

博士論文

論文題目 ユビキチンリガーゼの新規発癌変異

氏 名 山戸 梓

目次

1. 要旨	1
2. 略語一覧	2
3. 序文	4
3. 実験方法	7
1) 細胞株と培養	7
2) H1703、3T3 細胞のゲノム DNA 抽出・cDNA 作製	7
3) SureSelect システムによる全エクソン領域、cDNA キャプチャー	8
4) コンピューターによる解析	8
5) 発現プラスミド作成	9
6) 3T3 focus formation assay ならびにヌードマウスでのがん化能の検証	11
7) ルシフェラーゼアッセイ	12
8) <i>NIK</i> -shRNA 恒常発現 3T3 細胞の樹立	13
9) ウェスタンブロット	14
4. 結果	16
1) H1703 細胞株のゲノム解析	16
2) BIRC3 (E358X) 変異の同定	21
3) 3T3 focus formation assay およびヌードマウスでのがん化能の検証	24
4) BIRC3 変異のがん化能と NF- κ B 活性	28
5) BIRC3 のその他の変異の機能解析	33
6) BIRC2 と BIRC3 の機能の重複	39
5. 考察	44
6. 参考文献	48
7. 謝辞	54

要旨

肺がんの発症に寄与する遺伝子変異の同定を目指して肺扁平上皮がん細胞株 H1703 のゲノム解析を行い、ユビキチンリガーゼである BIRC3 の E358X 変異を同定した。BIRC3 (E358X) は形質転換能を有するが、それは BIR ドメインの存在下でユビキチンリガーゼが失活することによるものであること、またその形質転換能は NF- κ B 活性によらないことが示唆された。また、BIRC3 のユビキチンリガーゼ失活変異はがん変異データベースおよび既報の論文に多くの報告があり、それらの多くが実際に形質転換能を持つことも確認した。さらに同じ IAP ファミリーでユビキチンリガーゼ活性を持つ BIRC2 でも変異の報告があり、機能解析により BIRC3 と形質転換能に重複性を持つことが示唆され、BIRC ファミリーが体細胞変異によって直接的ながん遺伝子となることを明らかにした。

略語一覧（登場順）

epidermal growth factor (EGFR)

anaplastic lymphoma kinase (ALK)

ret pro-oncogene (RET)

receptor tyrosine kinase1 (ROS1)

echinoderm microtubule associated protein-like 4 (EML4)

International Cancer Genome Consortium (ICGC)

The Cancer Genome Atlas (TCGA)

Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)

complementary DNA (cDNA)

Dulbecco's modified Eagle's medium: Nutrient Mixture F12 (DMEM/F12)

fetal bovine serum (FBS)

single nucleotide polymorphism (SNP)

baculoviral inhibitors of apoptosis repeat-containing (BIRC)

inhibitor of apoptosis (IAP)

baculoviral IAP repeat (BIR)

ubiquitin associated (UBA)

caspase recruitment domains (CARD)

nuclear factor κ B (NF- κ B)

NF- κ B inducing kinase (NIK)

short hairpin RNA (shRNA)

really interesting new gene (RING)

cellular-inhibitors of apoptosis proteins (c-IAPs)

mitogen activated protein kinase (MAPK)

inhibitor of NF- κ B (I κ B)

I κ B kinase (IKK)

NF- κ B essential modulator (NEMO)

receptor interacting protein 1 (RIP1)

second mitochondria-derived activator of caspases (Smac)

序文

肺がんは我が国を含む世界のがん死の原因第 1 位であり、その少なくとも 80% が腺がん、扁平上皮がん、大細胞がんよりなる非小細胞肺がんに分類される。肺がんの患者の多くは進行期に見つかり、その 5 年生存率は 20% を下回る [1]。非小細胞肺がんは進行期には通常プラチナ系抗がん剤に他の 1 剤を加えた 2 剤による化学療法が行われるが全生存期間の中央値は 1 年前後にすぎない。

がんは様々なゲノム異常・エピゲノム異常の蓄積の結果生じると考えられているが、近年ある種の非小細胞肺がんが *epidermal growth factor (EGFR)* [2]、*anaplastic lymphoma kinase (ALK)* [3]、*ret proto-oncogene (RET)* [4] や *receptor tyrosine kinase1 (ROS1)* [5] といった遺伝子に特異的な変異を持ち、かつそれらの変異が腫瘍形成に強く関わるということが明らかになった。さらに EGFR キナーゼを標的とするゲフィチニブ（商品名イレッサ）およびエルロチニブ（商品名タルセバ）といったチロシンキナーゼ阻害薬を用いた分子標的治療は *EGFR* 変異陽性の肺がん患者に対する無増悪生存期間・全生存期間を大幅に改善した [6, 7]。また同様に *ALK* 阻害薬であるクリゾチニブ（商品名ザーコリ）も *echinoderm microtubule associated protein-like 4 (EML4)* と *ALK* の融合タンパクを生み出す *EML4-ALK* 転座陽性患者へ同様の結果をもたらしている [8]。これらをふまえると、発がんに必要な遺伝子異常を同定

し、その産物を標的とする治療を行う「分子標的療法」を開発することが現在のがん治療において最も効果的であると考えられる。

がん細胞のゲノム DNA 塩基配列および mRNA 発現プロファイルを解析し正常のそれと比較することは、新たな治療標的を探索する手段として有効であると予想される。2000 年のヒトゲノム配列の決定および次世代シーケンサーの登場により、かつてないスケールで上記解析を行うことが可能になった。すでにこれまでに、がんゲノムの体細胞変異を大規模にスクリーニングする国際的な活動として **International Cancer Genome Consortium (ICGC)** が 2008 年に発足し、50 種類のがん種からそれぞれ 500 検体の全エクソン配列をリシーケンスするプロジェクトが行われている。日本でもウイルス感染に関連する肝臓がんの解析が割り当てられ、国立がん研究センターなどで研究が行われている。同様のプロジェクトとして米国の **The Cancer Genome Atlas (TCGA)** がある。また、1000 種以上のがん細胞株の DNA 塩基配列、DNA コピー数、RNA 発現解析をおこなう **Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)** といったプロジェクトなどがあり広く研究が行われている。現在でもシーケンスの高速化・低価格化は進んでおり、将来的にはがん患者の診断時に採取した検体から次世代シーケンサーを用いて様々な解析を行い同定された異常に応じた個別治療いわゆるテーラーメイド医療が行われることも期待される場所である。

本研究ではまだ臨床応用されている分子標的薬に乏しい扁平上皮肺がんの原因を調べる目的で次世代シーケンサーを用いて扁平上皮肺がん細胞株 H1703 のゲノム DNA の全エクソン領域と我々の選んだがん関連遺伝子の complementary DNA (cDNA) の変異解析を行うこととした。

実験方法

細胞株と培養

ヒト胎児由来細胞株 HEK293、同細胞由来の BOSC23 パッケージング細胞株、扁平上皮肺がん細胞株 H1703 [9]、マウス線維芽細胞株 NIH3T3（以上全て American Type Culture Collection）は Dulbecco's modified Eagle's medium: Nutrient Mixture F12 (DMEM/F12)（Invitrogen）に 10% (vol/vol) の ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) (Invitrogen) と 2 mM L-グルタミン（Invitrogen）および 100 units/ml ペニシリン（Invitrogen）、100 µg/ml ストレプトマイシン（Invitrogen）を加えた培養液で培養した。

H1703、NIH3T3 細胞のゲノム DNA 抽出・cDNA 作製

ゲノム DNA は QIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN）により抽出した。
cDNA は RNeasy Mini column（QIAGEN）により全 RNA を抽出後、オリゴ dT 配列を含む CDS primer IIA（Clontech）をアニールさせ、SMARTScribe 逆転写酵素存在下で 42℃、1 時間反応させ 1 本鎖 cDNA を合成した。さらに SMART 法（Clontech）による PCR 反応で二本鎖 DNA とした。

SureSelect システムによる全エクソン領域、cDNA キャプチャー

ヒトの全エクソン領域を純化するための RNA プローブとして SureSelect Human All Exon v4 (Agilent Technologies) を使用した。またヒトの発がん関連遺伝子 913 種類 (セリンスレオニンキナーゼやチロシンキナーゼ、転写因子、脱リン酸化酵素など) の cDNA をキャプチャーするため、120 塩基の RNA プローブを設計・合成した (Agilent Technologies) [10]。ゲノム DNA および二本鎖 cDNA をアコースティックソルビライザーによって平均長 100 bp に断片化した後、それぞれの SureSelect システムのビオチン化 RNA プローブと 65℃、24 時間でハイブリダイズし、その後 RNA プローブに結合した DNA 断片をストレプトアビジン結合磁気ビーズにより回収した。さらに回収した DNA 断片をペアエンド法により Illumina 社 Genome Analyzer IIx (GAIIx) を用いて、両末端から 110 塩基ずつシーケンスした。

コンピューターによる解析

GAIIx により得られた膨大なデータから各塩基コールの質を表す Q 値などを基にクオリティチェックを行い、良質なデータのみを取り出した。次に得られた塩基配列をゲノム DNA のデータは全エクソン領域に、cDNA のデータは cDNA キャプチャーに用いた 913 種類の遺伝子の cDNA 配列にマップさせ変異を同定した。

同定した変異の中で同義変異 (synonymous mutations) や「1000 人ゲノムプロジェクト」に登録されている既報の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) は削除し、非同義変異 (non-synonymous mutations) のみを選び出した。

発現プラスミド作製

Baculoviral inhibitors of apoptosis (IAP) repeat-containing (BIRC) 2、BIRC3 の野生型および BIRC3(E358X)の cDNA は PrimeSTAR HS DNA ポリメラーゼ (Takara Bio) と以下のプライマーを用いて H1703 細胞株から RT-PCR 法で増幅した。

BIRC2 full length cDNA

5'- GCTATCAAACAGTACTGTCACC-3'

5'-AGCAGTGACACTACTCCCTTAG-3'

BIRC3 full length cDNA

5'- CCCTTTTCTTCCCCATTCATTTC-3'

5'-TGGCTTCATGTTCCCGGTATTA-3'

得られた PCR 産物は pMXs レトロウイルスベクター (東京大学医科学研究所北村俊雄教授より供与) へ挿入した。

その他の変異体については BIRC3 (H574A) のドメイン欠損変異体を除き野生型の BIRC2 または BIRC3 /pMXs プラスミドを鋳型とし

Quickchange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene 社) を用いて作成した。各変異の作製に使用したプライマー配列は表 2 に示す。BIRC3 (H574A) のドメイン欠損変異体は BIRC3 (H574A) /pMXs プラスミドを鋳型とし同様に Quickchange Site-Directed Mutagenesis kit を用いて作成した。具体的には baculovirus IAP repeat (BIR) 1 ドメイン欠損変異体 (H574A/Δ BIR1 : 27~98 番アミノ酸欠損)、BIR2 ドメイン欠損変異体 (H574A/Δ BIR2 : 167~238 番アミノ酸欠損)、BIR3 ドメイン欠損変異体 (H574A/Δ BIR3 : 254~325 番アミノ酸欠損)、ubiquitin associated (UBA) ドメイン欠損変異体 (H574A/Δ UBA : 377~424 番アミノ酸欠損)、caspase recruitment domains (CARD) ドメイン欠損変異体 (H574A/Δ CARD : 439~528 番アミノ酸欠損) を作製した。作製に使用したプライマーは

H574A/Δ BIR1

5'-CTAAATTCCGTTAACAACCTTGGAAGCTACCTC-3'

5'-CAAGTCGTATTTTCAGTTCAAACGTGTTGGCGC-3'

H574A/Δ BIR2

5'-CAGCTTCAAGACACTTCAAGATACAC-3'

5'-CATTGCACAGTGGTAGGAACTTCTC-3'

H574A/Δ BIR3

5'-ATTAAAGGACAGGAGTTCATCCGTC-3'

5'-CATGCTCAGATTAGAAACTGTGTATC-3'

H574A/ Δ UBA

5'-CTAGCAACTGGAGAGAATTATAGAC-3'

5'-CATGATTGCATCTTCTGAATGGTC-3'

H574A/ Δ CARD

5'-CAACAGGACATAAAATATATTCCCACAG-3'

5'- TTTCTCAGTTGCTCTTTCTCTCTCCTC- 3'

同様に NIH3T3 細胞からマウス Nuclear Factor κ B (NF-κB) inducing kinase(NIK)の cDNA を以下のプライマーを用いて RT-PCR 法で増幅、pMXs レトロウイルスベクターへ挿入した。

NIK full length cDNA

5'- CACTCGCTTGTTTGAGGACAAC-3'

5'- GTGCAGACTCATCCAGCATCTC-3'

なお、BIRC3-MALT1 融合遺伝子の cDNA はペンシルバニア大学の Xiaolu Yang 博士より供与をいただいた。

3T3 focus formation assay ならびにヌードマウスでの形質転換能の検証

BOSC23 細胞 (1.8×10^6) を直径 6 cm の細胞培養プレートに播種した 24 時間後に pMXs に組み込んだ cDNA プラスミド 2 μg をパッケージ

ジング用プラスミド (pGP 0.5 μ g + pE-eco 0.5 μ g、ともに Takara Bio) と共に Lipofectamine Reagent (Invitrogen) 18 μ l を用いて導入した。導入 2 日後の培養上清をウイルス溶液として回収し、polybrene (Sigma) を 4 μ g/ml の濃度で添加後、NIH3T3 細胞 (5×10^5) に感染させた。感染 2 日後に、DMEM/F12 培地に 5 % 牛血清および 100 units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加した培地に交換してさらに 2 週間培養を続け形質転換フォーカスの形成を判定した。また、同じ感染 NIH3T3 細胞 (5×10^5) をヌードマウスの皮下に 4 カ所ずつ接種し 35 日間観察して腫瘍形成の有無を確かめた。

