

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590437

研究課題名（和文） Drs/GADD34による細胞生存制御と癌の悪性化

研究課題名（英文） Regulation of cell survival and malignant tumor formation by Drs/GADD34

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（和文）：遺伝子KOマウス胎児繊維芽細胞を用いて、Drs/GADD34を介した様々なストレス環境下での細胞応答を解析し、Drsはエネルギー枯渇、低酸素、エネルギー代謝、ウイルス感染など様々なストレスに対する細胞応答、細胞生存に重要な役割をはたしていることを明らかにした。また、Drsはストレス応答蛋白GADD34と結合し、TSC1/2のリン酸化を介してmTOR経路の制御に関与していることも明らかにした。

研究成果の概要（英文）： We investigated the role of Drs/GADD34 in cell responses under various stress conditions by using gene knockout cells and found that Drs plays critical roles for the control of cell responses in energy deprivation, hypoxia, energy metabolism and viral infection. Drs binds to GADD34 to regulate mTOR pathway via TSC1/2 phosphorylation control.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、ストレス応答、アポトーシス、オートファジー、生体防御、mTOR

1. 研究開始当初の背景

我々が新規に分離した癌抑制遺伝子Drsはv-src遺伝子や活性化H-rasなどの癌遺伝子によってそのmRNA発現が抑制される。また、大腸腺癌、肺腺癌、前立腺癌、ATLリンパ腫など様々なヒト癌組織において悪性化にともなうDrs mRNAの発現抑制が見出されている。Drsが小胞体においてアポトーシ

ス誘導因子ASY/NogoBと結合し、caspase-12, -9, -3を活性化する新規の経路でヒト癌細胞株にアポトーシスを誘導することも明らかにしてきた。さらに、我々が作製したDrs-KOマウスでは、その約30%にT細胞リンパ腫、肺腺癌、肝癌などの悪性腫瘍が発生した。このDrs-KOマウス由来の癌細胞株にDrsをウイルスベクターで再導入す

ると、*in vivo* ではアポトーシスを伴う腫瘍形成抑制を引き起こし、*in vitro* では低血清培養条件下でアポトーシスを誘導した。KO マウスから樹立した Drs-KO 胎児繊維芽細胞 (MEF) では低血清条件下で誘導されるオートファジーが抑制されることも見出した。また、Drs 結合蛋白としてオートファジー制御に関わる Rab7, Rab24 を新たに同定している。さらに、Drs-KO MEF 細胞ではグルコース枯渇条件下でアポトーシスが誘導された。これらの結果から、Drs は増殖因子やエネルギー枯渇などのストレス環境下でのアポトーシスやオートファジーの制御を介して癌化抑制に関わっていることが予想される。

我々が Drs 結合蛋白として新たに同定した GADD34 は DNA 傷害、栄養枯渇、エネルギー枯渇、低酸素、ER ストレス、ウイルス感染などによって誘導されるストレス応答蛋白で、Protein Phosphatase 1 (PP1) と結合し eIF2 $\alpha$  や p53 などの蛋白のリン酸化制御に関わることが報告されている。我々は GADD34-KO 細胞を用いて、グルコース飢餓やウイルス感染によって誘導される GADD34 が癌抑制蛋白 TSC1/2 と結合することによって、mTOR 経路を抑制し、ストレス下での細胞生存や感染防御に関与することを明らかにしている。mTOR 活性を上流から負に制御する TSC2 の KO 細胞では、グルコース枯渇条件下でアポトーシスが誘導されるが、GADD34-KO 細胞でも同様の現象が認められ、GADD34 はエネルギー枯渇下で TSC/mTOR を介して蛋白合成を抑制することによって細胞生存 (アポトーシ回避) に重要な役割をはたしていると考えられる。

オートファジーは栄養枯渇など様々なストレスによって誘導され、細胞内のタンパク質を一旦分解しアミノ酸源としてリサイクルすることで、基本的にはストレス環境下での生存に有利に働くが、過度に進行すると細胞死が誘導され、細胞の生と死の制御の両方に関わっていると考えられている。癌の発生や悪性化におけるオートファジーの役割についてはいまだ明確ではなく、抑制か促進か議論がわかれているところである。mTOR 経路は細胞環境中の栄養バランス、エネルギー状態などを感知し、蛋白合成、細胞成長、やアポトーシスを制御することが知られていたが、この経路に促進的に働く Akt は癌遺伝子として、抑制的に働く PTEN や TSC1/2 は癌抑制遺伝子として機能することから癌の発生にも密接に関連していることが明らかになってきた。また mTOR の活性化はオートファジーを抑制することも報告されているが、オートファジーと mTOR がどのような分子機構で癌発生に関わるかは未だ不明の部分が多い。

