

平成 21 年 6 月 2 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19590388

研究課題名 (和文) ストレス環境下でのアポトーシス/オートファジー制御と癌の悪性化

研究課題名 (英文) Regulation of apoptosis and autophagy under stress conditions and cancer progression

研究代表者 井上 寛一 (INOUE HIROKAZU)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30176440

研究成果の概要：我々が分離した Drs 遺伝子は悪性腫瘍発生に癌抑制遺伝子として働く。本研究では、Drs ノックアウト細胞を用いて Drs が増殖因子枯渇などのストレス環境下でのアポトーシス (細胞死) やオートファジー (自食作用) の制御に関わっていることを明らかにした。また Drs はウイルス増殖抑制にも関与することを見出した。これらの結果から、Drs が発癌抑制だけでなく、もっと広く生体防御に重要な役割をはたしていることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：癌抑制遺伝子、アポトーシス、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

Drs は Sushi モチーフと呼ばれる構造と膜貫通ドメインを持つ新しいタイプの癌抑制遺伝子である。Drs は小胞体においてアポトーシス制御因子 ASY/Nogo-B/RTN と相互作用し、caspase-12, -9, -3 を活性化する新規の経路で種々のヒト癌細胞株にアポトーシスを誘導する。また、Drs ノックアウト (KO) マウスでは、その約 30% にリンパ腫、肺腺癌、肝癌などの悪性腫瘍が発生することから、Drs

が in vivo での癌発生に対しても抑制遺伝子として働いていると考えられる。癌の悪性化には低栄養、増殖因子の枯渇、低酸素などのストレス環境下での生存が必須であるが、ストレス環境下でのアポトーシス/オートファジー制御がこの過程に関わっていると考えられている。しかしながら、ストレス環境下での細胞生存と癌の悪性化との関連はまだ解明されていない部分が多い。

2. 研究の目的

本研究では、DrsKO マウスおよび DrsKO 細胞を用いた遺伝学的解析、および我々が同定した Drs 結合蛋白 (ASY, Rab24, GADD34 など) との相互作用の解析によって、Drs が関与するストレス環境下でのアポトーシス/オートファジーの制御が、癌の悪性化とどのように関わっているのかを分子レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

Drs KO マウスから調製した胎児繊維芽 (MEF) 細胞と野生型 Wild type (WT) MEF 細胞に血清 (増殖因子) 枯渇、エネルギー (グルコース) 飢餓、ウイルス感染など様々なストレスを与え、オートファジーやアポトーシスの誘導、ウイルス増殖などの応答を比較検討する。これらの細胞における、mTOR などのストレス応答に関わる経路の活性化を解析する。また、Drs と結合蛋白 (Rab24, GADD34 など) との相互作用を解析し、これらの分子がアポトーシスやオートファジー制御にどのように関わっているかを解析する。

4. 研究成果

(1) ATL リンパ腫組織および細胞株では高頻度で Drs 遺伝子の発現が消失していることを明らかにした。また、Drs 発現が消失している ATL 細胞株 HUT102 にレトロウイルスベクターにより Drs 遺伝子を導入し、低血清培地で培養するとアポトーシスが誘導されることを見出した。

(2) 低血清下で培養することによって誘導される autophagy を Drs KO MEF 細胞と WT MEF 細胞で比較検討することによって、Drs が autophagosome から autolysosome に移行する後期成熟過程の進行に関与していることを明らかにした。

(3) 新たな Drs 結合分子として autophagy 制

御に関与すると考えられている Rab24 と Rab7 分子を同定した。Rab24 はオートファジー誘導時に発現誘導され、Drs と結合し共局在化することを見出した。

(4) Drs 結合蛋白として同定したストレス応答蛋白 GADD34 は、グルコース飢餓やウイルス感染により誘導され、TSC2 蛋白と複合体を形成し、そのリン酸化を制御することで mTOR 経路を抑制し蛋白合成を抑制することを見出した。

(5) DrsKO 細胞は、グルコース飢餓条件ではアポトーシスを起こすことから、Drs がエネルギー枯渇下での細胞生存に関与していることを見出した。さらに、このアポトーシスは mTOR 阻害剤ラパマイシンによって抑制されること、また DrsKO 細胞では WT 細胞と異なりグルコース飢餓条件下でも mTOR 経路のシグナルが抑制されないことから、Drs は mTOR 経路の制御を介してこの過程に関与していることがわかった。

(6) DrsKO 細胞では VSV や HSV 感染によるウイルス増殖が WT 細胞に比べて顕著に促進されることを新たに見出した。このとき、DrsKO 細胞では蛋白合成に制御に関わる S6 蛋白のリン酸化が顕著に亢進していた。しかしながら、このウイルス増殖促進はラパマイシンによっては阻害されなかったこと、また mTOR の標的である S6K や 4EBP1 蛋白のリン酸化は WT と DrsKO 細胞とで違いは認められなかったことから、mTOR 以外のシグナル経路がこの現象にかかわっていることが考えられる。

