

# 論文内容要旨

RASEF is a novel diagnostic biomarker and a  
therapeutic target for lung cancer

(RASEF は肺癌の新たな診断マーカー及び治療標的である)

Molecular Cancer Research, 2013, in press.

主指導教員：河野 修興 教授

(応用生命科学部門 分子内科学)

副指導教員：岡田 守人 教授

(原爆放射線医科学研究所 腫瘍外科)

副指導教員：服部 登 准教授

(応用生命科学部門 分子内科学)

尾下 豪人

(医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻)

肺癌は癌死の原因の第1位を占めており、新たな早期診断や治療法を開発することが急務である。肺癌で高レベルに発現上昇する遺伝子を同定し、癌の進展における役割を解析することで、新たな分子標的治療薬、癌ワクチン、診断マーカーなどの開発が可能であると考えられる。そこで我々は多数の肺癌臨床検体を用いて cDNA マクロアレイを行い、肺癌の遺伝子発現プロファイルを作成した。そのプロファイルをもとに、我々は Ras and EF-hand domain containing (RASEF) が肺癌において高頻度・高レベルに発現しており、正常肺組織にはほとんど発現していないことを明らかにした。

肺癌臨床検体及び肺癌細胞株を使った RT-PCR を行ったところ、RASEF は肺癌臨床検体および肺癌細胞株において高頻度・高レベルに発現しており、正常肺および正常気道上皮由来細胞株 BEAS-2B ではほとんど発現を認めなかった。また multiple tissue northern blot によって正常臓器における RASEF の発現を検討したところ、前立腺と精巣以外の正常臓器には発現を認めなかった。RASEF に対する特異的な抗体を用いた細胞免疫染色では、RASEF が細胞質に局在していることを明らかにした。発現ベクターを用いて RASEF を細胞株に強制発現させたところ細胞の増殖が促進され、一方で si-RNA による RASEF の発現抑制は癌細胞の増殖を抑制した。この結果から RASEF が肺癌細胞の増殖に重要な働きをしていることが明らかになった。341 例の非小細胞肺癌患者の病理組織標本を用いて RASEF の組織免疫染色を行い、RASEF の発現と臨床病理学的因子との相関を調べたところ、RASEF は T 因子と有意に相関していた。また多変量解析の結果、RASEF の高発現は非小細胞肺癌患者において独立した予後不良因子であった ( $P = 0.0034$ )。

さらに RASEF がどのような機序で肺癌の増殖に関与しているのか機能解析を行った。RASEF が属する Rab ファミリーのなかには MAPK 経路の活性調節に関与する分子がいくつか報告されていたため、RASEF の過剰発現あるいは発現抑制が MAPK 経路の各分子 (c-Raf、MEK、ERK、RSK) の活性に影響しているかどうかを Western blot 法により検討した。その結果、RASEF は ERK1/2 の活性を促進的に調節していることがわかった。RASEF の発現が MAPK 経路の下流で転写調節される遺伝子 (*Cyclin D1*、*Cyclin B1*、*CDKN1A*) の発現にも影響することを確認した。また、免疫沈降法により、RASEF が ERK1/2 と直接結合していることが確認できた。RASEF の治療応用の可能性を探るため、RASEF の ERK1/2 結合領域を同定し、同部位から細胞膜透過性ペプチドを設計した。この膜透過性ペプチドは RASEF と ERK1/2 の結合を効果的に阻害し、また用量依存性に肺癌細胞の増殖を抑制することができた。

以上の結果から RASEF は肺癌の発生や進展に重要な役割を演じており、新たな予後予測因子及び治療標的分子として有望と考えられる。