ルシフェラーゼアッセイ

nuclear factor κ B (NF- κ B) シグナル経路の活性を測定する目的でホタルルシフェラーゼを用いた NF- κ B レポータープラスミド (Stratagene) を使用した。遺伝子導入効率を検定するためのレニラルシフェラーゼにはプロモーター断片を持たない pGL-4.70 (Promega) を使用した。HEK293T 細胞を 6 ウェルプレートに 5×10^5 個/ウェルでまき、Lipofectamine を使用してトランスフェクションした。発現プラスミド (450 ng)、レポータープラスミド (150 ng) および pGL-4.70 (150 ng) を OPTI-MEMI (Invitrogen) 中で混合し、細胞に添加した。24 時間後に培養上清を交換し、さらに 24 時間後 $5 \times$ Passive Lysis Buffer

(Promega) を用いて細胞を溶解した。細胞溶解物をプロトコールに従って Luciferase Assay Reagent (Promega) と混合し、Plate Reader ARVO X3 (PerkinElmer) を使用して測定した。

NIK 標的 shRNA 恒常発現 NIH3T3 細胞の樹立

マウス NF- κ B-inducing kinase (*NIK*) を標的とする short hairpin RNA (shRNA) を作成するために

5'-CCGGAGAGAGCCTGTCCGCCGACGTGTGCTGTCCGTCGGTGGACG
GGCTCTTTCCTTTTGG-3'

を pLKO.1 puro (Addgene) レンチウイルスベクターに挿入した。

BOSC23 細胞 (1.8×10^6) を直径 6 cm の細胞培養プレートに播種した
24 時間後に pLKO.1 に標的配列を組み込んだプラスミド 2 μ g またはコントロール用の scramble-sh が組み込まれた pLKO-scramble(Addgene) をパッケージング用プラスミド (pMDLg/pRRE 0.4 μ g + pRSVReV 0.4 μ g + pLP/VSVG 0.2 μ g、全て Takara Bio) と共に Lipofectamine Reagent 18 μ l を用いて導入した。導入 2 日後の培養上清をウイルス溶液として回収し、polybrene を 4 μ g/ml の濃度で添加後、NIH3T3 細胞 (5×10^5) に感染させた。感染 2 日後にピューロマイシン (Invitrogen) 1 μ g/ml を加えさらに 2 週間培養し恒常発現株を選択した (以下 *NIK*-shRNA の恒常発現株を *NIK*-sh-3T3、scramble-sh の恒常発現株を Ctl-sh-3T3 と表記

する)。

ウエスタンブロット

上述した NIK-sh-3T3、Ctl-sh-3T3、または通常の NIH3T3 細胞に対してレトロウイルスを用いて遺伝子導入を行った。48 時間後、細胞を NP-40 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1 mM NaF、1 mM Na₃VO₄、1 mM PMSF、アプロチニン (セリンプロテアーゼ阻害薬)、1 % NP-40) で溶解した。細胞溶解物を 7.5 % アクリルアミドゲルで電気泳動し、セミドライ方式でポリフッ化ビニリデン (PVDF) 疎水性メンブレン (Millipore) 上にブロットした。一次抗体に抗 NIK 抗体 (#4994, Cell Signaling technology)、二次抗体に Anti-Rabbit-IgG (GE Healthcare) を使用し、SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) と反応させ、ImageQuant LAS4010 (GE Healthcare) によりバンドを検出した。また、同様に一次抗体に抗 BIRC3 抗体 (#3130, Cell Signaling technology)、二次抗体に Anti-Rabbit-IgG (GE Healthcare) を使用しバンドを検出した。

遺伝子	塩基変異	アミノ酸変異	プライマー
BIRC2 (NM_001166)	c.55_55delA	p.K19fs*3	5'-CCCAGGTCCCTCGTATCAAAACATTAGAGTATAATGG-3' 5'-CCATTATACTCTAATGTTTTGATACGAGGGACCTGGG-3'
	c.605C>G	p.S202*	5'-CTTTTTTGTACCATGAGAAATTGGCAAGAGCTGG-3' 5'-CCAGCTCTTGCCAATTCTCATGGTGACAAAAAAG-3'
	c.1012C>T	p.R338*	5'-GGTGTGAGTTCTTGATATGAATGAAAGGCC-3' 5'-GGCCTTTCATTATCATCAAGAATCACCACC-3'
	c.1082C>G	p.S361*	5'-GAACAGCTGTTGTGAACCTCAGATACCACTGG-3' 5'-CCAGTGGTATCTGAAGTTCACAACAGCTGTTC-3'
	c.1318_1319insA	p.E442fs*10	5'-GCTGAAGATGAAAAAAGAGAAGAGGAGAAGG-3' 5'-CCTTCTCCTCTTCTCTTTTTTTCATCTTCAGC-3'
	c.1588G>T	p.E530*	5'-CGGCCAACATCTTCAAAAACCTGTCTAAAATAAATTGACTC-3' 5'-GAGTCAATTTATTTTAGACAGTTTTTGAAGATGTTGGCCG-3'
	c.1702G>T	p.E568*	5'-GGAGGTTGCAAGAATAACGAACCTTGTAAG-3' 5'-CTTTACAAGTTCGTTATTCTTGCAACCTCC-3'
	c.20G>T	p.S7I	5'-CAT CAT ATT CTT ATC AAA TTT GAT GAA AAG CGC CAA CAC G-3' 5'-CGT GTT GGC GCT TTT CAT CAA ATT TGA TAA GAA TAT GAT G-3'
	c.515G>T	p.R172I	5'-CGA AAA TGC CAT ATT ACT TAC TTT TCA GAA G-3' 5'-GTC TGA AAA GTA AGT AAT ATG GCA TTT TCG-3'
	c.743C>G	p.S248C	5'-GATACACAGTTTGTAACTTGAGCATGCAGACAC-3' 5'-GTGCTGCATGCTCAGATTACAACTGTGTATC-3'
BIRC3 (NM_001165)	c.832A>C	p.S278R	5'-GCA GCT TGC ACG TGC GGG TTT TTA TTA TGT GGG-3' 5'-CCC ACA TAA TAA AAA CCC GCA CGT GCA AGC TGC-3'
	c.890G>A	p.G297D	5'-TTTGCTGTGATGATGGACTCAGGTGTTGGG-3' 5'-CCCAACACCTGAGTCCATCATCACAGCAAA-3'
	c.956G>A	p.C319Y	5'-GTGTTTCCAAGGTATGAGTACTTGATAAG-3' 5'-CTTATCAAGTACTCATACCTTGGAACACAC-3'
	c.1101_1132del32	p.G367fs*6	5'-ATA CTC CTG TGA TTA ATG CTG CCG-3' 5'-CCA GGT TCA AAA TGG ATA ATT GAT G-3'
	c.1102G>T	p.E368*	5'-TTG AAC CTG GAT AAG ACC ATT CAG AAG ATG C-3' 5'-GCA TCT TCT GAA TGG TCT TAT CCA GGT TCA A-3'
	c.1183_1352del170	p.V395fs*6	5'-AAT GGC ACT TTT TCA ACA TTT GAC-3' 5'-CAG GCT TCT ACT AAA GCC CAT TTC C-3'
	c.1270G>T	p.E424*	5'-CTC AAT GCA TAA GAT GAA ATA AGG GAA GAG AG-3' 5'-CTC TCC TCT TCC CTT ATT TCA TCT TAT GCA TTG AG-3'
	c.1279_1280insA	p.I427fs*11	5'-GAA GAT GAA AAT AAG GGA AGA GGA GAG AG-3' 5'-CTC TCT CCT CTT CCC TTA TTT TCA TCT TC-3'
	c.1283_1287delGGGAA	p.R428fs*8	5'-CTCAATGCAGAAGATGAAATAAGAGGAGAGAGAAAGAGC-3' 5'-GCTCTTCTCTCTCTCTTATTTCATCTTCTGCAATTGAG-3'
	c.1463C>T	p.R448Q	5'-TAT TAT TAA TCC AGA AGA ATA GAA TGG CAC-3' 5'-GTG CCA TTC TAT TCT TCT GGA TTA ATA ATA-3'
	c.1414G>A	p.G472R	5'-CCT GGA TAG TCT ACT AAC TGC CAG AAT TAT TAA TG-3' 5'-CAT TAA TAA TTC TGG CAG TTA GTA GAC TAT CCA GG-3'
	c.1463C>T	p.T488M	5'-CAG AAG ACA CAG ATG TCT TTA CAA GCA AGA G-3' 5'-CTC TTG CTT GTA AAG ACA TCT GTG TCT TCT G-3'
	c.1607C>G	p.T536R	5'-ATATTCCAGAGAAGATGTTTCAGATCTACCAGTGG-3' 5'-CCACTGGTAGATCTGAAACATCTTCTCTGGGAATAT-3'
	c.1606delA	p.T536fs*32	5'-GGA CAT AAA ATA TAT TCC CCA GAA GAT GTT TCA G-3' 5'-CTG AAA CAT CTT CTG GGG AAT ATA TTT TAT GTC C-3'
	c.1636G>T	p.E546*	5'-GATCTACCAGTGAATAACAATTGCGGAG-3' 5'-CTCCGCAATTGTTATTCCACTGGTAGATC-3'
	c.1638_1639insA	p.Q547fs*12	5'-CCA GTG GAA GAA ACA ATT GCG GAG ACT AC-3' 5'-GTA GTC TCC GCA ATT GTT TCT TCC ACT GG-3'
	c.1639delC	p.Q547fs*21	5'-CTACCAGTGAAGAAAAATTGCGGAGACTAC-3' 5'-GTAGTCTCCGCAATTTTCTTCCACTGGTAG-3'
	c.1663_1666delAGAA	p.R555fs*12	5'-CAT GTA AAG TGT GTA TGG ACA AAG-3' 5'-TTC TTC TTG TAG TCT CCG CAA TTG-3'
	c.1690G>T	p.E564*	5'-GTGTGTATGGACAAATAAGTGTCCATAGTG-3' 5'-CACTATGGACACTTATTGTGCCATACACAC-3'

表 1 発現プラスミド作製に使用したプライマー

結果

H1703 細胞株のゲノム解析

ヒトのゲノムは繰り返し配列やイントロン、エクソンで構成されており、タンパクをコードするエクソン領域はわずか 1.5%程度に過ぎない（図 1）。そこで我々は十分な重複度で異常配列を検出するために Agilent 社の SureSelect システムを利用して、標的エクソンおよび標的 cDNA を効率よく純化した上で配列解析を行った（図 2）。

具体的には扁平上皮肺がんの細胞株 H1703 より調製したゲノム DNA からは全エクソン領域を純化し、cDNA からは発がんに関連する 913 種類の遺伝子〔10〕の cDNA をキャプチャーして GAIIX システムによるシーケンシングを行った。

その結果、エクソン配列および cDNA 配列それぞれ約 3.6 Gbp および 2.9 Gbp の塩基配列を得た。これらリード配列から非同義変異を同定するため、研究室独自のコンピューターパイプラインを構築して解析を行った（図 3）。その結果、両者に共通する変異として 42 種類の遺伝子上に計 44 の非同義変異が検出された（表 2）。

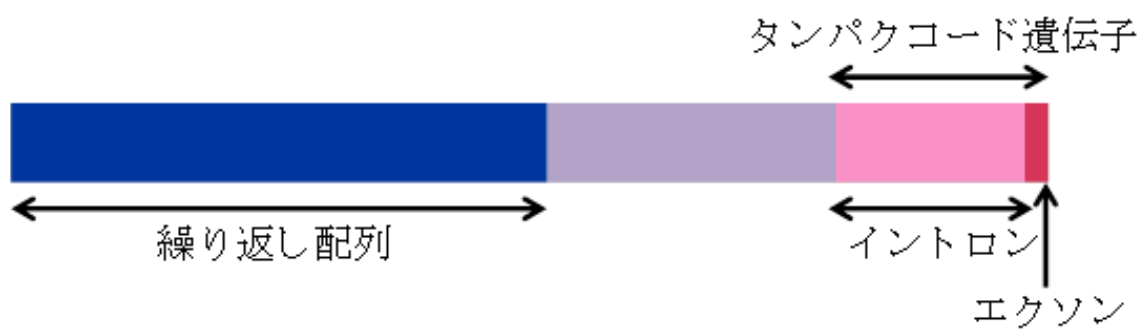


図 1 ヒトゲノムの構造

ヒトゲノムの領域の約半分は繰り返し配列でしめられており、タンパクコード遺伝子全体のサイズは約 20 % 程度である。しかも、その中で実際に mRNA として転写されるエクソン領域はわずか 1.5 % ほどである。

