

初代培養細胞における癌化抑制に関与する遺伝子のクローニングと機能解析

課題番号 10670205

平成10年度－平成12年度科学研究費補助金（基盤研究C-2） 研究結果報告書

平成13年3月

研究代表者 井上寛一
(滋賀医科大学医学部助教授)

滋賀医科大学附属図書館



2000018468

はしがき

細胞の癌化は癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活化などを含む複数の遺伝子の変異によって引き起こされると考えられている。実際、不死化能を獲得して樹立された株化細胞は1種類の癌遺伝子によって容易に癌化されるのに対して、in vivo の正常細胞に最も近いと考えられる初代培養細胞は1種類の癌遺伝子を導入しても簡単には癌化されず、2種類以上の異なる癌遺伝子の協同作用が必要である。何故初代培養細胞は癌遺伝子の作用に対し耐性であるのかは癌発生の機構を明かにする上で重要な問題であるにもかかわらずどのような遺伝子(因子)がこの癌化抑制に関与しているかはよく分かっていない。我々は、初代培養細胞における癌化抑制の機構を明かにすることを目的として、ラット初代培養細胞(REF)のmRNAから作製したcDNA発現ライブラリーをv-src遺伝子によるトランスフォーム細胞株に導入することによって、癌化形質抑制に関わる遺伝子のクローニングを試みてきた。この過程で分離したdrs 遺伝子はC端に膜貫通ドメイン、N端側にセレクチンファミリーで保存されている補体結合蛋白モチーフを持ち、v-srcなど種々の癌遺伝子の発現によってそのmRNA発現がdownregulateされる。ラット細胞株でdrs遺伝子を強力なプロモーターのもとで高発現させるとv-src 遺伝子によるトランスフォーメーションを抑制することからdrsは細胞癌化に対して抑制的に働く遺伝子であると考えられる。またdrs遺伝子はヒト大腸癌細胞株の細胞増殖も抑制する活性があることからヒト癌発生にも関与している可能性が高いと思われる。そこで本研究ではより広範なヒト癌細胞株およびヒト癌組織におけるdrs遺伝子の発現を調べることによりdrs遺伝子のdownregulationと癌化との関連を明かにするとともに、drs遺伝子による癌化抑制の作用機作を明かにする。これと並行してmRNAサブトラクション法によって初代培養細胞(REF)で特異的に発現している遺伝子群のクローニングを行い癌化抑制能を持つ新たな遺伝子を探索する。我々の研究の特色は同じ遺伝的背景を持ちながら癌遺伝子に対する感受性の異なるREFとF2408という細胞に注目して実験系を確立しその差に関わる遺伝子のクローニングを行ってきた点にあり、実際にdrsのような癌化抑制活性を持つ新しい遺伝子のクローニングに成功してきた。癌発生におけるdrs遺伝子の役割を明かにしていくとともに細胞の不死化および悪性化に関わる新たな遺伝子をクローニングしてゆくことが本研究の目的である。

研究組織 研究代表者 井上寛一 (滋賀医科大学医学部助教授)

研究経費

平成10年度	1,300千円
平成11年度	900千円
平成12年度	900千円
計	3,100千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Inoue, H., Pan, J., and Hakura, A.: Suppression of v-Src transformation by the drs gene. J. Virol. 72, 2532-2537, 1998.
2. Kyo, S., Kanaya, T., Takakura, M., Tanaka, M., Yamashita, A., Inoue, H., and Inoue, M. Expression of human telomerase subunits in ovarian malignant, borderline and benign tumors. Int. J. Cancer 80, 804-809, 1999.
3. Yamashita, A., Hakura, A., and Inoue, H. Suppression of anchorage-independent growth of human cancer cell lines by the drs gene. Oncogene 18, 4777-4787, 1999.
4. Yoshioka, N., Inoue, H., Nakanishi, K., Oka, K., Yutsudo, M., Yamashita, A., Hakura, A., and Nojima, H. Isolation of transformation suppressor genes by cDNA subtraction: Lumican suppresses transformation induced by v-src and v-K-ras. J. Virol. 74, 1008-1013, 2000.
5. Shimakage, M., Kawahara, K., Kikkawa, N., Sasagawa, T., Yutsudo, M., and Inoue, H. Downregulation of drs mRNA in human colon adenocarcinomas. Int. J. Cancer 87, 5-11, 2000.

(2) 口頭発表

国際学会

1. H. Inoue and A. Yamashita : Suppression of anchorage-independent growth of human cancer cell lines by the drs gene. Meeting on Cancer Genetics & Tumor Suppressor genes, Cold Spring Harbor, U.S.A., 1998.