以上の結果から、癌抑制蛋白 Drs が Rab24 や GADD34 との結合を介してストレス環境下でのアポトーシス/オートファジー制御に関与することが明らかになって来た。さらに、Drs はエネルギー枯渇条件化での細胞生存やウイ

ルス増殖制御にも関与することが明らかになってきた。これらの成果から、Drs の機能解析が癌の悪性の分子機構だけでなく、もっと広く生体防御機構の解明にも貢献することが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Isono, T., Kim, C. J., Ando, Y., Sakurai, H., Okada, Y., and Inoue, H. Suppression of cell invasiveness by periostin via TAB1/TAK1. *Int. J. Oncol.*, in press. 査読有
2. Tambe, Y., Yamamoto, A., Isono, T., Chano, T., Fukuda, M. and Inoue, H. The Drs tumor suppressor is involved in the maturation process of autophagy induced by low serum. *Cancer Letters*, in press. 査読有
3. Kim, C. J., Nishi, K., Isono, T., Okuyama, Y., Tambe, Y., Okada, Y., and Inoue, H. Cyclin D1b variant promotes cell invasiveness independent of binding to CDK in human bladder cancer cells. *Mol. Carcinog.*, in press. 査読有
4. Shimakage, M., Kodama, K., Kawahara, K., Kim, C. J., Ikeda, Y., Yutsudo, M., Inoue, H. Downregulation of drs tumor suppressor gene in highly malignant human pulmonary neuroendocrine tumors. *Oncol. Rep.* 21, 1367-1372, 2009. 査読有
5. Nishi, K., Inoue, H., Schnier, J. B., and Rice, R. H. Cyclin D1 downregulation is important for permanent cell cycle exit and initiation of differentiation induced by anchorage-deprivation in human keratinocytes. *J. Cell. Biochem.* 106, 63-72, 2009. 査読有
6. Fukumoto, K., Wang, B., Hikosaka, K., Noritake, H., Shibata, K., Inoue, H., Suzuki, A., Inaba, K., Sakaguchi, T., Suzuki, S., Konno, H. and Miura, N. Live imaging by time-lapse microscopy can more clearly evaluate the anti-apoptotic state of primary hepatocytes isolated from the Drs knockout mouse. *Akita J. Med.* 35, 231-237, 2008. 査読有
7. Kim, C. J., Isono, T., Tambe, Y., Chano, T., Okabe, H., Okada, Y. and Inoue, H. Role of alternative splicing of periostin in human bladder carcinogenesis. *Int. J. Oncol.* 32, 161-169, 2008. 査読有
8. Minami, K., Tambe, Y., Watanabe, R., Isono, T., Haneda, M., Isobe, K., Kobayashi, K., Hino, O., Okabe, H., Chano, T., Inoue, H. Suppression of viral replication by stress-inducible GADD34 protein via the mammalian serine/threonine protein kinase mTOR pathway. *J. Virol.* 81, 11106-11115, 2007. 査読有
9. Minami, K., Inoue, H., Terashita, T., Kawakami, T., Watanabe, R., Haneda, M., Isobe, K., Okabe, H. and Chano, T. GADD34 induces p21 expression and cellular senescence. *Oncol. Rep.* 7, 1481-1485,

2007. 査読有

10. Shimakage, M., Inoue, N., Oshima, K., Kawahara, K., Yamamoto, N., Oka, T., Tambe, Y., Yasui, K., Matsumoto, K., Yutsudo, M., and Inoue, H. Down-regulation of drs mRNA is associated with the progression of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int. J. Oncol.* 30,1343-1348, 2007. 査読有

11. Watanabe, R., Tambe, Y., Inoue, H., Isono, T., Haneda, M., Isobe, K., Kobayashi, T., Hino, O., Okabe, H. and Chano, T. GADD34 inhibits mammalian target of rapamycin signaling via tuberous sclerosis complex and controls cell survival under bioenergetic stress. *Int. J. Mol. Med.* 19, 475-483, 2007. 査読有

12. Tambe, Y., Yoshioka-Yamashita, A., Mukaisho, K., Haraguchi, S., Chano, T., Isono, T., Kawai, T., Suzuki, Y., Kushima, R., Hattori, T., Goto, M., Yamada, S., Kiso, M., Saga, Y. and Inoue, H. Tumor prone phenotype of mice deficient in a novel apoptosis-inducing gene, drs. *Carcinogenesis* 28, 777-784, 2007. 査読有