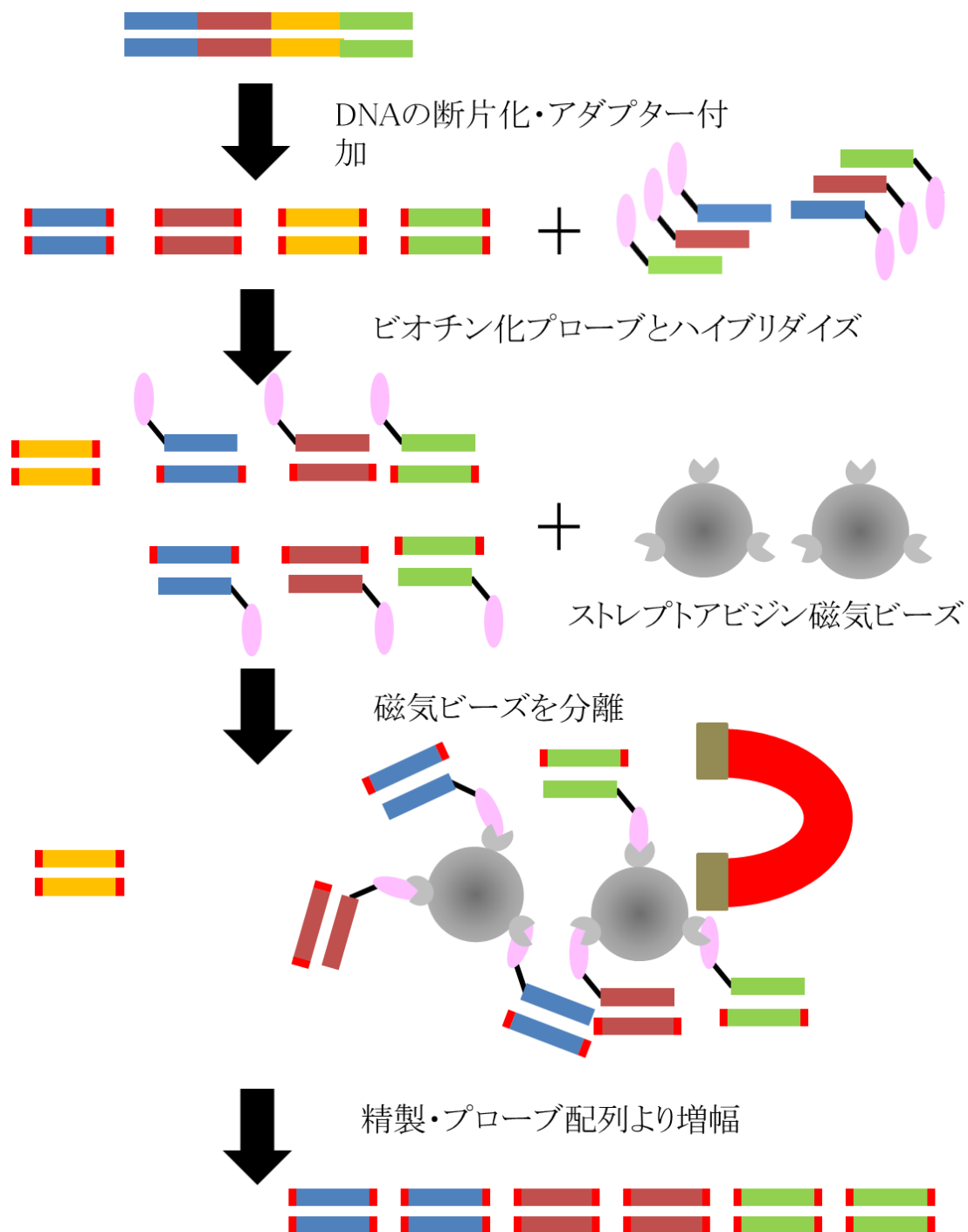


図 2 SureSelect システムによるシーケンスキャプチャー

あらかじめキャプチャーしたい配列に対応する RNA プローブをビオチン化した状態で用意しておく。DNA を断片化した後、熱変性し、上記 RNA プローブとハイブリダイズさせる。その後ストレプトアビジン結合磁気ビーズで RNA プローブ・DNA 断片複合体を純化する。

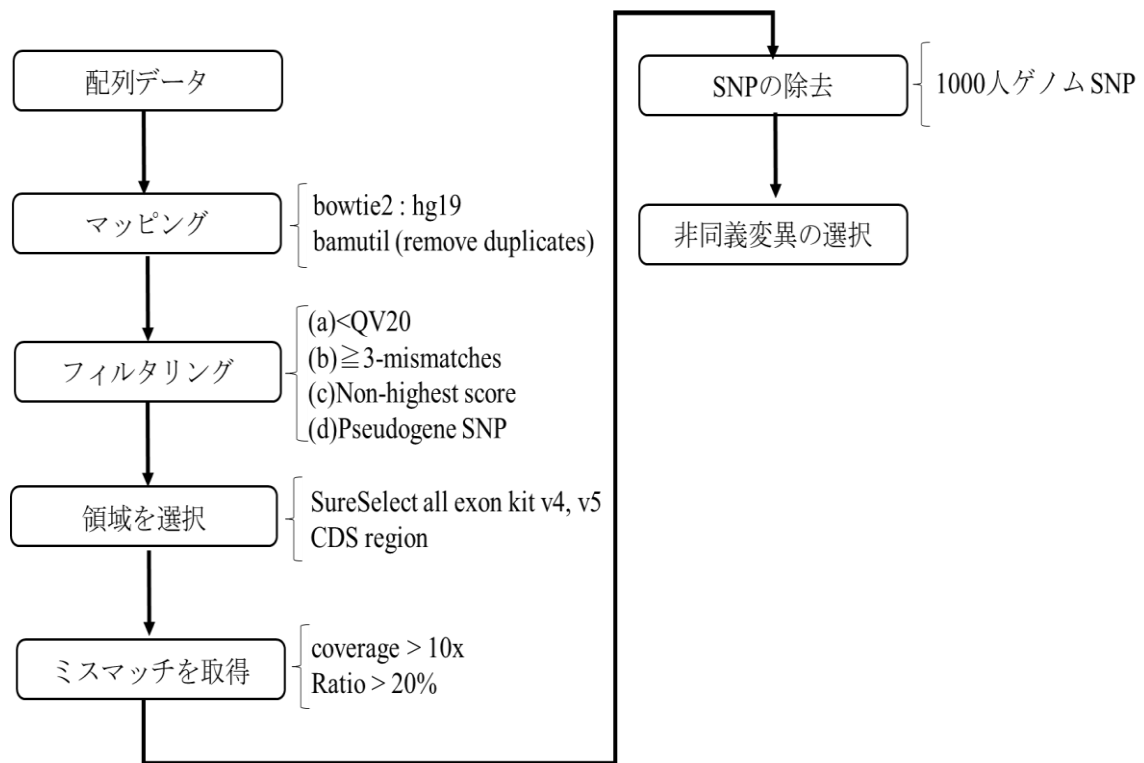


図 3 非同義変異同定パイプライン

GAIIXにより得られた膨大な配列データは、まず bowtie2 によりヒトゲノム上にマップされる。その後クオリティチェックを含むフィルターに通す。この後再度、キャプチャー領域とマッチさせミスマッチがあるか検証する。集まったミスマッチのうちカバレッジ > 10 かつミスマッチ率 > 20 % の条件をみたす変異を集計。1000 人ゲノムプロジェクトで報告されている SNP を取り除く。そしてそのミスマッチがアミノ酸置換を起こす場合を変異候補とする。

		gDNA			cDNA		
遺伝子名	アミノ酸変異	総リード数	変異リード数	変異率	総リード数	変異リード数	変異率
AGRN	Q1889X	27	27	100	137	137	100
AKAP13	Q93X	169	72	42.6036	231	86	37.2294
ALKBH8	D316E	261	137	52.4904	379	179	47.2296
ALS2	Q866L	29	17	58.6207	420	203	48.3333
AQR	A451S	71	33	46.4789	1277	578	45.2623
ARHGAP32	R1594S	99	42	42.4242	52	29	55.7692
ARHGAP5	G787R	191	191	100	1056	1056	100
ASPM	R1729L	672	383	56.994	1380	825	59.7826
BIRC3	E358X	297	124	41.7508	977	263	26.9191
CDH2	R561L	276	109	39.4928	2574	759	29.4872
CHD6	Q774H	102	34	33.3333	119	119	100
CHUK	S263C	56	56	100	1709	473	27.677
CPNE7	P633S	377	104	27.5862	44	17	38.6364
CREBBP	W1434C	76	38	50	1149	576	50.1305
CREBBP	N2137S	132	64	48.4848	36	16	44.4444
DFNB31	A88D	75	75	100	82	82	100
EP300	A1437V	331	99	29.9094	4583	1511	32.9697
FANCD2	V97I	21	13	61.9048	618	354	57.2816
GTF3C4	A490T	87	87	100	341	341	100
HSPA4	P189L	167	68	40.7186	5041	1443	28.6253
LATS2	D1078Y	48	48	100	217	217	100
LRBA	R1317L	97	97	100	195	195	100
MBD3	R82L	55	55	100	68	68	100
NCOA6	L1839F	623	208	33.3868	651	198	30.4147
PCDH10	T846K	82	82	100	437	437	100
PDCD6IP	G185W	323	194	60.0619	1076	689	64.0335
PHF17	D14G	386	386	100	200	200	100
PLCL2	N679K	121	57	47.1074	41	13	31.7073
POM121	A570V	74	16	21.6216	362	120	33.1492
PRC1	A261P	145	72	49.6552	396	209	52.7778
RALGPS1	V520A	256	256	100	44	44	100
RNASEL	H314R	85	21	24.7059	362	85	23.4807
ROBO1	D1060V	222	222	100	161	161	100
ROBO1	D1060Y	222	222	100	161	161	100
SPAG9	S238C	383	324	84.5953	1527	1252	81.9908
STARD7	R154L	25	12	48	1266	659	52.0537
TAF4B	P114T	158	104	65.8228	411	242	58.8808
TMEM9B	S164N	69	69	100	595	594	99.8319
TNKS	H859R	159	159	100	244	244	100
TRIM68	L476V	29	29	100	149	149	100
UBR5	S1626G	161	103	63.9752	120	73	60.8333
USP9X	G233W	225	225	100	5359	5359	100
UTRN	M3113V	310	95	30.6452	1544	496	32.1244
VPS8	M368L	682	555	81.3783	290	234	80.6897

表 2 H1703 の非同義変異

ゲノム DNA (gDNA)、cDNA 共に図 2 のパイプラインに従い重複度 20、変異率 20% を閾値として非同義変異を検索した。両者に共通して確認された変異を表に示す。

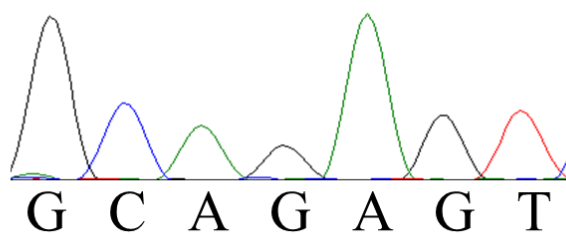
BIRC3 (E358X) 変異の同定

まず我々はこれらの変異の中からキナーゼ 2 種およびがん関連が疑われる 6 種の cDNA を作製し 3T3 focus formation assay によりスクリーニングを行った。その結果それらの変異で唯一、フォーカスを形成し野生型と変異型とで差を認めたのが BIRC3 cDNA (GenBank accession number: NM_001165) の 3867 番目のグアニン (G) がチミン (T) へと置換し、その結果 358 番目のコドンがグルタミン酸 (E) から終始コドン (X) に変化するものであった (BIRC3E358X)。この変異は cDNA、ゲノム DNA のキャピラリーシーケンサー解析でも確認された (図 4)。

今回我々が変異を同定した BIRC3 は inhibitors of apoptosis (IAP) proteins の一種である。IAP ファミリーは少なくとも一箇所以上の BIR ドメインを持つタンパクと定義され、多くのがん種で過剰発現しアポトーシスの抑制を介してがんの進展及び治療の抵抗性に関わっているとされている [11]。また、一部の IAP は really interesting new gene (RING) ドメインによるユビキチンリガーゼ活性も持つことが知られている。特に cellular-inhibitor of apoptosis proteins (c-IAPs: BIRC2・BIRC3 または c-IAP1・c-IAP2 と表記) の RING ドメインは主に NF- κ B 経路のシグナル伝達を制御しているほか mitogen activated protein kinase (MAPK) 経路にも関連することが知られている [12]。c-IAPs がその制御に重要な役割を果たす NF- κ B 経路は獲得・自然免疫反応、細胞増殖、細胞死、

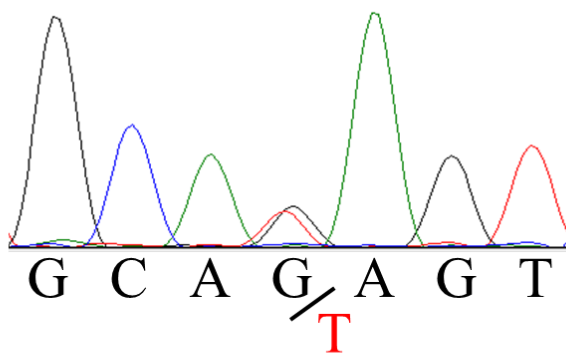
炎症といった様々な生理的現象を制御している[13]。また、近年 c-IAPs の変異やコピー数の異常が多発性骨髄腫、Waldenstrom's macroglobulinemia、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病などの血液悪性腫瘍でみられることが報告されている [14-19]。一方、多くのがんで BIRC3 の発現が亢進していることも知られている [11]。我々は上記知見から BIRC3(E358X)が H1703 細胞株の発がんに寄与する可能性についてさらに検討した。

野生型



E (グルタミン酸)

E358X変異



E (グルタミン酸)

またはX (終始コドン)

図4 BIRC3 (E358X) の同定

肺扁平上皮がん細胞株 H1703 の cDNA およびゲノム DNA を GAIIX でシーケンスしたことによって同定された BIRC3(E358X)変異 (塩基上は BIRC3 cDNA の 3867 番目の塩基「G (グアニン)」が「A (アデニン)」に置換する変異) は、H1703 の cDNA、ゲノム DNA をキャピラリーシーケンスにかけることで確認された。

3T3 focus formation assay およびヌードマウスでの形質転換能の検証

BIRC3 は 3 種類の BIR ドメインおよびそれぞれ一種類の UBA、CARD、RING ドメインで構成される。図 5 で示されるように、BIRC3 (E358X) 変異ではこのうち BIR ドメイン以外の全てが欠損することになる。BIRC3 (E358X) 変異のがん化への関与を調べるために野生型の BIRC3 と BIRC3 (E358X) を pMXs レトロウイルスベクターへ挿入し、ヌードマウスによる腫瘍形成実験を行った。その結果興味深いことに、野生型の BIRC3 はヌードマウスに腫瘍を形成しなかったが、BIRC3 (E358X) はヌードマウスでの腫瘍も形成し形質転換能があることが示された (図 6A,B)。

