増殖は抑制される。

に比べ、腫瘍形成が著明に抑制される。しかし、肺癌細胞を細胞外間質成分 (laminin, collagen type IV, fibronectin 等) を含む matrigel と混合してマウスに接種すると *rb* 遺伝子導入による腫瘍縮小効果が打ち消される。また、肺癌細胞の二重軟寒天培地におけるコロニー形成能 (足場非依存性増殖能) に matrigel が促進的効果を示すことより、ある種の細胞外間質は RB 機能を修飾し癌化に関与すると考えられている¹⁸⁾。また、RB を再発現する肺癌細胞は発現しない親株に比して、etoposide, cisplatin, adriamycin 等の抗癌剤により抵抗性である。抗癌剤は S, G2, M 期でその作用を発現するものが多く、G1 停止を誘導する RB は肺癌細胞を抗癌剤より防護すると考えられる⁸⁾。

RB 発現異常の臨床的意義

RB 蛋白発現異常と肺癌患者背景因子の相関性の検討では、喫煙歴、年齢、性別、臨床病期、performance status 等との有意の関連はみられていない¹⁹⁾。RB 発現異常と化学療法効果の関係では、RB 発現異常のある肺癌がないものに比し、化学療法に対する感受性が高いとされている⁶⁾。Xu ら²⁰⁾の報告によると、stage I, II 期の肺非小細胞癌において、免疫組織学的に101例中24例に RB 蛋白発現異常を認め、これらの患者の中間生存期間は18カ月で、RB 蛋白が正常に発現している患者の32カ月に比し有意に短かいとしている。手術時の摘出標本の RB 発現異常の検索は予後の推測や術後アジュバント化学療法の適否判定に有用と考えられる。

おわりに

RB 遺伝子産物は細胞周期制御の中心に位置し、細胞が分裂増殖へ進むか、休止分化へ向かうかを最終決定する重要な分子である。癌抑制遺伝子産物 p16^{INK4A} や癌遺伝子産物 cyclin D, E, A は RB に直接的に作用することにより、癌抑制遺伝子産物 p53 は RB に間接的に作用することにより、ほとんどの癌の病態に RB が深く関与している。また、多くの増殖因子は cyclin 等を介し²¹⁾、抗癌剤、放射線も p21 等の RB リン酸化阻害因子を介し RB に作用している。肺癌の治療成績が伸び悩んでいる現在、肺癌治療に携わる臨床腫瘍医は肺癌の病態の本質を十分理解し、肺癌の病態に基づいた治療を検討する必要がある。

文 献

- 1) Kratzke, R.A., Shimizu, E., Kaye, F.J.: Oncogenes in human lung cancer. *Cancer Treat. Res.*, 63: 61-85, 1993
- 2) Kratzke, R.A., Shimizu, E., Geradts, J., Gerster, J.L., et al.: RB-mediated tumor suppression of a lung cancer cell line is abrogated by an extract enriched in extracellular matrix. *Cell Growth Differ.*, 4: 629-635, 1993
- 3) Ookawa, K., Shiseki, M., Takahashi, R., Yoshida, Y., et al.: Reconstitution of the RB gene suppresses the growth of small-cell lung carcinoma cells carrying multiple genetic alterations. *Oncogene*, 8: 2175-2181, 1993
- 4) Sherr, C.J.: Cancer cell cycles. *Science*, 274: 1672-1677, 1996
- 5) Wang, J., Chenivresse, X., Henglein, B., Brechot, C.: Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature*, 343: 555-557, 1990
- 6) Shimizu, E., Coxon, A., Otterson, G.A., Steinberg, S.M., et al.: RB protein status and clinical correlation from 172 cell lines representing lung cancer, extrapulmonary small cell carcinoma, and mesothelioma. *Oncogene*, 9: 2441-2448, 1994
- 7) Shimizu, E., Zhao, M., Shinohara, A., Yamamoto, A., et al.: Differential expressions of cyclin A and RB protein in histological subtypes of lung cancer cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1997 (in press)
- 8) 清水英治, 超 美蓉, 吉田成二, 山本晃義 他: 肺小細胞癌における RB 蛋白発現異常と肺非小細胞癌におけるサイクリン A の高発現. 肺癌の予後因子 (小倉 剛, 安光 勉 編), 中山書店, 東京, 1995, pp. 131-140
- 9) Otterson, G.A., Kratzke, R.A., Coxon, A., Kim, Y.W., et al.: Absence of p16^{INK4} protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB. *Oncogene*, 9: 3375-3378, 1994
- 10) Shapiro, G.I., Edwards, C.D., Kobzik, L., Godleski, J., et al.: Reciprocal Rb inactivation and p16^{INK4} expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res.*, 55: 505-509, 1995

- 11) Khleif, S.N., DeGregori, J., Yee, C.L., Otterson, G.A., et al. : Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 : 4350-4354, 1996
- 12) Sumitomo, K., Shimizu, E., Shinohara, T., Sone, S. : Growth suppression of a lung cancer cell line over-expressing cyclin D1 by the introduction of the *p 16^{INK4A}* gene. (in preparation)
- 13) 清水英治 : RB 遺伝子と抗癌剤感受性. 肺癌の分子生物学 (西條長宏 編), ファーマインターナショナル, 東京, 1995, pp. 18-19
- 14) Shimizu, E., Zhao, M. R., Nakanishi, H., Yamamoto, A., et al. : Differing effects of staurosporine and UCN-01 on RB protein phosphorylation and expression of lung cancer cell lines. Oncology, 53 : 494-504, 1996
- 15) Horowitz, J.M., Park, S.H., Bogenmann, E., Cheng, J.C., et al. : Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 : 2775-2779, 1990
- 16) Kaye, F.J., Kratzke, R.A., Grester, J.L., Horowitz, J.M. : A single amino acid substitution results in a retinoblastoma protein defective in phosphorylation and oncoprotein binding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 : 6922-6926, 1990
- 17) Kratzke, R.A., Otterson, G., Lin, A.Y., Shimizu, E., et al. : Functional analysis at the Cys⁷⁰⁶ residue of the retinoblastoma protein. J. Biol. Chem., 267 : 25998-26003, 1992
- 18) Yoshida, S., Shimizu, E., Ogura, T., Takada, M., Sone, S. : Stimulatory effect of reconstituted basement membrane components (matrigel) on the colony formation of a panel of human lung cancer cell lines in soft agar. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 123 : 301-309, 1997
- 19) Reissmann, P.T., Koga, H., Takahashi, R., Figlin, R.A., et al. : Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small cell lung cancer. Oncogene, 8 : 1913-1919, 1993
- 20) Xu, H.J., Quinlan, D.C., Davidson, A.G., Hu, S.X., et al. : Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early-stage non-small-cell lung carcinoma. J. Natl. Cancer Inst., 86 : 695-699, 1994
- 21) Shimizu, E., Takahashi, Y., Shinohara, A., Yamamoto, Y., et al. : Stem-cell factor regulates the expression of cyclin A and retinoblastoma gene product in the growth and differentiation pathway of human megakaryocytic cells. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 122 : 445-452, 1996