



YB-1 promotes transcription of cyclin D1 in human non-small-cell lung cancers

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2015-05-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 原田, 雅教 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2804

博士(医学) 原田 雅教

論文題目

YB-1 promotes transcription of cyclin D1 in human non-small-cell lung cancers

(ヒト非小細胞肺癌において YB-1 はサイクリン D1 の転写を促進させる)

論文の内容の要旨

[はじめに]

肺癌は予後不良疾患の1つであり主要な死亡原因である。この為、肺癌の分子機構の解明及び治療、診断への応用は喫緊の課題となっている。この肺癌の病原性を規定する因子として血管新生やアポトーシスの他に細胞周期制御機構が挙げられる。サイクリン蛋白は細胞周期の回転においてエンジンの役割を果たすサイクリン依存性キナーゼ(CDK)の調節サブユニットである。このうち、サイクリン D1 (cyclin D1) は G1 期の進行において中心的な役割を果たしている。

cyclin D1 は肺癌を含む種々の悪性腫瘍で高発現し細胞の癌的増殖に関与し、増殖因子や転写因子の制御を受けることによりその発現を維持している。また、転写因子 YB-1 も同様に非小細胞肺癌を含む多種の癌で高発現し、CDC6 や cyclin B1 などの細胞増殖関連遺伝子の発現にも関わることが報告されている。しかし、非小細胞肺癌における両者の機能的な関連については不明な点が多い。我々は、cyclin D1 遺伝子上流領域に YB-1 の結合配列である Ybox が存在することを見いだした。そこで、今回我々は非小細胞肺癌における YB-1 の cyclin D1 に対する制御機構について検証した。

[材料ならびに方法]

① 肺癌細胞の検討:

肺癌細胞株には A549, H1299, ABC-1, EBC-1 を用いた。YB-1 のノックダウンは、リポフェクション法によって small interfering RNA (siRNA) を形質導入し、ウェスタンブロット法、Reverse Transcription – Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)、ルシフェラーゼ・アッセイやクロマチン免疫沈降法により詳細に検討した。また、細胞周期解析には Propidium Iodide (PI) 染色後にフローサイトメトリを用いて分析を行った。

② 肺癌臨床検体の検討:

臨床検体を用いた検討においては、肺癌の手術切除標本を用いて RT-qPCR や組織免疫染色を行い統計学的な解析も加えた。

この研究は浜松医科大学倫理委員会の承認を受けて行った。

[結果]

まず、YB-1 をノックダウンすると細胞増殖能は低下し、細胞周期の進行は G1 期で停止する傾向にあった。次に YB-1 の cyclin D1 に対する発現制御を確認するために YB-1 をノックダウンしたところ、cyclin D1 の蛋白量および mRNA

の発現量はともに減少していた。A549 および HEK-293 細胞において cyclin D1 リポータープラスミドを用いたルシフェラーゼ・アッセイを行うと、ルシフェラーゼ活性は YB-1 を過剰発現させると増加し、ノックダウンさせると減少した。そして、抗 YB-1 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法では内因性の YB-1 が Y-box 配列を含む cyclin D1 のプロモーター領域に直接結合していることも示された。さらに、ヒト肺癌手術切除標本より抽出した mRNA の発現量の解析では、YB-1 と cyclin D1 の発現が正に相関しており、組織免疫染色の解析においても両者は蛋白レベルで正の相関がみられた。これらの結果は、非小細胞肺癌において YB-1 が G1 期サイクリンである cyclin D1 を直接転写レベルで制御することで癌細胞の増殖を促していることを示唆している。さらに cyclin D1 と CDC6 の両者がともに陽性であった症例は YB-1 の高発現と正の相関があった。

[考察]

cyclin D1の過剰発現は、癌抑制遺伝子産物の1つであるRetinoblastoma (RB)の過剰リン酸化による不活性化を招き細胞周期を促進することが知られている。我々は肺癌において過剰発現している転写因子YB-1がcyclin D1を正に制御していることを見出した。この亢進したcyclin D1-Cdk4活性によりRBが不活化されることで、細胞周期のブレーキが外れ、肺癌細胞の増殖亢進に至っていると考えられる。

これまでに、YB-1はp53によるp53誘導アポトーシス促進因子の転写活性を抑制することでアポトーシスから回避していることが報告されている。今回、我々はp53の欠損した肺癌細胞株においても、p53の正常な細胞株と同様の結果であったことからYB-1によるcyclin D1への転写制御はp53非依存的な機構であると考えられた。

YB-1はYbox (CAAT/ATTG)と呼ばれる塩基配列を認識して標的遺伝子に結合する転写因子である。しかしながら、他の転写因子と複合体を形成しYbox非依存的な結合をする報告も散見される。今回のクロマチン免疫沈降の検証では、YB-1はYboxの存在しない部位との結合も認めたことから、YB-1はcyclin D1のプロモーターに対して、他の転写因子などと複合体を形成することで間接的に結合する可能性も示唆された。

臨床検体を用いた組織免疫染色の解析では、YB-1はcyclin D1およびCDC6とそれぞれと正の相関を認めただけでなく、YB-1が高発現するとcyclin D1とCDC6の両者がともに陽性となることが示された。これまでにYB-1は細胞周期関連遺伝子(cyclin B, CDC6, PCNA, E2F)の発現を促進し、p53やCDK4インヒビターであるp16^{ink4A}の転写活性を抑制すること、肺癌における主要なシグナル伝達経路であるBRAF遺伝子が異常活性化するとYB-1の発現が促進されることなどが報告されている。また、YB-1はEGFRの転写活性を亢進することも報告されており、YB-1はEGFR/RAS/RAF/MAPKカスケードにおいて正のフィードバック機構を形成している。これらの結果を考慮すると、肺癌においてYB-1はcyclin D1やCDC6、増殖因子、他の細胞周期関連遺伝子と共同して肺癌の細胞増殖機構を亢進していることが考えられる。

[結論]

YB-1 過剰発現による cyclin D1 および CDC6 の異常な発現亢進は、これらが共同して肺癌の発癌に関与している可能性がある。