次に BIRC3 のユビキチンリガーゼ活性が腫瘍形成に関わる可能性を検討する目的で、ユビキチンリガーゼ活性に必須のアミノ酸である 574 番目のヒスチジンをアラニンへと置換した全長 BIRC3 のリガーゼ活性失活変異体 (BIRC3(H574A)) を作成し同様の実験を行った (図 5)。興味深いことに BIRC3 (H574A) においても BIRC3 (E358X) と同様に形質転換フォーカスの形成およびヌードマウスでの腫瘍形成が確認された (図 6A,B)。なお、このとき強制発現させたタンパクの量に大きな差がないことをウエスタンブロットで確認した (図 6C)。

さらにこの BIRC3 (H574A) の腫瘍形成能に他のドメインが与える影響を調べる目的で BIRC3 (H574A) 内の各ドメイン欠損変異体を作

成し 3T3 focus formation assay を行った。その結果、BIR2、UBA、CARD
の各ドメインを欠失させても形質転換能に対する影響は見られなかつ
たが BIR3 ドメインの欠失では形質転換フォーカスの数が減少し、BIR1
ドメインの欠失では形質転換フォーカスは全くみられなかった(図7)。

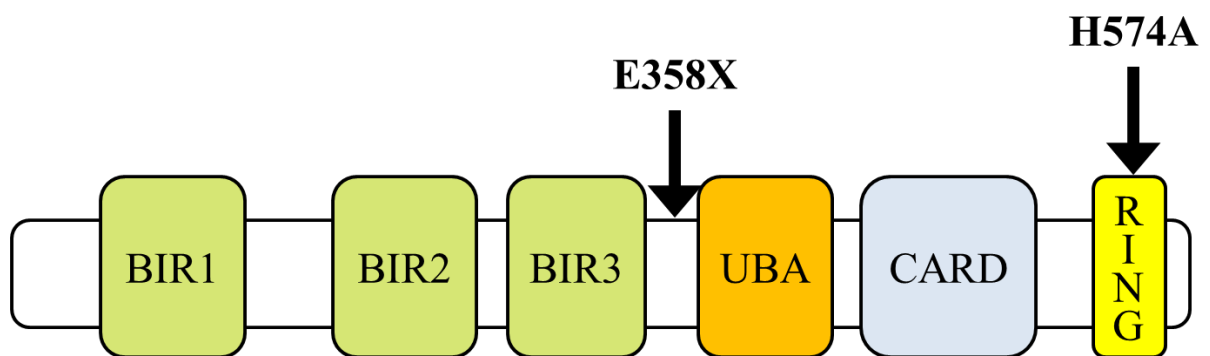


図 5 BIRC3 タンパクの構造と変異箇所

BIRC3 は 3 つの BIR ドメインと 1 つずつの UBA ドメイン、CARD ドメイン、RING ドメインがある。H1703 のゲノム解析の結果同定された E358X 変異は BIR3 ドメインと UBA ドメインの間でのノンセンス変異で有り BIR3 ドメインより C 末端側に位置する 3 つドメインの機能が失われる。

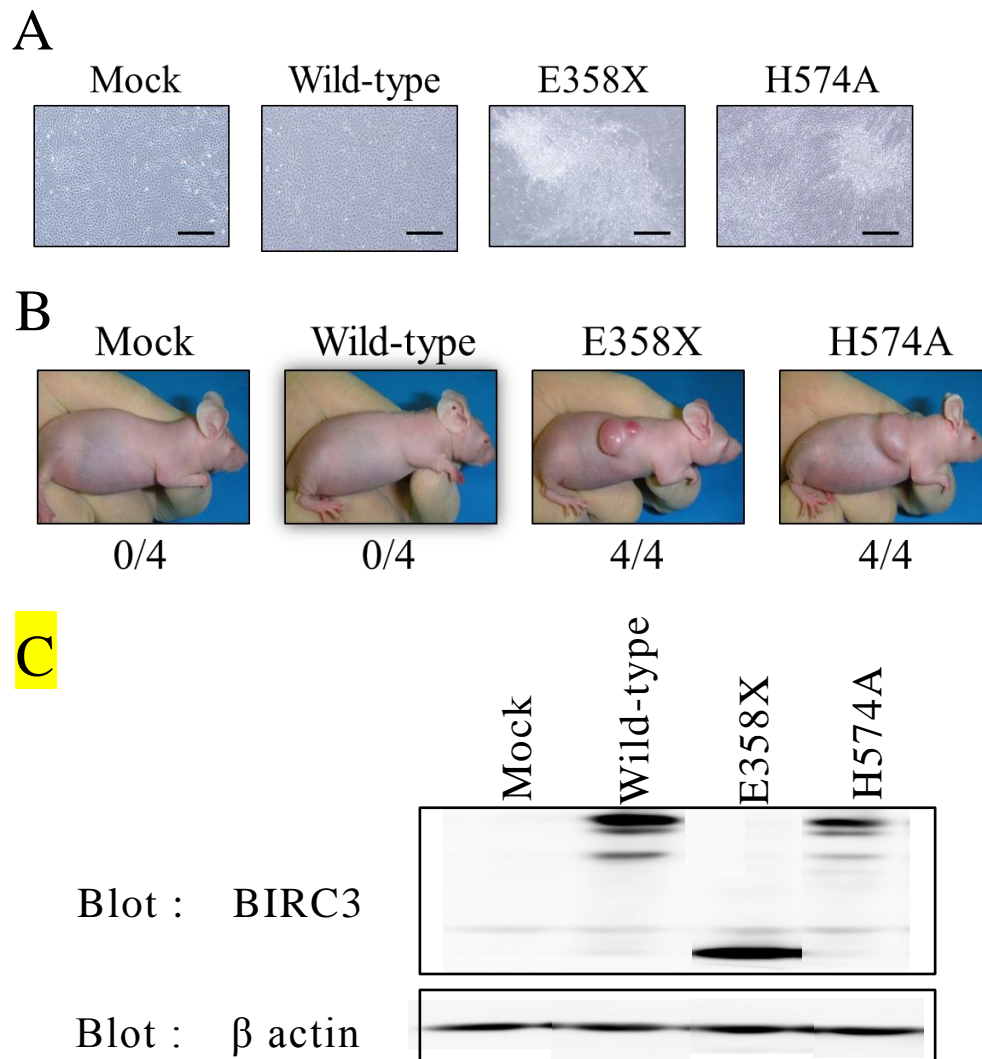


図 6 BIRC3 変異体の形質転換能

A, ブランクベクター (Mock) ならびに、BIRC3 の野生型 (Wild-type)、E358X 変異あるいは人為的ユビキチンリガーゼ失活型変異 (H574A) cDNA を pMXs レトロウイルスプラスミドに挿入し、NIH3T3 細胞に感染させ 14 日間培養し形質転換フォーカスの評価をした。スケールバーは 100 μ m。

B, A と同じ感染 NIH3T3 細胞をヌードマウスに接種し 35 日間観察したところで腫瘍形成の有無を判定した。下にヌードマウスへの NIH3T3 細胞接種箇所数と、そのうち何カ所に腫瘍が形成されたかを腫瘍個数/接種箇所数で示す。

C, A と同じ感染 NIH3T3 細胞より細胞溶解液を調整しウエスタンブロットで BIRC3 の発現を調べた。

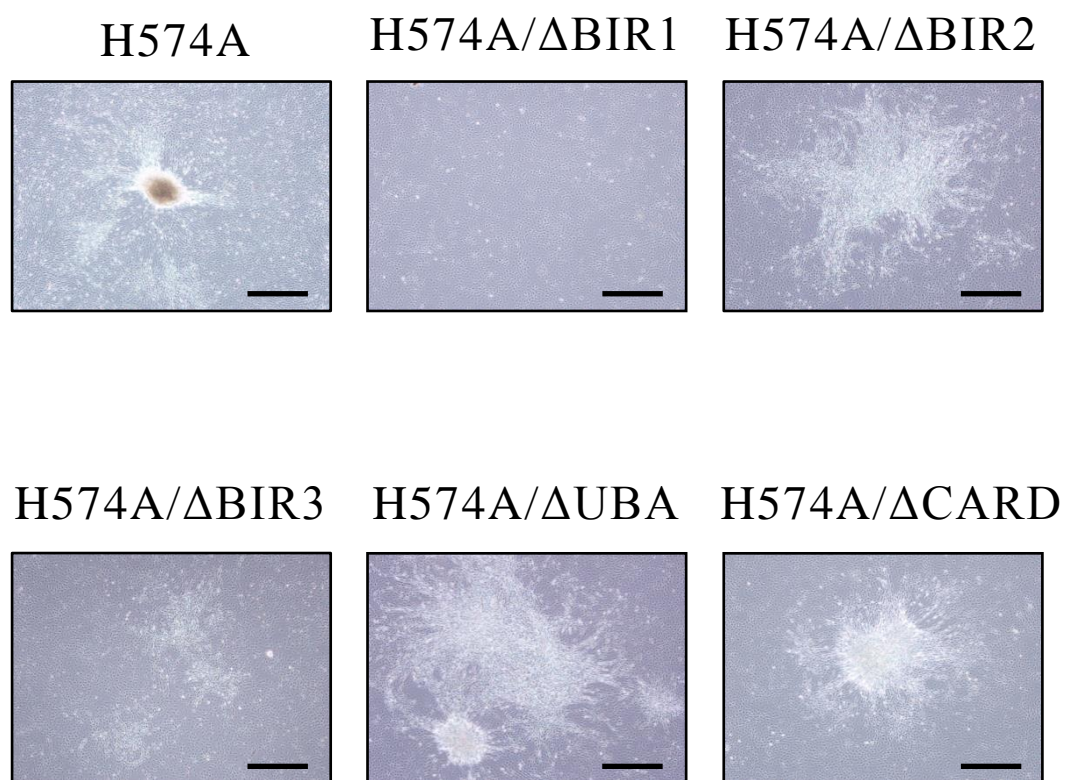


図 7 BIRC3 (H574A) で RING 以外のドメインの形質転換能への寄与

BIRC3(H574A)、H574A/ Δ BIR1、H574A/ Δ BIR2、H574A/ Δ BIR3、H574A/ Δ UBA、H574A/ Δ CARD cDNA を pMXs プラスミドに挿入して NIH3T3 細胞に感染させ 14 日後に形質転換フォーカスの評価をした。スケールバーは 100 μ m。

BIRC3 変異の形質転換能と NF- κ B 活性

NF- κ B は canonical と non-canonical の二つの経路により活性化される [20,21]。Canonical 経路においては inhibitor of NF- κ B (I κ B) が I κ B kinase (IKK) β 、NF- κ B essential modulator (NEMO)、receptor interacting protein (RIP) 1 を含む複合体によりリン酸化を受け、それに引き続き RelA/p50 の二量体が核内移行し標的遺伝子の転写調節を行う。一方、non-canonical 経路の活性化は NIK と IKK α の活性化に依存しそれに引き続いて p100 が p52 へと限定分解をうける。生じた p52 は RelB と二量体を形成し核内へ移行し、標的遺伝子の転写調節を行う。c-IAPs は RIP1 と NIK をユビキチン化することで canonical 経路の活性化だけでなく non-canonical 経路の非活性化に関わっていることが知られている [22,23,24]。BIRC3 (H574A) および BIRC3-MALT1 融合タンパクが NF- κ B の活性化によりマウスの B 細胞と NIH3T3 細胞をそれぞれ形質転換させることが報告されている [25,26]。我々は BIRC3 変異体の形質転換能と NF- κ B 活性化能との関係を調べるために、野生型およびドメイン欠損変異体を含む各種変異型の BIRC3 を HEK293 細胞に発現させ NF- κ B レポーターアッセイを行った。その結果興味深いことに、BIRC3 (E358X) が野生型 BIRC3 と比べて NF- κ B 活性に影響を及ぼさないことがわかった。一方 BIRC3 (H574A) は既報の通り明瞭に NF- κ B 活性を誘導した。BIRC3 (H574A) をバックボーンとして更に各ドメ

インを内部欠失させた変異群では BIR2 および CARD ドメインの欠失は NF- κ B 活性に大きな影響を与えないが BIR3 と UBA ドメインを欠失させると大きく活性が下がり、BIR1 ドメインの欠失では NF- κ B の上昇が完全に消失した。BIRC3 (H574A) において UBA ドメインの消失が形質転換能に影響を与えない一方で NF- κ B の活性化をほぼ打ち消してしまうことから BIRC3 の形質転換能と NF- κ B 誘導能は直接的には関係していないことが示唆された (図 8)。

しかし、野生型の NIK に形質転換活性があること [27] と BIRC3 のユビキチンリガーゼ活性が NF- κ B の canonical 経路を活性化する一方で non-canonical 経路を抑制することを考えると、BIRC3 (E358X) においては canonical 経路の抑制と non-canonical 経路の活性化の影響が相殺し、野生型と変わらない程度の NF- κ B 活性になっていることも考えられる。後者の non-canonical 経路の活性化が形質転換能を制御している可能性を検討するため、NIK を標的とする shRNA を恒常的に発現する NIH3T3 細胞を作成しその細胞で focus formation assay を行うこととした。マウス NIK の shRNA あるいは control-shRNA の配列を組み込んだレンチウイルスベクターを感染させ安定導入株を樹立し (NIK-sh-3T3 細胞・Ctl-sh-3T3 細胞)、NIK タンパクの発現抑制をウェスタンブロットで確認した (図 9A) また、NIK-sh-3T3 細胞ではマウス NIK のレトロウイルスベクターを感染させた際の形質転換能が抑制さ

