

ジーンターゲットングによる新規癌抑制遺伝子の機能解析

課題番号 15590335

平成15年度～平成16年度 科学研究費補助金（基盤研究C(2)）
研究成果報告書

平成17年6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



2004011540

我々は細胞癌化の分子機構を明かにするために癌の発生に関わっている新しい癌抑制遺伝子をクローニングしその機能解析をおこなっている。現在までに癌形質抑制活性を指標とした発現クローニング法やcDNA サブトラクション法などを用いて Drs, Periostin/OSF2, Lumicanなどの新規癌抑制遺伝子の分離に成功している。その中で現在我々が最も集中的に解析を行っているのがv-src 癌遺伝子による癌化を抑制する活性を持つ遺伝子として新規に分離したDrs遺伝子である。Drsは大腸癌など種々のヒト癌細胞株や悪性癌組織でその mRNA発現が消失している。またこれらヒト癌細胞株にDrs遺伝子を導入し発現させるとその悪性化形質が抑制されることからDrsはヒト癌の発生においても癌抑制遺伝子として働いていると考えられる。我々は主としてDrsノックアウトマウスの解析とプロテオミクスによるDrs結合蛋白の解析によってDrs 遺伝子がどのような機構で癌化を抑制するのか、また正常細胞においてどのような機能を担っているのかを明らかにする。

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)

研究分担者： 原口清輝 (滋賀医科大学医学部助手)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	1,900	0	1,900
平成16年度	1,700	0	1,700
総計	3,600	0	3,600

研究発表

(1) 学会誌等

1. Qi, B., Qi, Y., Watari, A., Yoshioka, N., Inoue, H., Minemoto, Y., Yamashita, K., Sasagawa, T. and Yutsudo, M. Pro-apoptotic ASY/Nogo-B protein associates with ASYIP. *J. Cell. Physiol.* 196, 312-318, 2003.
2. Kim, C. J., Shimakage, M., Kushima, R., Mukaisho, K., Shinka, T., Okada, Y. and Inoue, H. Down-regulation of drs mRNA in human prostate carcinomas. *Human Pathology* 34, 654-657, 2003.
3. Shimakage, M., Kawahara, K., Sasagawa, T., Inoue, H., Yutsudo, M., Yoshida, M., and Yanoma, S. Expression of Epstein–Barr virus in thyroid carcinoma correlates with tumor progression. *Human Pathology* 34, 1170-1177, 2003.
4. Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S., Saga, Y. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* 301, 1239-41, 2003.
5. Haraguchi, S., Tsuda, M., Kitajima, S., Sasaoka, Y., Nomura-Kitabayashid, A., Kurokawa, K., Saga, Y. nanos1: a mouse nanos gene expressed in the central nervous system is dispensable for normal development. *Mech Dev.* 120, 721-31, 2003.
6. Haraguchi, S., Saga, Y., Naito, K., Inoue, H., and Seto, A. Specific gene silencing in the pre-implantation stage mouse embryo by an siRNA expression vector system. *Mol. Reprod. Dev.* 68, 17-24, 2004.
7. Tambe, Y., Isono, T., Haraguchi, S., Yoshioka-Yamashita, A., Yutsudo, M., and Inoue, H. A novel apoptotic pathway induced by the drs tumor suppressor gene. *Oncogene* 23, 2977-2987, 2004.
8. Suzuki, J., Sukezane, T., Akagi, T., Georgescu, M. M., Ohtani, M., Inoue, H., Jat, P. S., Goff, S.P., Hanafusa, H., and Shishido, Y. Loss of c-abl facilitates anchorage-independent growth of p53- and RB- deficient primary mouse embryonic fibroblasts. *Oncogene* 23, 8527-8534, 2004

9. Watanabe, R., Chano, T., Inoue, H., Isono, T., Koiwai, O., Okabe, H. Rb1cc1 is critical for myoblast differentiation through Rb1 regulation. Virchows Arch. 446, in press.

10. Kim, C. J., Yoshioka, N., Tambe, Y., Kushima, R., Okada, Y., and Inoue, H. Periostin is down-regulated in high grade human bladder cancers and suppresses in vitro cell invasiveness and in vivo metastasis of cancer cells. Int. J. Cancer, in press.