国内学会

(一般演題)

1. 山下敦子、羽倉明、井上寛一 「drs遺伝子によるヒト癌細胞株の足場非依存性増殖の抑制」第57回日本癌学会総会 1998年
2. 吉岡直寿、中西一吉、井上寛一、湯通堂満寿男、野島博、羽倉明 「cDNAサブトラク

ション法を用いたトランスフォーメーション抑制因子の分離」第57回日本癌学会総会
1998年

3. 李 勤、岡清正、吉岡直寿、中西一吉、井上寛一、羽倉明、湯通堂満寿男「ロイシン
ジッパーを介してアポトーシスを効率よく引き起こす新規遺伝子ASYの単離と解析」第5
7回日本癌学会総会 1998年

4. 山下敦子、井上寛一 「drs遺伝子によるヒト癌細胞株の足場非依存性増殖の抑制」
第21回日本分子生物学会年会 1998年

5. 井上寛一 「Drs蛋白機能の解析」第58回日本癌学会総会 1999年

6. 島影美鈴、河原邦光、三嶋秀行、西庄勇、井上寛一 「ヒト大腸癌組織におけるdrs
mRNAの発現抑制」 第58回日本癌学会総会 1999年

7. 吉岡直寿、井上寛一、湯通堂満寿男、野島博 「cDNAサブトラクション法を用いたト
ランスフォーメーション抑制遺伝子の単離と機能解析」 第58回日本癌学会総会 19
99年

8. 井上寛一、湯通堂満寿男 「Drs蛋白機能の解析」第22回日本分子生物学会年会 1
999年

9. 吉岡直寿、井上寛一、湯通堂満寿男、藤重夫、野島博 「重差分化法によるトランス
フォーメーション抑制遺伝子の包括的単離と機能解析」第22回日本分子生物学会年会
1999年

10. 湯通堂満寿男、Bing Qi, 井上寛一 「新規遺伝子ASYによるアポトーシス誘導機構の解
析」第22回日本分子生物学会年会 1999年

11. 山下敦子、井上寛一 「drs遺伝子によるヒト癌細胞株の造腫瘍性抑制」第59回日
本癌学会総会 2000年

12. 高見康二、児玉憲、東山聖彦、島影美鈴、井上寛一 「低分化型肺腺癌におけるdrs
mRNAの発現抑制」 第59回日本癌学会総会 2000年

13. 島影美鈴、河原邦光、矢野間俊介、笹川寿之、井上寛一、吉田明 「甲状腺癌におけ
るEpstein-Barr ウイルスの発現」第59回日本癌学会総会 2000年

14. 田島陽一、小山内たか、井上寛一、宮木美智子、佐内豊 「糖転移酵素ホモログ
LARGEによる癌抑制作用の検討」第59回日本癌学会総会 2000年

15. 井上寛一 「新規癌抑制遺伝子drs の2種類のmouse cDNA のクローニングとその機能解析」第23回日本分子生物学会年会 2000年

(シンポジウム、ワークショップ)

1. 山下敦子、井上寛一 「drs遺伝子によるヒト癌細胞株の足場非依存性増殖の抑制」第21回日本分子生物学会年会ワークショップ、1998年

2. 井上寛一 「新規癌抑制遺伝子drsの新しいvariant cDNA の分離とその機能解析」第59回日本癌学会総会ミニシンポジウム 2000年

研究成果

I. drs 遺伝子の機能解析

我々は、初代培養細胞における癌化抑制の機構を明かにすることを目的として、ラット初代培養細胞cDNAライブラリーから癌化形質抑制に関与する遺伝子のクローニングを試みてきた。この過程で分離したdrs 遺伝子はC端に膜貫通ドメイン、N端に接着因子であるセレクトインファミリーに保存されている補体結合モチーフを持ち、種々の癌遺伝子によってそのmRNAの発現がdownregulate されること、およびラット細胞株に強力なプロモーターのもとで高発現させるとv-src やv-ras などの癌遺伝子によるトランスフォーメーションを抑制することから細胞癌化に対して抑制的に働く新規癌抑制遺伝子である可能性が高いことが分かってきた。またヒトにおいても大腸、卵巣、精巣などの癌細胞株でdrs mRNAの強い発現抑制が認められることなどを明かにしてきた。これらの結果からdrs 遺伝子はラットだけでなくヒト癌の発生においても癌化に抑制的に機能している可能性が出てきた。本研究はdrs 遺伝子の機能を解析することによって癌化抑制機構を明かにすることを目的として研究を行い3年間で以下の成果を得た。