れることも確認した（図 9B）。これらの NIH3T3 細胞および正常の NIH3T3 細胞に、さらに空ベクター（Mock）、野生型の BIRC3、BIRC3（E358X）あるいは BIRC3（H574A）を発現するレトロウイルスのいずれかを感染させ focus formation assay を行った。その結果、NIK-sh-3T3 細胞でも BIRC3（E358X）、BIRC3（H574A）の感染により Ctl-sh-3T3 細胞にくらべ大きさは小さく数も少ないものの形質転換フォーカスが形成された（図 10）。

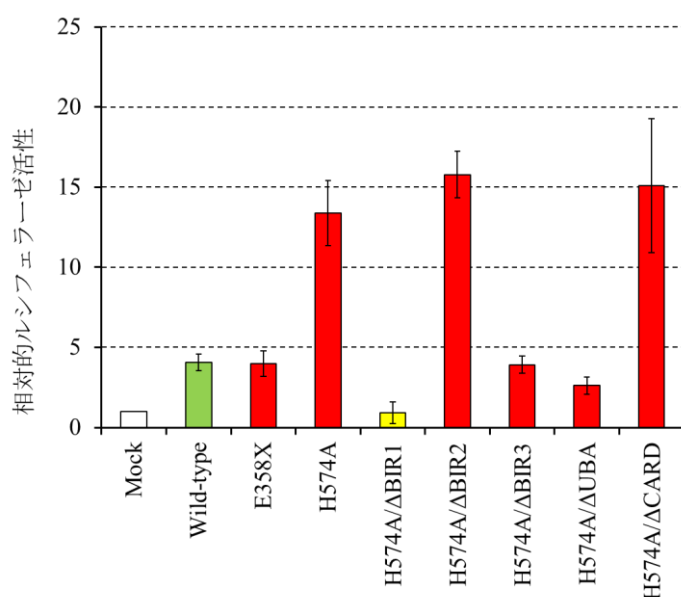
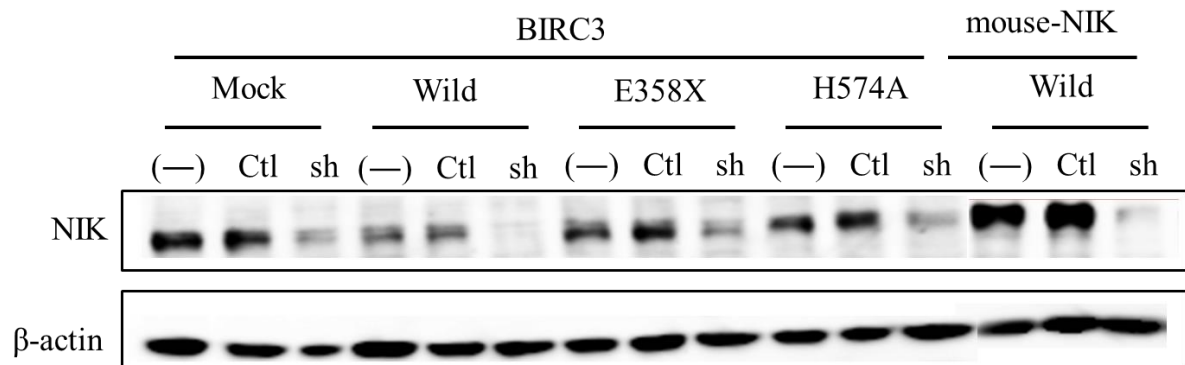


図 8 BIRC3 変異の NF- κ B 活性誘導能

HEK293 細胞に BIRC3 の野生型 (Wild-type)、E358X 変異、BIRC3(H574A)、H574A/ΔBIR1、H574A/ΔBIR2、H574A/ΔBIR3、H574A/ΔUBA、H574A/ΔCARD のいずれかの発現プラスミドあるいは空ベクター (Mock) を NF- κ B レポータープラスミド (ホタルルシフェラーゼ)、pGL4.70 (レニラルルシフェラーゼ) と共にトランスフェクションした。グラフはそれぞれのサンプルのホタルルシフェラーゼ活性をレニラルルシフェラーゼ活性で正規化した値 (平均値 \pm 標準偏差) を示す。緑は野生型、赤は形質転換フォーカスを形成した変異、黄色は形成しなかった変異を表す。

A



B

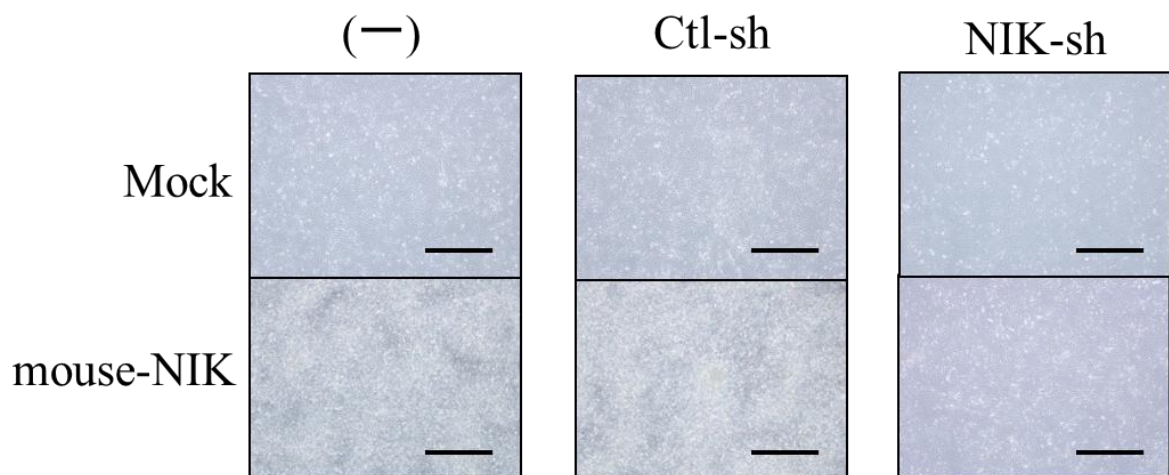


図 9 NIK-shRNA 恒常発現 NIH3T3 細胞の作製

A, コントロールおよびマウス *NIK* を標的とする shRNA を pLKO.1puro レンチウイルスベクターに挿入し、産生したレンチウイルスを NIH3T3 細胞に感染させた。2 週間のピューロマイシンで恒常発現株を選択した。選択した細胞にさらに、空ベクター(Mock)またはマウス *NIK* を挿入した pMXs より産生したレトロウイルスを感染させた。その 3 日後に *NIK* の発現をウエスタンブロットで確認した。

B, A で二重感染を行った同じ NIH3T3 を 14 日後に形質転換フォーカスの評価をした。スケールバーは 100 μm 。

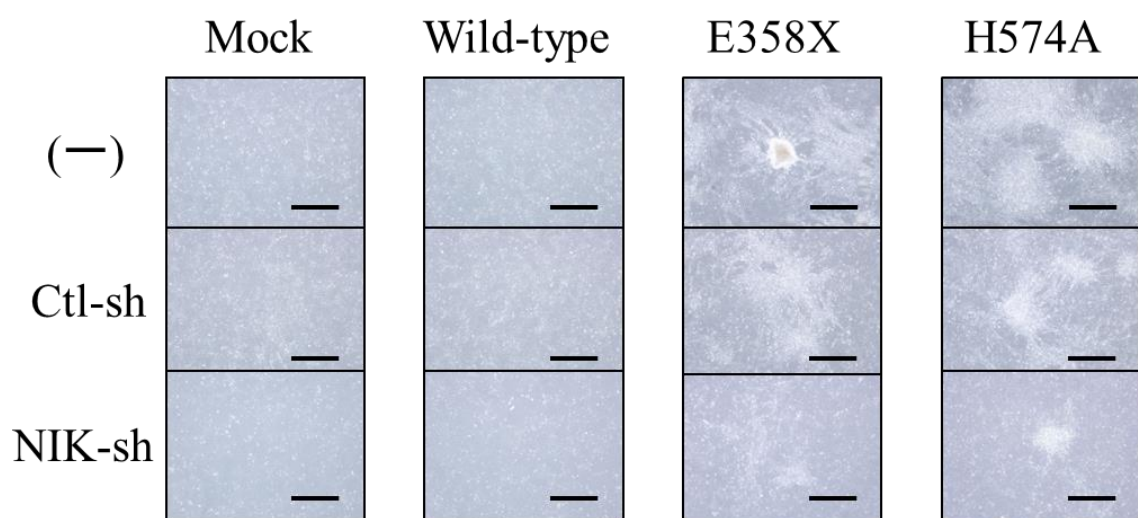


図 10 NIK ノックダウンによる BIRC3 ユビキチンリガーゼ失活変異の形質転換能への影響

図 9A で作製した NIK-sh-3T3、Ctl-sh-3T3 および正常の NIH3T3 細胞に図 6 と同様にして空ベクター (Mock)、野生型 BIRC3、BIRC3 (E358X)、BIRC3 (H574A) のいずれかを感染させた。14 日後に形質転換フォーカスの評価を行った。スケールバーは 100 μm 。

BIRC3 のその他の変異の機能解析

さまざまながんゲノム変異データベース

COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>)

CCLC (<http://www.broadinstitute.org/ccle>)

TCGA (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/tcgaHome2.jsp>)

ICGC (<http://icgc.org>) および既報の論文で BIRC3 の非同義変異を検索した。その結果 22 のアミノ酸変異 (表 3、図 11) と t(11;18)(q21;q21) 転座による *BIRC3-MALT1* 融合タンパクが検出された [19]。

それらの形質転換能を調べるため、各変異体発現レトロウイルスを作成し NIH3T3 細胞に感染・発現させた。するとユビキチンリガーゼ活性を失ったものは全て形質転換能を持っており、RING ドメイン以外の変異では BIRC3 (C319Y) のみに唯一形質転換能を認めた。その他の変異には形質転換能を認めなかった (図 12A)。C319Y 変異は BIR3 ドメインの機能として重要と考えられる金属イオンと結合する部位のアミノ酸置換であり [17] BIR3 ドメインの機能変化を介し形質転換を起こしている可能性が示唆された。しかし、形質転換能を持った変異に対して続けて施行したヌードマウスによる造腫瘍性試験ではユビキチンリガーゼ活性を失う変異は全て腫瘍を形成したのに対して BIRC3 (C319Y) は腫瘍を形成しなかった (図 12B)。

また同定した変異全てにおいて NF- κ B リポーターアッセイも施行した。

その結果 UBA ドメインを保ち、かつユビキチンリガーゼ欠失変異では BIRC3 (H574A) と同程度に NF- κ B を活性化したが UBA ドメインと RING ドメインの両者を失うような変異では野生型と同程度の軽度活性化を認めるのみであり、H574A のドメイン欠失変異体実験から得られた結果と矛盾しなかった。なお RING ドメインと関係しない変異は NF- κ B の活性化に影響を与えなかった (図 13)。

塩基置換	アミノ酸変異	原発巣	体細胞変異の確認	出典
c.20G>T	p.S7I	大腸	有	COSMIC
c.515G>T	p.R172I	大腸	有	COSMIC
c.743C>G	p.S248C	卵巣	有	COSMIC
c.832A>C	p.S278R	大腸	有	COSMIC
c.890G>A	p.G297D	Skin	有	COSMIC
c.956G>A	p.C319Y	脾臓 (悪性リンパ腫)	無	Rossiら (2011)
c.1072G>T	p.E358X	肺	無	CCLE
c.1101_1132del32	p.G367fsX6	白血病	有	Rossiら (2011)
c.1102G>T	p.E368X	大腸	有	COSMIC
c.1183_1352del170	p.V395fsX6	白血病	有	Rossiら (2011)
c.1270G>T	p.E424X	白血病	有	Rossiら (2011)
c.1279_1280insA	p.I427fsX11	白血病	有	Rossiら (2011)
c.1283_1287delGGGAA	p.R428fsX8	脾臓 (悪性リンパ腫)	有	Rossiら (2011)
c.1463C>T	p.R448Q	大腸	有	COSMIC
c.1414G>A	p.G472R	大腸	有	COSMIC
c.1463C>T	p.T488M	大腸	有	COSMIC
c.1607C>G	p.T536R	卵巣	有	COSMIC
c.1606delA	p.T536fsX32	白血病	有	Rossiら (2011)
c.1636G>T	p.E546X	脾臓 (悪性リンパ腫)	有	Rossiら (2011)
c.1638_1639insA	p.Q547fsX12	白血病	有	Rossiら (2011)
c.1639delC	p.Q547fsX21	脾臓 (悪性リンパ腫)	有	Rossiら (2011)
c.1663_1666delAGAA	p.R555fsX12	白血病	有	Rossiら (2011)
c.1690G>T	p.E564X	脾臓 (悪性リンパ腫)	有	Rossiら (2011)

表 3 既報およびデータベース上でみられた BIRC3 の変異

既知の論文および ICGC、TCGA、COSMIC、CCLE、で BIRC3 の変異を検索した結果を表示 (2012 年 10 月時) ここで示したものの他に t(11;18)(q21;q21)転座による *BIRC3-MALT1* 融合タンパクが知られている。