(2) 口頭発表

1. 旦部幸博、磯野高敬、湯通堂満寿男、井上寛一 「癌抑制遺伝子drs による新規アポトーシス誘導経路」 第62回日本癌学会総会 2003年

2. 島影美鈴、山本直樹、井上寛一 「癌抑制遺伝子drs によるATL細胞株の増殖抑制」 第62回日本癌学会総会 2003年

3. 金哲將、九嶋亮治、島影美鈴、岡田裕作、井上寛一 「ヒト膀胱癌における癌抑制遺伝子としてのperiostinの機能解析」 第62回日本癌学会総会 2003年

4. 井上寛一、旦部幸博、吉岡(山下)敦子、原口清輝、湯通堂満寿男、磯野高敬 「Drs 遺伝子による新規アポトーシス誘導経路と癌化抑制」 第26回日本分子生物学会年会 2003年

5. 金哲將、九嶋亮治、岡田裕作、井上寛一 「ヒト膀胱癌におけるperiostinの浸潤抑制機能の解析」 第63回日本癌学会総会 2004年

6. 旦部幸博、向所賢一、磯野高敬、九嶋亮治、服部隆則、井上寛一 「アポトーシス誘導能を持つ癌抑制遺伝子Drsのノックアウトマウスにおける悪性腫瘍発生機構」 第63回日本癌学会ワークショップ 2004年

7. 島影美鈴、井上信正、大島孝一、岡剛史、井上寛一、湯通堂満寿男 「がん抑制遺伝子ASYの発現抑制とATL発症との関連」 第63回日本癌学会ワークショップ 2004年

8. 旦部幸博、吉岡(山下)敦子、向所賢一、原口清輝、九嶋亮治、磯野高敬、服部隆則、井上寛一 「ノックアウトマウスによるDrs遺伝子の癌化抑制機能とアポトーシス誘導機構の解析」 第27回日本分子生物学会年会 2004年

(3) 出版物

井上寛一：「腫瘍ウイルスによる癌化に関する変異株」生物薬科学実験講座 6、細胞の増殖と成長因子、Ⅲ 培養細胞の利用 p533-543, 広川書店（共著）2005.

研究成果

[要約]

我々がv-srcによる細胞癌化を抑制する活性を持つ遺伝子として分離したDrsは膜貫通領域とSushiモチーフと呼ばれるコンセンサスリピートを持つ新規癌抑制遺伝子である。Drs遺伝子は 大腸癌、肺癌など種々のヒト癌細胞株や悪性癌組織においてmRNA 発現が抑制されており、ヒト癌の発症にも関与していると考えられる。我々はDrsの生理機能と癌発生における役割を明らかにするために解析を行ない以下のことを明らかにした。

1. Drs は小胞体においてアポトーシス誘導蛋白ASYと結合し、種々のヒト癌細胞株にCaspase-12, -9,-3の活性化を介するアポトーシスを誘導した。
2. 我々が作製に成功した DrsKOマウスでは生後8 - 12ヶ月で、その約25%にリンパ腫、肺癌、肝癌、肉腫などの悪性腫瘍が発生した。
3. このDrsKOマウスの肺癌から樹立した癌細胞株にDrsを再導入すると、ヌードマウスでの造腫瘍能が顕著に抑制され、その腫瘍組織ではアポトーシスの亢進が認められた。
4. DrsKOマウス由来胎児繊維芽細胞(MEF)はラパマイシンやデキサメタゾンなどの薬剤によるアポトーシスに耐性を示した。また、DrsKO MEFではグルコース飢餓条件下でアポトーシスを起こすことから、Drs誘導アポトーシスとmTORシグナル経路との関連が示唆された。

[研究目的]

我々が癌遺伝子v-srcによる細胞癌化を抑制する活性を持つ遺伝子として分離した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は大腸腺癌、肺腺癌、前立腺癌、ATLリンパ腫など種々のヒト癌細胞株やヒト悪性癌組織において悪性化形質の発現にともなう mRNA の著しい発現抑制が認められることから、ヒト癌の発生にも重要な役割をはたしていると考えられる。我々は、Drsが種々のヒト癌細胞株にアポトーシスを誘導することを見出したので、このDrs誘導アポトーシス経路について詳細に解析を行なった。また、Drsの生理機能と癌発生における役割を明らかにするためにジーンターゲットングを行ない、Drsノックアウト(KO)マウスの作製にも成功した。本研究では、このDrsノックアウトマウスを用いて、Drs 遺伝子のアポトーシス誘導機能と悪性腫瘍の発生との関連を明らかにすることを目的としている。