A. 平成10年度

(1) drs 遺伝子がヒト癌細胞株でも抑制遺伝子として機能しうるかどうかを検討するために、レトロウイルスベクター (pBabePuro) に drs 遺伝子を組み込んだamphotropic virusを作成し、drs mRNA発現が低下していた種々のヒト癌細胞株 (T24, WiDr, DLD1, MCAS) などに導入して、その癌化形質の変化を検討したところdrs発現細胞ではvectorだけの細胞と比べてsoft agarでのcolony形成 (anchorage-independent growth) が著しく抑制されることを見出した。また、このとき通常の接着条件下での細胞増殖能はdrsの導入によってほとんど影響を受けなかった。

(2) drs 遺伝子によるヒト癌細胞株の癌化形質の抑制の作用機作を明かにするためにdrs 遺伝子の種々のdeletion mutants を作製しこれらmutant drs を発現するamphotropic virus をヒト癌細胞株に感染させ癌化抑制活性を検討したところ、drs 遺伝子の膜貫通領域のC端側の細胞内ドメインと考えられる領域とN端側の細胞外領域にある3つの補体結合蛋白モチーフの両方が抑制活性に必要であることがわかった。

(3) drsがどのような機構でanchorage-independent growthを抑制するのかを明かにするためにvectorあるいはdrsを導入したT24細胞 (H-ras が活性化されているbladder carcinoma cell line)を接着および非接着(suspension)条件下で培養する実験系をつくり検討したところdrs導入細胞では非接着条件下で細胞周期のG1 からS期への移行が抑制されることを見出した。この過程に関与すると考えられる種々の細胞周期調節蛋白の発現をwestern blottingで調べたところcyclin D, cyclin E, cdk2, cdk4, やcdk inhibitorのp27, p21などの発現には変化はみとめられず、Rb蛋白のリン酸化状態にもdrsによる影響はないのに対して、細胞周期のS期移行に重要な役割を果たしているcyclin Aの発現がdrs導入細胞を非接着状態で培養したときにのみ抑制されることがわかった。またNorthern blottingによってcyclin A の発現抑制はmRNA レベルで起こっていることがわかった。

(4) drsの蛋白機能を検討するためにdrsにFlag-tagを導入し細胞で発現させる実験系を確立し、drs蛋白がそのN端側を外側にして細胞膜上で発現していることを明らかにした。またリコンビナントdrs蛋白を大腸菌で作製し、drs蛋白に対するポリクローナル抗体を作製した。この抗体を用いてdrs蛋白と強く結合する分子量70kdの蛋白が存在することを見出した。

(5) ヒト癌細胞株だけでなく実際のヒト癌組織におけるdrs遺伝子の発現をin situ hybridization 法によって検討したところ正常大腸組織ではdrs遺伝子の発現が認められるのに対して、現在までに調べたほとんどの大腸癌 (colon adenocarcinoma) 組織 (5/5) においてdrs mRNAの発現が著しく低下していることを明らかにした。

上記の結果からT24などのヒト癌細胞株においてdrsは非接着条件下(細胞外基質からインテグリンを介したシグナルがないとき)ではおそらくRB蛋白のリン酸化の経路を介さずにcyclin Aの発現を転写レベルで抑えることによって増殖を抑制している可能性が考えられる。

B. 平成11年度

(1) ヒト癌細胞株だけでなく実際のヒト癌組織におけるdrs遺伝子の発現と悪性化との関連をさらに大腸癌において検討した。in situ hybridization 法によって検討した。正常大腸組織ではdrs遺伝子の発現が認められるのに対して(8/8)、現在までに調べたほとんどの大腸腺癌 (colon adenocarcinoma) 組織(11/11)においてdrs mRNAの発現が著しく低下していた。drs遺伝子のdownregulationが起こるstepを明らかにするためにいろいろな段階のadenomaで検討したところ、良性のadenoma with mild atypiaではdrs mRNAの発現が認められるのに対してadenoma with moderate atypiaやadenoma with focal carcinomaではほとんど発現が認められなかった。Southern blottingで検討したところdrs mRNAの発現が認められない癌組織でもdrsゲノムの大きな欠失や再構成は認められなかった。このことからdrsの発現抑制は大腸腺癌の良性から悪性へのprogressionに密接に関わっているものと考えられる。

(2) Drs蛋白の機能を明らかにするためにwild-type drs および種々のdrs deletion mutantsをCOS1や293T細胞で発現させdrs蛋白に対するポリクローナル抗体を用いて検出する実験系を確立した。この系を用いて、drs蛋白がN端側を外側として細胞膜上で発現していること、Drs蛋白が膜貫通ドメインを介して会合していること、通常培養条件下ではリン酸化はされていないこと、およびdrs蛋白と結合する分子量70Kの蛋白が存在することを明らかにした。

(3) drs KO mouseを作製するためにまずrat drs を probe としてmouse cDNA libraryをscreeningして2種類のmouse cDNA clone(mDRS-1, mDRS-2)を得た。mDRS-1はこれまでにクローニングしているrat DRSとhuman DRS cDNAのhomologにあたり464アミノ酸をコードできるORFを持っていた。一方、mDRS-2はmDRS-1から一番N端側のconsensus repeatを1個欠いたものであった。