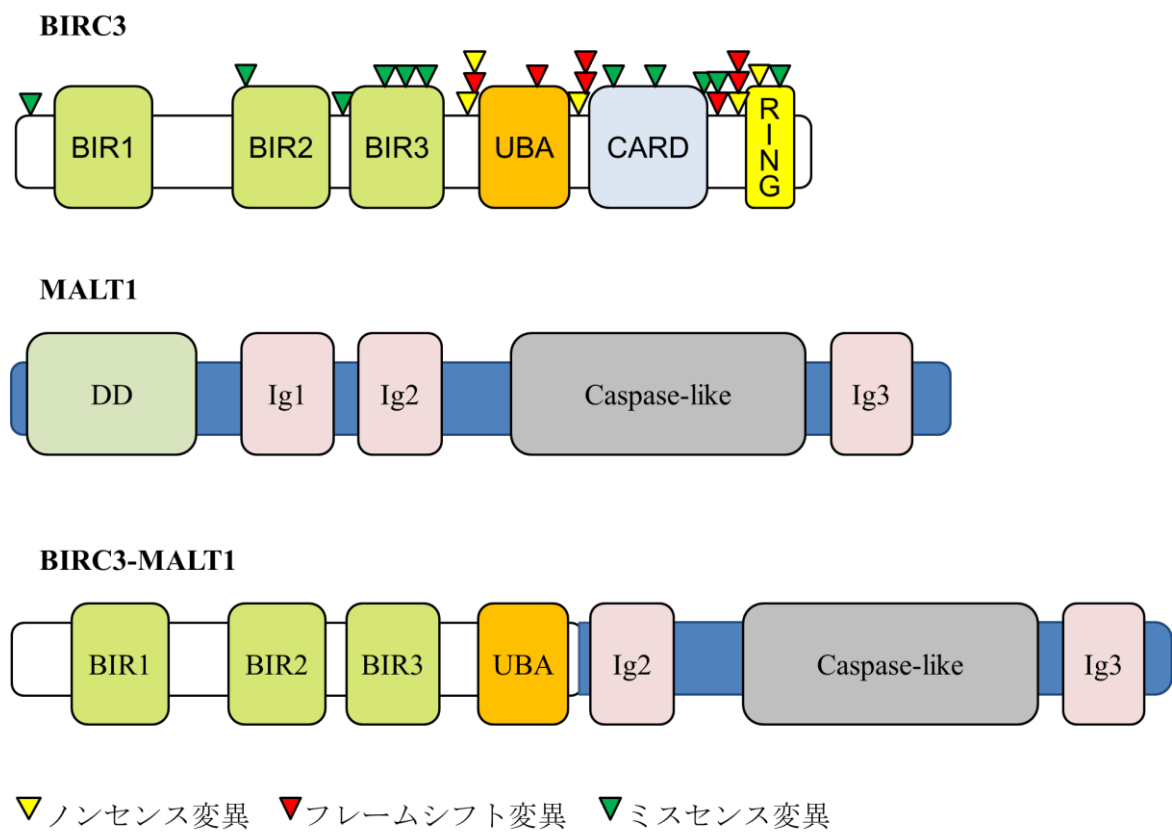
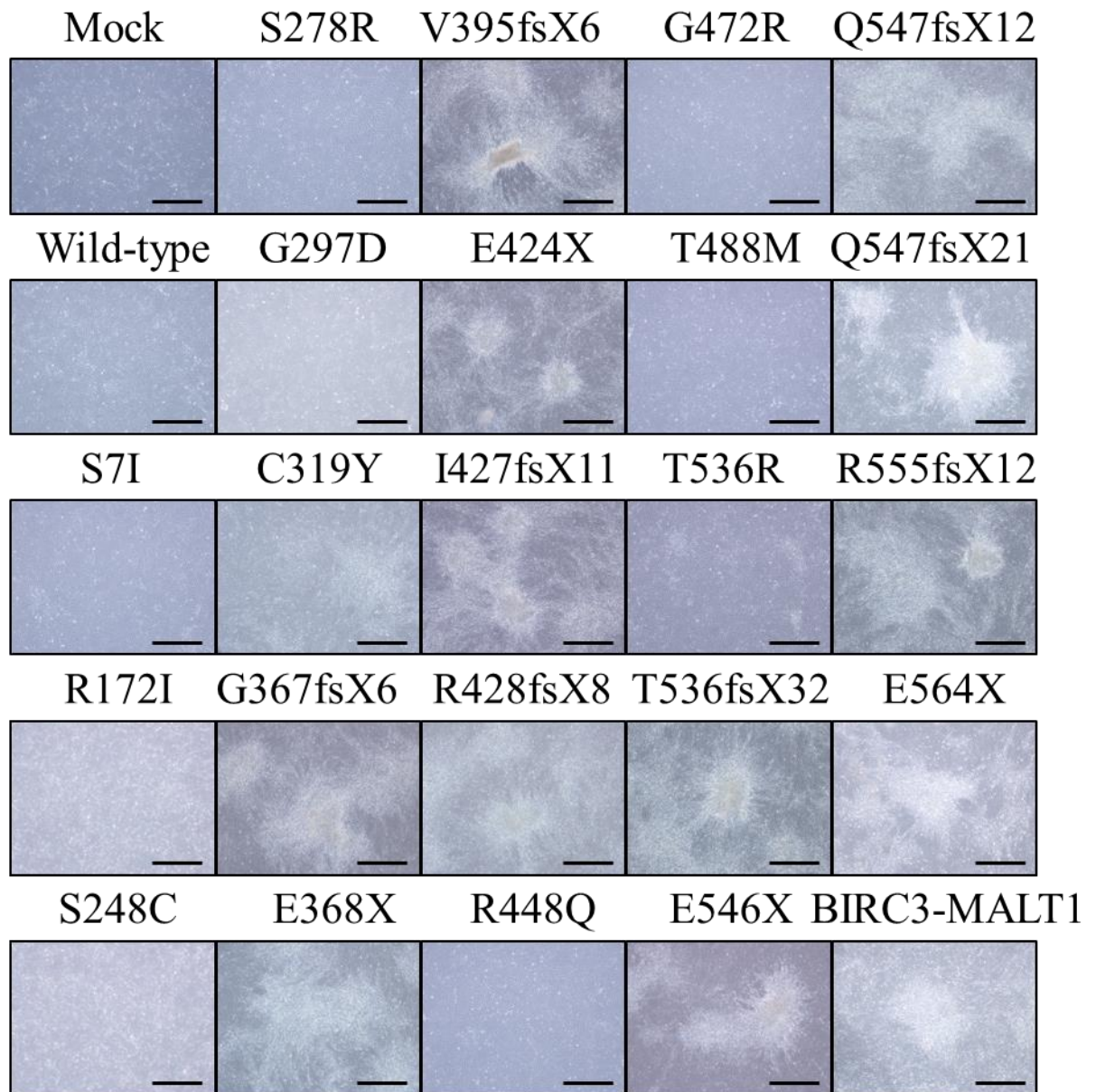


図 11 既報およびデータベース上でみられた **BIRC3** の変異
表 2 で示した変異と **BIRC3-MALT1** 融合遺伝子の概要を図示する。
BIRC3-MALT1 融合遺伝子は切断点が異なるものがあるが今回の実験
で使用したものを示す。

A



B

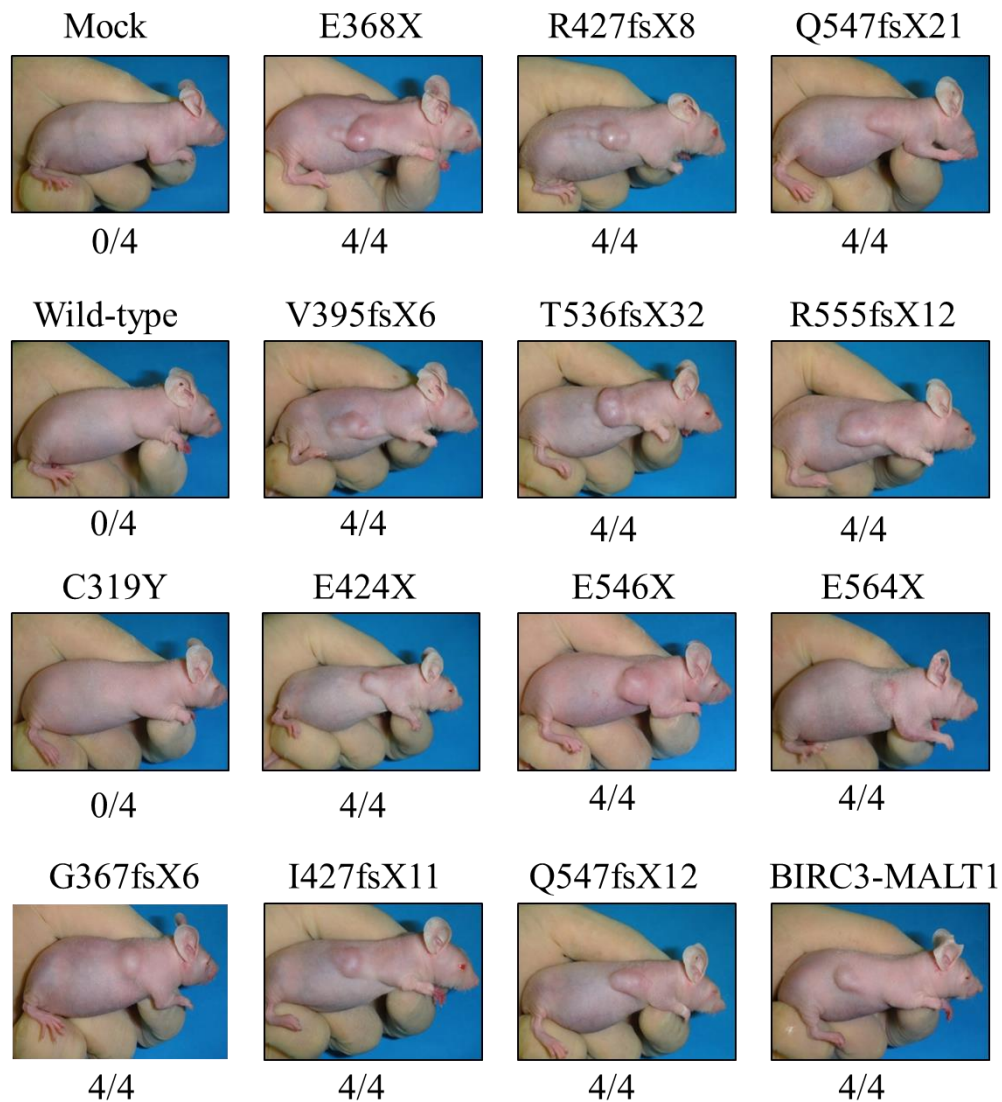


図 12 BIRC3 の既報及びデータベース上でみられた変異の形質転換能

A, ブランクベクター (pMXs) ならびに BIRC3 の野生型 (Wild-type)、表 2 に示した変異型、BIRC3-MALT1、cDNA を pMXs レトロウイルスベクターに挿入し、NIH3T3 細胞に感染させた。14 日後に形質転換フォーカスの評価をした。スケールバーは 100 μ m。

B, ブランクベクター (pMXs) ならびに BIRC3 の野生型 (Wild-type)、及び A で形質転換フォーカスを形成した変異に関して同じ感染 NIH3T3 細胞をヌードマウスに接種し 35 日後に腫瘍形成の有無を判定した下にヌードマウスへの NIH3T3 細胞接種箇所数と、そのうち何カ所に腫瘍が形成されたかを腫瘍個数/接種箇所数で示す。

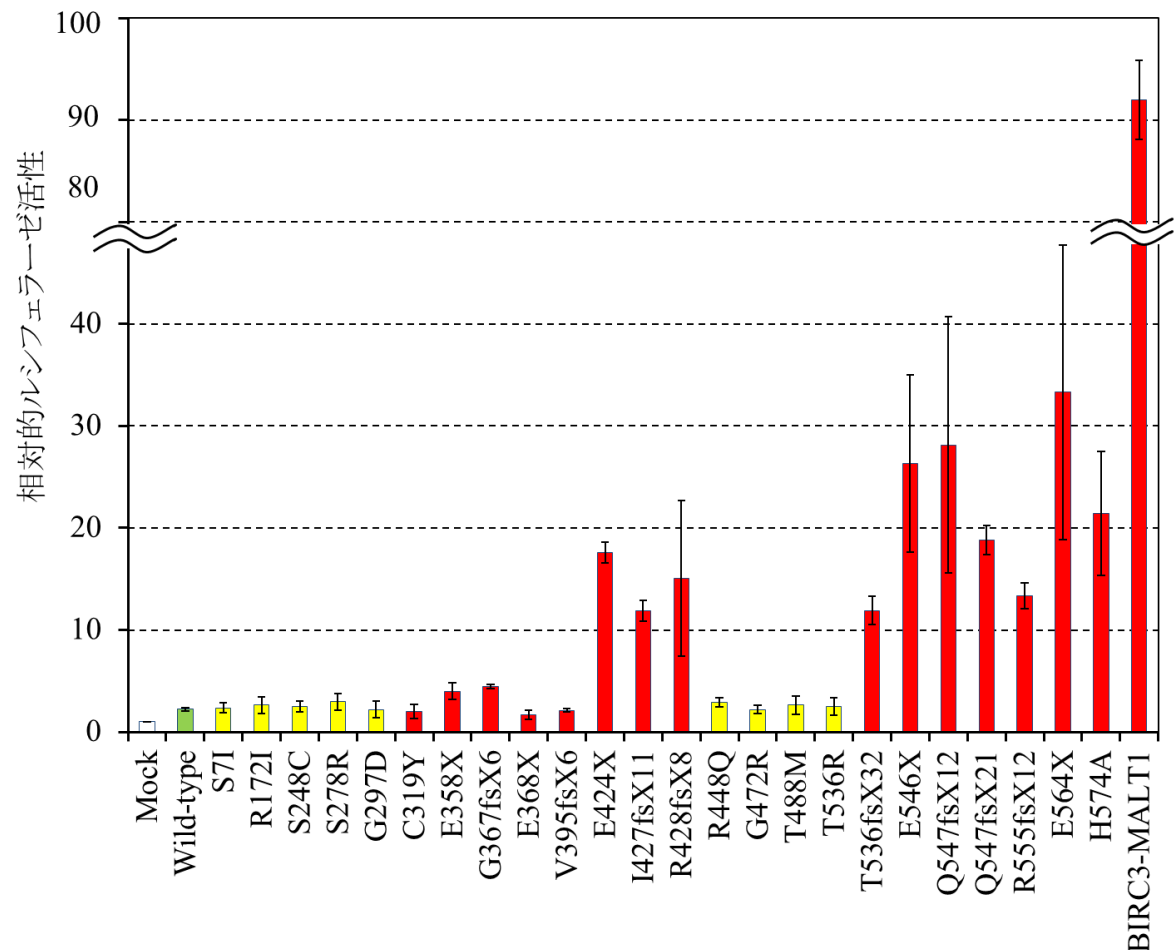


図 13 BIRC3 の各種変異での NF- κ B 活性誘導能

HEK293 細胞に BIRC3 の野生型 (Wild-type)、E358X 変異、H574A、表 2 の変異、BIRC3-MALT1 のいずれかの発現プラスミドあるいは空ベクター (Mock) を NF- κ B レポータープラスミド (ホタルルシフェラーゼ)、pGL4.70 (レニラルシフェラーゼ) と共にトランスフェクションした。グラフはそれぞれのサンプルのホタルルシフェラーゼ活性をレニラルシフェラーゼ活性で正規化した値 (平均値 \pm 標準偏差) を示す。緑は野生型、赤は形質転換フォーカスを形成した変異、黄色は形成しなかった変異を表す。