## 2. 研究の目的

本研究では、エネルギー枯渇、栄養飢餓、増殖因子枯渇、低酸素などのストレス下での Drs/GADD34 の働きについて解析を行い下記のことを明らかにする。

(a) ストレス条件下で Drs/GADD34 は mTOR 経路、蛋白合成をどのようにして抑制するのか。

(b) Drs/GADD34 はアポトーシスやオートファジーの制御にどのような役割をはたしているのか。

(c) Drs/GADD34 は癌の悪性化とどのように関わっているのか。

## 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 GADD34 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、癌化抑制にどのように関わっているかを解析する。

## 4. 研究成果

遺伝子 KO 細胞を中心として、Drs/GADD34 によるストレス環境下での細胞生存制御機構を解析し以下の成果を得た。

- 1) DrsKO MEF細胞がグルコース飢餓条件下においてアポトーシスを誘導することを見出した。このアポトーシスは mTOR 阻害剤 ラパマイシンによって阻害された。また DrsKO 細胞ではグルコース枯渇時に mTOR 下流の S6 蛋白のリン酸化の抑制が認められなかったことから、Drs は mTOR 経路の抑制を介してエネルギー枯渇時の細胞生存に関わっていると考えられる。
- 2) そのメカニズムの解析を行い、Drs がストレス応答蛋白 GADD34 との結合を介して TSC1/2 と複合体を形成し、TSC2 の Thr1462 のリン酸化を GADD34 と協同して抑制することによって mTOR 経路の抑制に関わっていることを明らかにした。この Drs と GADD34 との結合には GADD34 のリン酸化制御に関わるプロテインフォスファターゼ 1 との結合ドメインが必要であった。
- 3) 低酸素培養条件下でも同様の実験を行い、Drs は低酸素下での細胞生存にも mTOR 経

路の抑制を介して重要な果たしていることを明らかにした。

- 4) 我々はDrsKO細胞ではWT細胞に比べて解糖系が亢進しており、Drsが細胞のエネルギー代謝の制御にも関わっていることを見出した。その分子機構の解析を行ない、DrsKO細胞ではピルビン酸から乳酸への反応を担うラクトースデヒドロゲナーゼ(LDH)の発現量がWT細胞に比べて有意に増加していることを見出した。また、解糖系の制御に関わるLDHの発現とmTOR経路がDrsの発現によって抑制されることを明らかにした。好氣的培養条件下でも解糖系が亢進する現象は癌細胞に特徴的な代謝変化でワールブルグ効果と呼ばれている。Drs遺伝子の発現が多く癌組織で抑制されていることから、Drsの発現消失がこの代謝変化を誘導することで癌の悪性化に関与することが考えられる。
- 5) 我々はDrsKO細胞ではWT細胞に比べてVSVなどのウイルス増殖が亢進することから、Drsは癌だけでなくウイルス増殖の制御にも関与していることを見出した。さらに、このウイルス増殖亢進の分子機構を解析し、Drsによるウイルス増殖の抑制にはmTOR経路およびp38MAPKを介したS6蛋白のリン酸化制御によるウイルス蛋白合成の抑制が重要な役割をはたしていることを明らかにした。

これらの結果から、Drsはエネルギー枯渇、エネルギー代謝、ウイルス感染など様々なストレスに対する細胞応答に重要な役割をはたしていること、またDrsはストレス応答蛋白GADD34を介してmTOR経路の制御に関与していることが明らかになってきた。

##### 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 10 件)

1. Tambe, Y., Okuyama, N., Nakagawa, T., Muramoto, A., Hasebe, M., Chano, T., Inoue, H. Suppression of viral replication by drs tumor suppressor via mTOR dependent pathway. *Cancer Lett.* 314, 82-91, 2012. (査読有)
2. Ochi, Y., Chano, T., Ikebuchi, K., Inoue, H., Isono, T., Arai, A., Tameno, H., Shimada, T.,