[方法と結果]

(1) Drs遺伝子によるヒト癌細胞のアポトーシス

我々はDrs 遺伝子を種々のヒト癌細胞株に高発現させるとアポトーシスを誘導することを新たに見出した。本研究ではまずこのDrs 遺伝子によるアポトーシス誘導のシグナル経路について詳細に解析を行い、以下のことを明らかにした。(a) Drsはcaspase-3, -9を活性化するが、ミトコンドリアからのチトクロームcの放出は認められなかった。(b) Drsによるアポトーシスはp53非依存性であり、Bcl-2遺伝子の高発現によっても抑制されな

かった。(c) caspase-3, -9 の活性化に先だって小胞体を介するアポトーシスに關与すると考えられているcaspase-12(like)の活性化が認められた。(d) Drsが小胞体に局在する新規アポトーシス誘導因子ASY/Nogo-B/RTN-xsと相互作用することを見出した。また、DrsとASYを共発現させると単独導入よりもアポトーシスがさらに亢進した。これらの結果からDrsが小胞体を介する新規の径路からcaspase-3を活性化しヒト癌細胞にアポトーシスを誘導することが示唆された。

(2) DrsKOマウスにおける悪性腫瘍発生

Drs遺伝子機能と癌発生との関連を明らかにするためにジーンターゲットングを行ないDrs遺伝子ノックアウト(KO)マウスを作製した。現在までに、生後12ヶ月を経過したホモのDrs KOマウス46匹のうち12匹にリンパ腫(6例、すべてT細胞由来)、肺腺癌(4例)、肝癌(3例、1例は肺腺癌も含む)、肉腫(1例)の発症を確認している。このTリンパ腫は全て、腸管膜、脾臓、肝臓、腎臓など全身転移していた。またヘテロ(+/-)マウスでは20匹中2匹にリンパ腫が発生しているが、wild type マウス23匹については生後12ヶ月までに腫瘍の発生は認められなかった。さらに数を増やして加齢にともなう悪性腫瘍発生の観察、解析を続行している。

(3) DrsKOマウス由来癌細胞株へのDrs再導入による造腫瘍性抑制

DrsKOマウスで発生した転移をともなう肺腺癌から癌細胞株(LCT1)を樹立することができた。このDrsKO肺癌細胞株にレトロウイルスベクターを用いてDrs遺伝子を再導入した細胞株(LCT1-Drs)を作製し、ベクター導入細胞株(LCT1-pCX)とその悪性化形質を比較検討した。LCT1-Drs細胞株ではin vitroでの細胞増殖能はLCT1-pCX細胞株と変化はなかったが、ヌードマウスの皮下に注射し、その造腫瘍能を調べたところ、LCT1-Drs細胞株ではLCT1-pCX細胞株に比べて顕著に造腫瘍能が低下していた。この時、Drs導入癌細胞の腫瘍組織では活性化caspase-3陽性のアポトーシス細胞の数が有意に増加していた。また、in vitroでも低血清培地中ではLCT1-Drs細胞株の方がLCT1-pCX細胞株より有意にアポトーシスが促進されることを見出している。

(4) DrsKO細胞におけるアポトーシス誘導抵抗性

Drsのアポトーシス誘導における役割を細胞レベルで解析するために、まずDrs KOマウスとWild type(WT)マウスから胸腺リンパ球を取り出し種々のアポトーシス誘導因子に対する応答を比較検討した。DrsKOマウス由来リンパ球では、X線照射によるアポトーシスはWTマウス由来リンパ球と同様に誘導されたが、デキサメタゾンによるアポトーシスがWTマウス由来リンパ球より抑制されることを見出した。さらにWTおよびDrsKOマウスの胚からそれぞれ胎児繊維芽細胞(MEF)を調製し、様々なアポトーシス誘導因子に対する反応を解析した。現在までに、Drs KO MEF細胞はアクチノマイシンド、カンプトテシン、エトポシド、ツニカマイシン、タプシガルギン、スタウロスポリン、シクロヘキシミドなどによるアポトーシスはWT MEF細胞と同様に起こるが、ラパマイシンとデキサメタゾンによるアポトーシスには抵抗性を示すことを見出した。