BIRC2 と BIRC3 の機能の重複

BIRC2、BIRC3 それぞれの単独のノックアウトマウスには表現型の異常を認めない〔28,29〕一方で BIRC3 (H574A) をノックインしたマウスでは NF- κ B の non-canonical 経路の恒常的な活性化がみられ、リンパ組織の腫大化、T 細胞・B 細胞の過剰増殖化がみられる〔25〕。これらの事実より BIRC2 と BIRC3 はユビキチンリガーゼの基質が相互に重複的であると考えられている。この機能の重複性が形質転換能でもみられるかを調べる目的で、BIRC3 (H574A) と相同な変異体である BIRC2 (H588A) をコードするレトロウイルスベクターを作成した。また BIRC3 と同様に BIRC2 での報告されている変異でかつユビキチンリガーゼ活性をなくすような変異を検索したところ 7 種類の変異が見つかった (表 4、図 14)。そのためこれら変異体のレトロウイルスも作製し 3T3 focus formation assay 及び NF- κ B レポーターアッセイを行った。その結果、BIRC2 (K19fsX3) を除く 6 つの変異で形質転換能が確認された (図 15)。一方 NF- κ B 活性については、BIRC2 (K442fsX10) が比較的強く活性化したがその他の変異では野生型より弱い誘導能しか確認できなかった (図 16)。これらの結果から、形質転換能に関しては BIRC2 と BIRC3 の間に重複性を認め、BIRC2 の変異体でも NF- κ B の活性化は形質転換能に必須ではないことが示唆された。さらに BIRC3 と同様に、BIRC2 (H588A) をレトロウイルスで NIK-sh-3T3、Ctl-sh-3T3、

正常 NIH3T3 細胞に感染させたところ、NIK-sh-3T3 においても形質転換フォーカスの形成が認められた（図 17）。

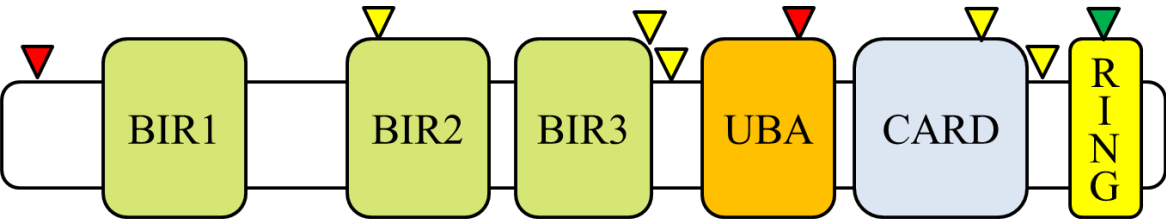


図 14 BIRC2 タンパクの構造・機能解析に使用した変異の模式図
 BIRC2 タンパクの模式図と解析に使用した変異のまとめ。表 2 の変異に人工的なユビキチンリガーゼ失活型変異である H588A が加わっている。

塩基置換	アミノ酸変異	原発巣	体細胞変異の確認	出典
c.55_55delA	p.K19fsX3	胃	無	CCLE
c.605C>G	p.S202X	乳房	有	COSMIC
c.1012C>T	p.R338X	胃	無	CCLE
c.1082C>G	p.S361X	肺	無	CCLE
c.1318_1319insA	p.R442fsX10	子宮体部	無	CCLE
c.1588G>T	p.E530X	大腸	無	CCLE
c.1702G>T	p.E568X	子宮体部	無	CCLE

表 4 データベース上にある BIRC2 のユビキチンリガーゼ欠損型変異
 BIRC3 と同様にデータベースで変異を検索、そのうちで RING ドメインを失うノンセンス変異・フレームシフト変異を表に示す。

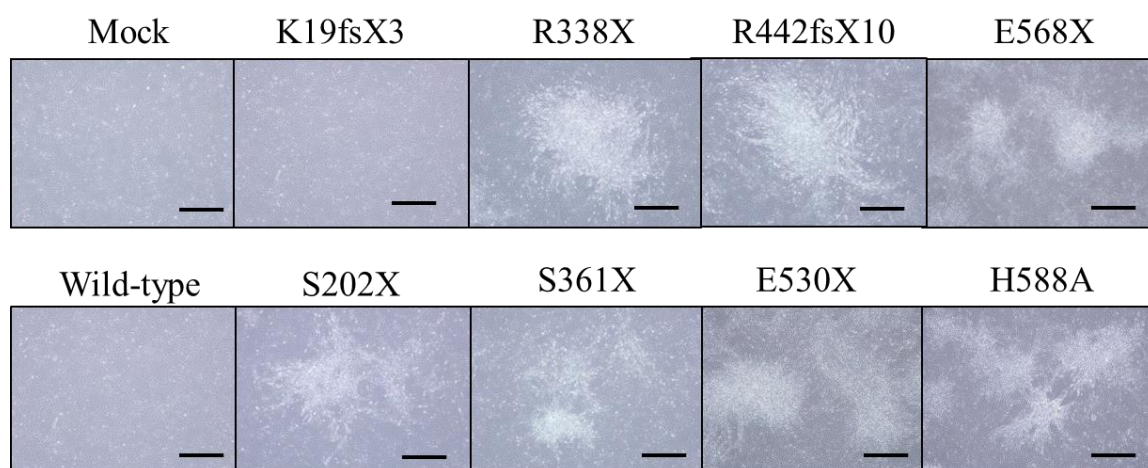


図 15 BIRC2 ユビキチンリガーゼ失活変異の形質転換能

ブランクベクター (pMXs) ならびに BIRC2 の野生型 (Wild-type) 人為的ユビキチンリガーゼ失活変異型 (H588A)、表 4 に示した変異型 cDNA を pMXs レトロウイルスベクターに挿入し、NIH3T3 細胞に感染させた。14 日後に形質転換フォーカスの評価をした。

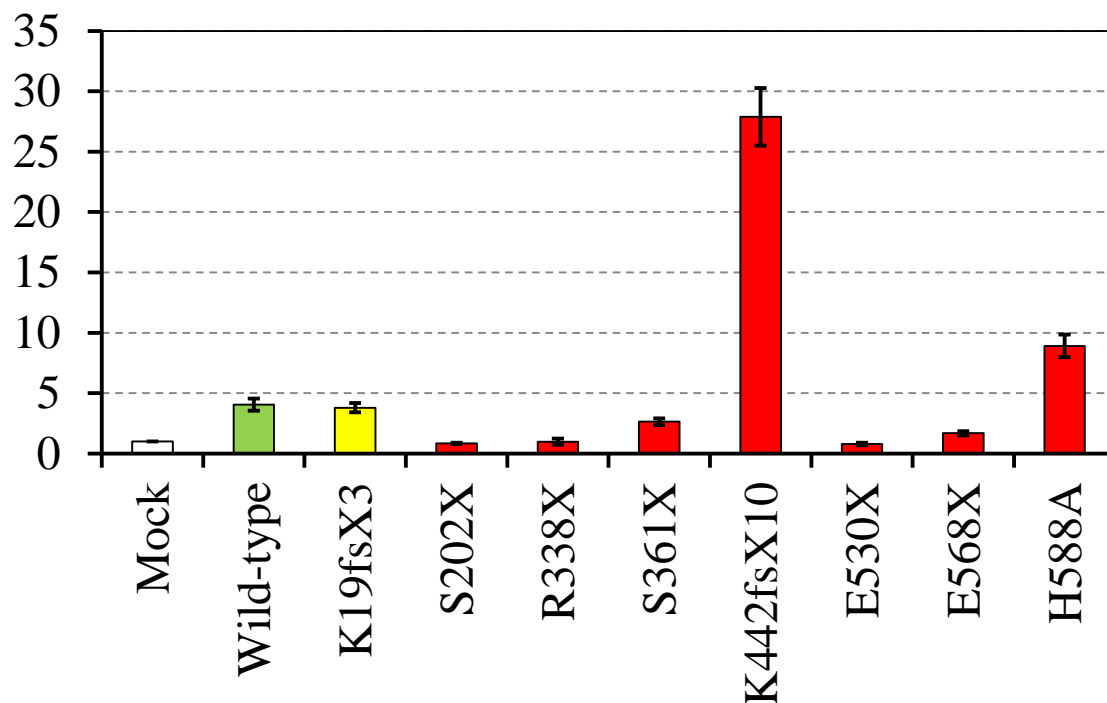


図 16 BIRC2 各種変異の変異の NF-κB 活性誘導能

HEK293 細胞に BIRC3 の野生型 (Wild-type)、H588A、表 3 の変異のいずれかの発現プラスミドあるいは空ベクター (Mock) を NF-κB レポータープラスミド (ホタルルシフェラーゼ)、pGL4.70 (レニラルシフェラーゼ) と共にトランスフェクションした。グラフはそれぞれのサンプルのホタルルシフェラーゼ活性をレニラルシフェラーゼ活性で正規化した値 (平均値±標準偏差) を示す。緑は野生型、赤は形質転換フォーカスを形成した変異、黄色は形成しなかった変異を表す。

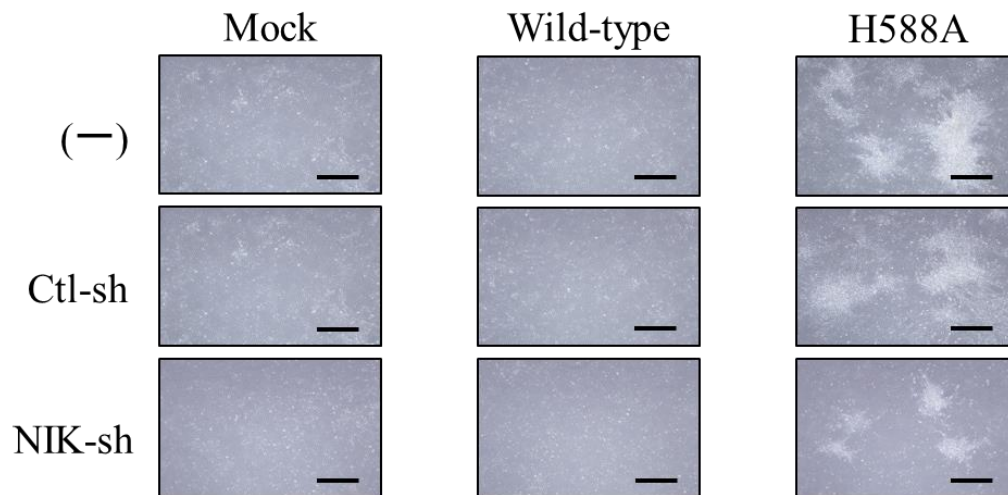


図 17 NIK ノックダウンによる BIRC2 ユビキチンリガーゼ失活変異の 形質転換能への影響

図 9A で作製した NIK-sh-3T3、Ctl-sh-3T3、正常の NIH3T3 細胞の 3 種に図 6A と同様の方法で空ベクター (Mock)、野生型 BIRC2 (Wild-type)、BIRC2(H588A)のいずれかを感染させた。14 日後に形質転換フォーカスの評価を行った。スケールバーは 100 μ m。

考察

我々は肺扁平上皮がん細胞株 H1703 より形質転換能をもつ BIRC3 変異を同定した。さらに、BIRC2 および BIRC3 は各種がんで様々な変異が報告されており、異なった形質転換能および NF- κ B 活性化能を有することが明らかになった。しかし基本的に両遺伝子ともに、ユビキチンリガーゼ活性の喪失は形質転換に寄与することが確認された。

一方、ドメイン欠失変異体実験により BIR1 ドメインが消失すると BIRC3 の形質転換能および NF- κ B 活性化能もなくなることからこのドメインがその両者に不可欠であることを示した。BIR3 ドメインも同様の傾向を示しはしたが、形質転換能・NF- κ B 活性化能ともに残存したことからユビキチンリガーゼ活性の欠失の影響を完全には打ち消してはいないものと考えられた。一方、UBA ドメインの欠失は形質転換能に影響を与えないものの NF- κ B の活性化を明瞭に減弱した。これは UBA ドメインが BIRC3 による NF- κ B 活性化に重要であるとする既報に矛盾しない。これらのことは BIRC3 変異による形質転換能には NF- κ B の活性化よりユビキチンリガーゼ活性の消失が本質的である事を支持している。さらに *NIK* を標的とした shRNA を恒常的に発現した NIH3T3 細胞でも形質転換が認めたことも、上記仮説を支持する。

また、BIRC2 においても K19fsX3 を除く変異体で形質転換能がみられたことから、BIR ドメインが残存し、かつユビキチンリガーゼ活

性欠損する変異では BIRC3 と同様に形質転換能があることが示された。しかし NF- κ B の活性化は BIRC2 (K442fsX10) を除き BIRC3 の変異と比較すると弱いものであった。この結果は c-IAPs のユビキチンリガーゼの基質に NF- κ B 経路と独立した腫瘍関連タンパクがあり、そのユビキチン化により通常では抗腫瘍的に働いているものが存在することを示唆する。

c-IAPs が NF- κ B を介さずに悪性形質転換能を持つという報告は本論文が初めてのものである。なお、NF- κ B の活性化に関しては、同様のユビキチンリガーゼ失活変異を持つ BIRC2、BIRC3 のノックインマウスを比較した Dietrich らの論文 [30] でも、B 細胞ではあるが BIRC3 のノックインでは NF- κ B の non-canonical 経路が活性化される一方、BIRC2 のノックインではそれが起こらないことが報告されており矛盾しない。我々の BIRC2 解析で唯一強く NF- κ B の活性化を起こした E440fsX10 変異体については、変異部位が丁度 UBA ドメイン上でありフレームシフト後の短いアミノ酸がユビキチンとの相互作用を変化させた結果、NF- κ B の強い活性化をもたらしたものと考えられる。

一方、Dietrich らの論文では BIRC3(H574A)のノックインマウスではリンパ系を除く臓器の表現型に異常を認めないとしており、本論文の NIH3T3 細胞で形質転換を生じるという結果と矛盾する。しかし、これは調節領域の違いにより説明されうると考える。我々の実験ではヒト

由来の c-IAPs を Moloney マウス白血病ウイルス由来の調節領域を持つレトロウイルスベクターに組み込んだ一方で Dietrich らの論文では c-IAPs をその調節領域を相同組み替えにより組み込んでいる。そのためノックインマウスでは上皮系での発現が少なく、変異が組み込まれていない側により機能が補われた可能性がある。

正常細胞における IAP のアンタゴニストとして生体内では second mitochondria-derived activator of caspases (Smac) が存在する。近年その構造を模した低分子治療薬 Smac-mimetics が開発され抗腫瘍効果や他の抗がん剤との併用による増強効果があることが確認されている [31]。Smac-mimetics の作用機序としては主として c-IAPs の分解をもたらすことであり、c-IAPs の枯渇は Ripoptosome の形成を介し pro-inflammatory サイトカインを pro-death シグナルへと変換し細胞死をもたらすことが明らかになってきた [31,32,33]。このため Smac-mimetics は抗がん剤として期待されており海外では臨床治験が行われているものもある。しかし、本論文の結果からは c-IAPs の機能喪失が NF- κ B の活性化による B 細胞系の異常以外にも発がんにつながる可能性を強く示唆するため、薬剤としての長期にわたる使用は細心の注意が必要と考えられる。

今後は各種のがんにおいて c-IAPs の変異が実際にどの程度みられるのかを確認していくと共に、ヒトの細胞に c-IAPs の変異を導入するこ

とが実際に腫瘍化をもたらすのか、さらに活性型 **BIRC2/3** 変異体と協同して発がんに寄与する変異遺伝子は何か、等の検討が必要と考えられる。さらに **c-IAPs** の標的タンパクを共免疫沈降法や **two-hybrid** 法などを用いて解析する予定である。

参考文献

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A “Cancer statistics, 2013” CA: a cancerjournal for clinicians 63: 11–30, 2013
2. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H. “EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib” Proc Natl Acad Sci 101:13306–13311, 2004
3. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, Mano H. “Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer” Nature 448:561–566, 2007
4. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Lim Choi Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y. “RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer” Nat Med 18:378-381, 2012
5. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Sakamoto H, Tsuta K, Furuta K, Shimada Y, Iwakawa R, Ogiwara H,

- Oike T, Enari M, Schetter AJ, Okayama H, Haugen A, Skaug V, Chiku S, Yamanaka I, Arai Y, Watanabe S, Sekine I, Ogawa S, Harris CC, Tsuda H, Yoshida T, Yokota J, Shibata T. “KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma” *Nature medicine*18:375–377, 2012
6. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. “Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib” *N Engl J Med* 350:2129–2139, 2004
 7. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, Palmero R, Garcia-Gomez R, Pallares C, Sanchez JM, Porta R, Cobo M, Garrido P, Longo F, Moran T, Insa A, De Marinis F, Corre R, Bover I, Illiano A, Dansin E, de Castro J, Milella M, Reguart N, Altavilla G, Jimenez U, Provencio M, Moreno MA, Terrasa J, Muñoz-Langa J, Valdivia J, Isla D, Domine M, Molinier O, Mazieres J, Baize N, Garcia-Campelo R, Robinet G, Rodriguez-Abreu D, Lopez-Vivanco G, Gebbia V, Ferrera-Delgado L, Bombaron P, Bernabe R, Bearz A, Artal A, Cortesi E, Rolfo C, Sanchez-Ronco M, Drozdowskyj A, Queralt C, de Aguirre I, Ramirez JL, Sanchez JJ, Molina MA, Taron M, Paz-Ares L;

- Spanish Lung Cancer Group in collaboration with Groupe Français de Pneumo-Cancérologie and Associazione Italiana Oncologia Toracica. “Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial” *The lancet oncology* 13:239–246, 2012
8. Shaw AT, Yeap BY, Solomon BJ, Riely GJ, Gainor J, Engelman JA, Shapiro GI, Costa DB, Ou SH, Butaney M, Salgia R, Maki RG, Varella-Garcia M, Doebele RC, Bang YJ, Kulig K, Selaru P, Tang Y, Wilner KD, Kwak EL, Clark JW, Iafrate AJ, Camidge DR. “Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: A retrospective analysis” *Lancet Oncol* 12:1004–1012, 2011
 9. No authors are listed. “NCI-Navy Medical Oncology Branch Cell Line Supplement” *J. Cell. Biochem. suppl.* 24:1-291, 1996.
 10. Ueno T, Yamashita Y, Soda M, Fukumura K, Ando M, Yamato A, Kawazu M, Choi YL, Mano H. “High-throughput resequencing of target-captured cDNA in cancer cells” *Cancer Sci.* 103(1):131-135, 2012
 11. Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K, Kitada S, Scudiero DA, Tudor G, Qui YH, Monks A, Andreeff M, Reed JC.

- “Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias” *Clin Cancer Res* 6(5):1796-1803, 2000
12. Beug ST, Cheung HH, Lacasse EC, Korneluk RG. “Modulation of immunesignalling by inhibitors of apoptosis” *Trends Immunol* 33:535–545, 2012
 13. Shih VF, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A. “A single NFκB system for both canonical and non-canonical signaling” *Cell Res.* 21(1):86-102, 2011
 14. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, Schop R, Baker A, Chng WJ, Van Wier S, Tiedemann R, Shi CX, Sebag M, Braggio E, Henry T, Zhu YX, Fogle H, Price-Troska T, Ahmann G, Mancini C, Brents LA, Kumar S, Greipp P, Dispenzieri A, Bryant B, Mulligan G, Bruhn L, Barrett M, Valdez R, Trent J, Stewart AK, Carpten J, Bergsagel PL. “Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma” *Cancer Cell* 12:131–144, 2007
 15. Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, Bellamy W, Gabrea A, Zhan F, Lenz G, Hanamura I, Wright G, Xiao W, Dave S, Hurt EM, Tan B, Zhao H, Stephens O, Santra M, Williams DR, Dang L, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr, Kuehl WM, Staudt LM. “Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic

abnormalities in multiple myeloma” *Cancer Cell* 12:115–130, 2007

16. Braggio E, Keats JJ, Leleu X, Van Wier S, Jimenez-Zepeda VH, Valdez R, Schop RF, Price-Troska T, Henderson K, Sacco A, Azab F, Greipp P, Gertz M, Hayman S, Rajkumar SV, Carpten J, Chesi M, Barrett M, Stewart AK, Dogan A, Bergsagel PL, Ghobrial IM, Fonseca R. “Identification of copy number abnormalities and inactivating mutations in two negative regulators of nuclear factor-kappaB signaling pathways in Waldenstrom’s macroglobulinemia” *Cancer Res.* 69:3579–3588, 2009
17. Rossi D, Deaglio S, Dominguez-Sola D, Rasi S, Vaisitti T, Agostinelli C, Spina V, Bruscaggin A, Monti S, Cerri M, Cresta S, Fangazio M, Arcaini L, Lucioni M, Marasca R, Thieblemont C, Capello D, Facchetti F, Kwee I, Pileri SA, Foà R, Bertoni F, Dalla-Favera R, Pasqualucci L, Gaidano G. “Alteration of BIRC3 and multiple other NFkappaB pathway genes in splenic marginal zone lymphoma” *Blood* 118, 4930–4934, 2011
18. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S, Chiaretti S, Del Giudice I, Fabbri G, Bruscaggin A, Spina V, Deambrogi C, Marinelli M, Famà R, Greco M, Daniele G, Forconi F, Gattei V, Bertoni F, Deaglio S, Pasqualucci L, Guarini A, Dalla-Favera R, Foà R, Gaidano G. “Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia”

Blood 119:2854–2862, 2012

19. Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I, Stefanova-Ouzounova M, Hernandez JM, Hossfeld DK, De Wolf-Peeters C, Hagemeijer A, Van den Berghe H, Marynen P. “The apoptosis inhibitor gene AP12 and anovel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas” Blood 93:3601–3609, 1999
20. Perkins, N. D. “Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function” Nature Rev. Mol. Cell Biol 8:49–62, 2007
21. Bonizzi G, Bebien M, Otero DC, Johnson-Vroom KE, Cao Y, Vu D, Jegga AG, Aronow BJ, Ghosh G, Rickert RC, Karin M. “Activation of IKK α target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers” EMBO J. 23:4202–4210, 2004
22. Bertrand MJ, Milutinovic S, Dickson KM, Ho WC, Boudreault A, Durkin J, Gillard JW, Jaquith JB, Morris SJ, Barker PA. “cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination” Mol. Cell 30:689–700, 2008
23. Vallabhapurapu S, Matsuzawa A, Zhang W, Tseng PH, Keats JJ, Wang H, Vignali DA, Bergsagel PL, Karin M. “Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that

- activates NIK-dependent alternative NF- κ B signaling” *Nature Immunol.* 9:1364–1370, 2008
24. Zarnegar BJ, Wang Y, Mahoney DJ, Dempsey PW, Cheung HH, He J, Shiba T, Yang X, Yeh WC, Mak TW, Korneluk RG, Cheng G. “Noncanonical NF- κ B activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK” *Nature Immunol.* 9: 1371–1378, 2008
 25. Dietrich B. Conze, Yongge Zhao, Jonathan D. Ashwell. “Non-canonical NF-kappaB activation and abnormal B cell accumulation in mice expressing ubiquitin protein ligase-inactive c-IAP2” *PLoS Biol.* 8(10):e1000518, 2010
 26. Stoffel A, Chaurushiya M, Singh B, Levine AJ. “Activation of NF-kappaB and inhibition of p53-mediated apoptosis by API2/mucosa-associated lymphoid tissue 1 fusions promote oncogenesis” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(24):9079-9084, 2004
 27. Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, Sugimoto H, Martinez Bruyn VJ, Iwasaki Y, et al. Overexpressed NF-kappaB-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood* 111:5118–5129, 2008
 28. Conze DB, Albert L, Ferrick DA, Goeddel DV, Yeh WC, Mak T, Ashwell

- JD. “Posttranscriptional downregulation of c-IAP2 by the ubiquitin protein ligase c-IAP1 in vivo” *Mol Cell Biol* 25: 3348–3356, 2005
29. Conte D, Holcik M, Lefebvre CA, Lacasse E, Picketts DJ, Wright KE, Korneluk RG. “Inhibitor of apoptosis protein cIAP2 is essential for lipopolysaccharide-induced macrophage survival” *Mol Cell Biol* 26: 699–708, 2006
30. Giardino Torchia ML, Conze DB, Ashwell JD. “c-IAP1 and c-IAP2 redundancy differs between T and B cells” *PLoS One* 8(6):e66161, 2013
31. Petersen SL, Wang L, Yalcin-Chin A, Li L, Peyton M, Minna J, Harran P, Wang X. “Autocrine TNF α signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis” *Cancer Cell* 12, 445–456, 2007
32. Vince JE, Wong WW, Khan N, Feltham R, Chau D, Ahmed AU, Benetatos CA, Chunduru SK, Condon SM, McKinlay M, Brink R, Leverkus M, Tergaonkar V, Schneider P, Callus BA, Koentgen F, Vaux DL, Silke J. “IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF α -dependent apoptosis” *Cell* 131, 682–693, 2007
33. Varfolomeev E, Blankenship JW, Wayson SM, Fedorova AV, Kayagaki N, Garg P, Zobel K, Dynek JN, Elliott LO, Wallweber HJ, Flygare JA, Fairbrother WJ, Deshayes K, Dixit VM, Vucic D. “IAP antagonists

induce autoubiquitination of c-IAPs, NF- κ B activation, and TNF α -dependent apoptosis". *Cell* 131, 669–681, 2007

謝辞

本研究を行うにあたりまして指導教員となってくださいました東京大学大学院医学系研究科 呼吸器内科学講座 長瀬隆英教授に深謝致します。また、本研究に際して直接ご指導してくださいました東京大学大学院医学系研究科 細胞情報学講座 間野博行教授、本研究の実験手法をご指導してくださいました東京大学大学院医学系研究科 ゲノム医学講座 山下義博特任准教授に深謝致します。