Hisa, Y., Okabe, H. RB1CC1 activates the p16 promoter through the interaction with hSNF5. *Oncol. Rep.* 26, 805-812, 2011. (査読有)

3. Kim, C. J., Sakamoto, K., Tambe, Y., Inoue, H. Opposite regulation of epithelial-to-mesenchymal transition and cell invasiveness by periostin between prostate and bladder cancer cells. *Int. J. Oncol.* 38: 1759-1766, 2011. (査読有)

4. Chano, T., Ikebuchi, K., Tomita, Y., Jin, Y., Inaji, H., Ishitobi, M., Teramoto, K., Ochi, Y., Tameno, H., Nishimura, I., Minami, K., Inoue, H., Isono, T., Saitoh, M., Shimada, T., Hisa, Y., Okabe, H. RBCC1 together with RB1 and p53 predicts long-term survival in Japanese breast cancer patients. *PLoS ONE* 5, e15737, 2010. (査読有)

5. Chano, T., Ikebuchi, K., Ochi, Y., Tameno, H., Tomita, Y., Jin, Y., Inaji, H., Ishitobi, M., Teramoto, K., Nishimura, I., Minami, K., Inoue, H., Isono, T., Saitoh, M., Shimada, T., Hisa, Y., Okabe, H. RBCC1 activates RB1 pathway and inhibits proliferation and clonogenic survival in human cancer. *PLoS ONE* 5, e11404, 2010. (査読有)

6. 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 Lett.* 283, 74-83, 2009. (査読有)

7. 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.* 35, 425-432, 2009. (査読有)

8. 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.* 48, 953-964, 2009. (査読有)

9. 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)

10. 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)

[学会発表] (計 10 件)

1. Yukihiro Tambe, Hirokazu Inoue. "Roll of the drs tumor suppressor in regulation of energy metabolism" 第70回日本癌学会総会 2011年

2. Chul Jang Kim, Yukihiro Tambe, Takahiro Isono, Ken-ichi Mukaisho, Hiroyuki Sugihara, Gen Kondoh, Hirokazu Inoue. "Role of cyclin D1b variant in rectal tumorigenesis" 第70回日本癌学会総会 2011年

3. Hirokazu Inoue, Kanami Sakamoto, Yukihiro Tambe, Chul Jang Kim. "Cell-type dependent regulation of EMT and cell invasiveness of human cancer cells by periostin" 第33回日本分子生物学会年会 2010年

4. 旦部幸博、奥山直美、中川達也、井上寛二 「癌抑制遺伝子drsによるウイルス増殖抑制作用」 第33回日本分子生物学会年会 2010年

5. Yukihiro Tambe, Tokuhiko Chano, Hirokazu Inoue. "The drs tumor suppressor is involved in the suppression of viral replication via p38-RSK1-S6 dependent pathway" 第69回日本癌学会総会 2010年

6. Chul Jang Kim, Yukihiro Tambe, Hirokazu Inoue. "Cell-type dependent regulation of EMT and cell invasiveness of cancer cells by periostin" 第69回日本癌学会総会 2010年

7. Tokuhiko Chano, Kaichiro Ikebuchi, Yasuhiko Tomita, Hitosuke Tameno, Yasuko Ochi, Kahori Minami, Hirokazu Inoue, Takahiro Isono, Masao Saitoh, Hidetoshi Okabe. "Activity of novel RBCC1 molecular cascade involving RB1 and p53 correlates with prognosis of breast cancers" 第68回日本癌学会総会 2009年

8. Chul Jang Kim, Takahiro Isono, Yukihiro Tambe, Yusaku Okada, Hirokazu Inoue. "Functional analysis of variant cyclin D1b on the enhancement of cell invasiveness in bladder cancer cells" 第68回日本癌学会総会 2009年

9. Yukihiro Tambe, Hirokazu Inoue. "Suppression of viral replication by the drs tumor suppressor" 第68回日本癌学会総会 2009年

10. Hirokazu Inoue, Tokuhiko Chano, Yukihiro Tambe. "Role of the drs tumor suppressor

gene in cell survival under energy depletion”

第68回日本癌学会総会 2009年

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 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

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：