(5) Drs誘導アポトーシス経路とmTOR経路との関連

上記(4)の実験結果からラパマイシンの特異的標的分子であるmTORキナーゼのシグナ

ル経路にDrsが関わっている可能性がでてきた。そこで、癌抑制蛋白TSCを介してmTOR経路を抑制することがわかっているグルコース枯渇処理をWT,およびDrs KO 細胞に施したところ、DrsKO細胞にのみCaspase-12, -9, -3の活性化を伴うアポトーシスが誘導された。また、この時、mTORキナーゼ下流のp70S6キナーゼのリン酸化が亢進されていたことから、低エネルギー状態にもかかわらず蛋白合成を促進するmTOR経路が活性化していることがアポトーシスの引き金になっている可能性が示された。

[考察]

DrsKOマウスにおいて、生後12ヶ月までに加齢に伴ってリンパ腫、肺腺癌、肝癌などの悪性腫瘍が有意(約25%)の頻度で発生するのに対して、WTマウスでは12ヶ月までに全く腫瘍発生は認められなかったことから、Drsは個体での癌発生においても癌抑制遺伝子として機能していると考えられる。さらに、DrsKOマウスに発生した肺腺癌由来の癌細胞株にDrsを再導入すると細胞増殖に影響を与えることなしに癌細胞の造腫瘍能を抑制することもDrsが悪性腫瘍の発生に対して抑制的に働いていることを示していると考えられる。我々はこれまでに、Drsが小胞体を介する新規の経路でヒト癌細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにしてきた。DrsKOマウス由来の細胞が特定の薬剤(ラパマイシンやデキサメタゾン)によるアポトーシスに抵抗性を示すことから、Drsが生理的条件下でも特定のアポトーシス経路に関与していることが強く示唆された。特に、ラパマイシンはmTORキナーゼの特異的阻害剤であることからDrsが関与するアポトーシス経路とmTOR経路との関連が考えられる。mTOR経路はインシュリンなどの成長因子やグルコース、アミノ酸など細胞環境中の栄養やエネルギー状態を感知して、蛋白合成の調節を行なうことで細胞の大きさや成長を制御しているシグナル伝達系である。最近、このmTORシグナル経路が癌の発生にも密接に関係していることが明らかになってきている。グルコース枯渇による低エネルギー状態では、正常な細胞は癌抑制遺伝子TSCを介してmTORを抑制し蛋白合成を低下させるが、TSCをノックアウトした細胞ではエネルギーが枯渇しても蛋白合成が抑制されず、その結果としてアポトーシスが起こることが報告されている。そこで、DrsとmTOR経路との関連を検討するために、DrsKO MEFとWTMEFを用いて同様の実験を行なったところ、DrsKO細胞でのみグルコース飢餓によってアポトーシスが誘導された。このとき、我々がヒト癌細胞株で報告していたcaspase-12, -9, -3の活性化もDrs KO細胞で認められた。この結果からDrsがmTOR経路に対してTSCと同様に抑制的に働いていることが考えられ、Drs誘導アポトーシス経路がmTOR経路と何らかのクロストークをしている可能性が示唆された。現在、グルコース枯渇条件下でのWT細胞とDrsKO細胞のTORシグナルの関連蛋白(Akt, TSC1/2, mTOR, 4EFP1, S6K, S6など)の活性化を特異抗体によって検討中である。また、特異抗体による免疫沈降とイムノプロット法によって細胞内(特に小胞体)でのDrs, ASY分子とmTOR, TSC分子との蛋白間相互作用も検討している。今後、DrsKOマウスおよびKO細胞を用いて、Drsによる新規アポトーシス経路とmTOR経路とがどのような分子機構でクロストークしているのか、またこれらのシグナル経路が発癌制御にどのように関わっているのかを明らかにしてゆきたい。