C. 平成12年度

(1) 実際のヒト癌組織におけるdrs遺伝子の発現と悪性化との関連をできるだけ広範囲

in situ hybridization 法、Northern法、Southern法によって検討した。昨年度は大腸腺癌の良性から悪性へ移行する過程でdrs mRNAの発現抑制が起こっていることを明らかにしたが、今年度は男性で患者数の多い肺癌と前立腺癌で検討し低分化型肺腺癌、肺小細胞癌、前立腺癌においても大きな遺伝子変化をとまわずにdrs mRNAの強い発現抑制が高頻度で認められることを明らかにした。また調べた全ての成人T細胞白血病(ATL)患者のリンパ腫においてdrsの強い発現抑制が起こっていることを見出した。正常T細胞、B細胞やATL以外のリンパ腫、またHTLV-1 感染T細胞株でもdrsは発現している。したがってdrsの発現抑制はATLのキャリアから悪性化する過程で起こっている可能性が考えられさらに詳しく解析を行っている。

(2) Drs蛋白の機能を明らかにするためにdrsの細胞内ドメインとマルトース結合蛋白との融合蛋白を大腸菌で作製し精製した。このリコンビナント蛋白を用いてdrsと細胞内で結合する蛋白の同定を行っている。

(3) drsの発現の認められないヒト癌細胞株T24にdrs遺伝子を導入しdrs発現に依存して発現誘導される遺伝子の検索を行いJNK, DNA-PK, IL-10など複数の遺伝子を見出した。これら遺伝子がdrsによる癌化抑制とどのように関わっているのかを今後解析してゆく。

(4) drs KO mouseを作製するためにまずrat drs を probe としてmouse cDNA library から2種類の mouse cDNA clone(mDRS-1, mDRS-2)を得た。mDRS-1はこれまでにクローニングしているrat DRSとhuman DRS cDNAのhomologにあたり3つのCRを持っていた。一方、mDRS-2はmDRS-1から一番N端側のCRを1個欠いたものであった。この2種類のcDNAに相当するdrs mRNAはマウス正常組織において実際に発現していた。またヒト正常組織でもDRS-2 に相当するmRNAが発現していることを見出した。この2種類のdrsを発現ベクターに組み込みヒト癌細胞株に導入し3つのCRを持つdrsのみが癌化抑制活性があることを明らかにした。さらにこのcDNAをprobeとしてdrsの第1エクソンを含むgenomic cloneを分離することに成功しこのcloneをtargetting vectorに組み込んだものをES細胞へ導入後、drs KO ES細胞cloneを分離し、生殖系細胞でdrsがKOされたマウスを作製中である。

(5) 個体でのdrs遺伝子の機能をさらに解析するためにwild type drsおよびCRドメインや細胞内ドメインを欠いた種々のdeletion mutantを発現するTg vector を作製した。現在、これらの遺伝子を導入したtransgenic mouse を作製中である。

上記の結果からヒト癌細胞株だけでなく大腸癌や肺癌など実際のヒト癌組織においてもdrsの発現抑制と悪性化形質の発現が密接に関連していることが明らかになってきた。deletion mutantsを使った実験からdrsの癌抑制機能には細胞外ドメインが何らかのシグナルを受け細胞内ドメインからシグナルを伝達していることが予想される。drs蛋白が細胞内で結合する蛋白を同定しどのような経路でシグナルを伝えサイクリンA遺伝子の発現を抑制するのかを詳細に検討することによってdrs遺伝子による細胞癌化抑制機構を明らかにしてゆきたい。さらに現在作製中のdrs KO mouseおよびTg mouseの解析によって個体レベルでの発がん過程におけるdrs遺伝子の役割と種々の正常細胞においてdrsがどのような機能を担っているのかも明らかにしてゆきたい。

II. REF特異的に発現している遺伝子群のクローニングとその機能解析

REF細胞で特異的に発現している遺伝子群のクローニングをcDNAサブトラクション法によって試み、REFで発現が認められ株化細胞F2408で発現が著しく減少しているcDNAクローンを20クローン分離した。これらのcDNA群の中でlumican 遺伝子がv-src癌遺伝子による癌化を抑制する活性があることを明らかにし、さらにlumicanが肺癌などのヒト癌細胞株でも発現が抑制されておりlumicanをこれらの癌細胞に導入するとp21CDK inhibitorの発現上昇とともに癌化形質を抑制することを見出した。今後、これらの遺伝子の機能をさらに解析しヒト癌発生との関連を明らかにしてゆきたい。