13. Kageyama, S., Iwaki, H., Inoue, H., Isono, T., Yuasa, T., Nogawa, M., Maekawa, T., Ueda, M., Kajita, Y., Ogawa, O., Toguchida, J. and Yoshiki, T. A novel tumor-related protein, C7orf24, identified by proteome differential display of bladder urothelial carcinoma. *Proteomics Clin. Appl.* 1,192-199, 2007. 査読有

[学会発表] (計16件)

1. 旦部幸博、前田理亜、山本章嗣、茶野徳宏、井上寛一「エネルギー枯渇に対するストレス応答における癌抑制遺伝子 drs の役割」第31回日本分子生物学会年会 2008年12月 神戸

2. 井上寛一、西香代子、奥山雄介、旦部幸博、岡田裕作、磯野高敬、金哲将「Splicing variant cyclin D1bによる膀胱癌細胞の悪性化促進の解析」第31回日本分子生物学会年会 2008年12月 神戸

3. 磯野高敬、金哲将、安藤幸宏、櫻井宏明、山本章嗣、井上寛一「Periostinによる癌の浸潤・転移抑制機構の解析」第31回日本分子生物学会年会 2008年12月 神戸

4. Kaichiro Ikebuchi, Tokuhiko Chano, Takahiro Isono, Hirokazu Inoue, Hidetoshi Okabe. “RB1CC1 binds and activates RB1 promoter” 第67回日本癌学会ワークショップ 2008年10月 名古屋

5. Takahiro Isono, Chul Jang Kim, Hiroaki Sakurai, Yusaku Okada, Hirokazu Inoue “Periostin associates with TAB1 to activate TAK1 and suppresses cell invasiveness” 第67回日本癌学会総会 2008年10月 名古屋

6. Chul Jang Kim, Takahiro Isono, Yukihiro Tambe, Yusaku Okada, Hirokazu Inoue. “Cyclin D1b variant enhances cell invasiveness of human bladder cancer cells” 第67回日本癌学会総会 2008年10月 名古屋

7. Yukihiro Tambe, Takahiro Isono, Tokuhiko Chano, Hirokazu Inoue.

“Regulation of autophagy maturation by the interaction of Drs tumor suppressor and Rab24” 第67回日本癌学会総会 2008年10月 名古屋

8. 茶野徳宏、池淵嘉一郎、磯野高敬、井上寛一「RB1CC1 は hSNF5, p53 と転写因子複合体を形成し、RB1, p16, p21 の転写を促すことにより、RB 経路を総合的に増強する」第30回日本分子生物学会年会 2007年12月 横浜

9. 井上寛一、南佳ほり、旦部幸博、磯野高敬、渡部亮介、磯部健一、樋野興夫、茶野徳宏「ウイルス感染防御におけるストレス応答蛋白 GADD34 と TSC/mTOR 経路の役割」第30回日本分子生物学会年会 2007年12月 横浜

10. Yukihiro Tambe, Takahiro Isono, Tokuhiko Chano, Hirokazu Inoue “An apoptosis inducing tumor suppressor, Drs, interacts with Rab24 and regulates the maturation process of autophagy” 第66回日本癌学会ワークショップ 2007年10月 横浜

11. Kaichiro Ikebuchi, Tokuhiko Chano, Takahiro Isono, Hirokazu Inoue, Hidetoshi Okabe “ RB1CC1 enhances RB pathway in cooperation with hSNF5 and p53” 第66回日本癌学会ワークショップ 2007年10月 横浜

12. Kahori Minami, Hirokazu Inoue, Yukihiro Tambe, Takahiro Isono, Tokuhiko Chano “ Roles of stress-inducible GADD34 for cell survival in energy depletion and

cellular senescence” 第66回日本癌学会ワークショップ 2007年10月 横浜

13. Hirokazu Inoue, Kahori Minami, Yukihiro Tambe, Takahiro Isono, Tokuhiko Chano “ Stress-inducible GADD34 interacts with TSC1/2 to suppress mTOR signaling pathway” 第66回日本癌学会総会 2007年10月 横浜

14. Chul Jang Kim, Takahiro Isono, Yukihiro Tambe, Yusaku Okada, Hirokazu Inoue “Analysis of oncogenic activities of cyclin D1b variant in human bladder cancer cells” 第66回日本癌学会総会 2007年10月 横浜

15. Misuzu Shimakage, Ken Kodama, Kunimitsu Kawahara, Hirokazu Inoue “ Down-regulation of drs tumor suppressor gene in neuroendocrine tumors of the lung” 第66回日本癌学会総会 2007年10月 横浜

16. Takahiro Isono, Chul Jang Kim, Hiroaki Sakurai, Yusaku Okada, Hirokazu Inoue “ Periostin activates TAK1 and Suppresses cell invasiveness” 第66回日本癌学会総会 2007年10月 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 寛一 (INOUE HIROKAZU)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30176440

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし