

**Drs 遺伝子による癌化抑制機構の解析**

**課題番号 13670211**

**平成13年度—平成14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15年 6月**

**研究代表者 井上寛一  
(滋賀医科大学医学部助教授)**

## はしがき

我々がラット初代培養細胞のcDNA発現ライブラリーから新規に分離したdrs 遺伝子はC端側に膜貫通ドメインとN端側にセレクトインファミリーなどに保存されているSushiモチーフを3つ持ち、v-src, v-ras など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活性を持つことから新しいタイプの癌抑制遺伝子であると考えられる。我々はこの遺伝子のヒトホモログを分離し大腸癌など種々のヒト癌細胞株においてdrs mRNAの著しい発現低下が認められることを明かにしてきた。またdrs遺伝子はこれらの癌細胞株に導入すると細胞増殖には影響を与えずに足場非依存性増殖能(anchorage-independent growth)やヌードマウスでの造腫瘍性などの悪性化形質を特異的に抑制する活性を示すことからヒト癌の発生においても悪性化形質の発現に対して抑制的に働いていると考えられる。本研究ではdrs遺伝子の機能をジーンターゲットングやプロテオミクス的手法を用いて解析し癌化抑制機構を明らかにしていくことを目的としている。また、実際のヒト癌組織でのdrs遺伝子の発現抑制と悪性化形質の発現および他の癌遺伝子、癌抑制遺伝子の変異との関連についても詳細に検討することによってヒト癌発生におけるdrs 遺伝子の役割を明らかにする。

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)
	研究協力者	吉岡 (山下) 敦子 (日本学術振興会特別研究員) 原口清輝 (滋賀医科大学医学部助手) 旦部幸博 (滋賀医科大学医学部助手) 島影美鈴 (国立大阪病院臨床研究部)

## 研究経費

交付決定額	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	1,800千円	0千円	1,800千円
平成14年度	1,800千円	0千円	1,800千円
総計	3,600千円	0千円	3,600千円

滋賀医科大学附属図書館



2002018463

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Li, Q., Oka, K., Shimakage, M., Yoshioka, N., Kodama, K., Inoue, H., Hakura, A., Stanbridge, E.J., and Yutsudo, M. Link of a new type of apoptosis-inducing gene *ASY/Nogo-B* to human cancer. *Oncogene* 20, 3929-3936, 2001.
2. Kawai, T., Suzuki, Y., Yamashita, A., and Inoue, H. Isolation of a novel mouse variant of the *drs* tumor suppressor gene. *Cancer Letters* 183, 79-86, 2002.
3. Shimakage, M., Takami, K., Kodama, K., Mano, M., Yutsudo, M. and Inoue, H. Expression of *drs* mRNA in human lung adenocarcinomas. *Human Pathology* 33, 615-619, 2002.
4. Mukaisho, K., Suo, M., Shimakage, M., Kushima, R., Inoue, H., and Hattori, T. Down-regulation of *drs* mRNA in colorectal neoplasms. *Jap. J. Cancer Res.* 93, 888-893, 2002.
5. Yoshioka, N., Fuji, S., Shimakage, M., Kodama, K., Hakura, A., Yutsudo, M., Inoue, H., and Nojima, H. Suppression of anchorage-independent growth of human cancer cell lines by the TRIF52/periostin/OSF-2 gene. *Exp. Cell Res.* 279, 91-99, 2002.
6. 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*. *Journal of Cellular Physiology*, in press.
7. 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*, in press.

### (2) 口頭発表

#### 国際学会

1. Downregulation of *drs* mRNA expression in lymphomas of adult T-cell leukemia  
Hirokazu Inoue, Takashi Oka, Kohichi Ohshima, Nobumasa Inoue, Kunimitsu Kawahara, and Misuzu Shimakage  
10th International Conference for Human Retrovirology, June 25-29, 2001, Dublin, Ireland

2. Suppression of anchorage-independent growth of human cancer cell lines by the drs gene

Atsuko Yamashita and Hirokazu Inoue

Oncogenes & Growth Control Meeting, August 18-22, 2001, La Jolla, U.S.A.

## 国内学会

### 1. がん抑制遺伝子drsの発現抑制とATL発症との関連

島影美鈴 井上信正 河原邦光 大島孝一 岡剛史 井上寛一

2001年 9月26-28日 第60回日本癌学会総会（横浜）

### 2. 新規癌抑制蛋白Drs に結合する蛋白の検索と同定

旦部幸博、磯野高敬、山下敦子、井上寛一

2001年 9月26-28日 第60回日本癌学会総会（横浜）

### 3. 前立腺癌におけるdrs mRNA の発現抑制

金 哲将、島影美鈴、九嶋亮治、岡田裕作、新家俊明、井上寛一

2001年 9月26-28日 第60回日本癌学会総会（横浜）

### 4. drs mRNA の発現抑制と大腸腫瘍の組織発生

向所賢一、九嶋亮治、島影美鈴、井上寛一、服部隆則

2001年 9月26-28日 第60回日本癌学会総会（横浜）

### 5. 新規癌抑制蛋白Drs の細胞内局在とその結合蛋白の解析

旦部幸博、磯野高敬、湯通堂満寿男、井上寛一

2002年 10月1日-3日 第61回日本癌学会総会（東京）

### 6. 癌抑制遺伝子drs による新規アポトーシス誘導経路

旦部幸博、磯野高敬、湯通堂満寿男、井上寛一

2003年 9月25日-27日 第62回日本癌学会総会（名古屋）発表予定

### 7. 癌抑制遺伝子drs によるATL 細胞株の増殖抑制

島影美鈴、山本直樹、井上寛一

2003年 9月25日-27日 第62回日本癌学会総会（名古屋）発表予定

### 8. 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

金哲将、九嶋亮治、島影美鈴、岡田裕作、井上寛一

2003年 9月25日-27日 第62回日本癌学会総会（名古屋）発表予定

## 研究成果

### [研究目的]

我々がv-src 癌遺伝子による細胞癌化に対する抑制遺伝子としてラット初代培養細胞 cDNAライブラリーから新規にクローニングした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チンファミリーなどに保存されているSushi motif と呼ばれる consensus repeat (Sushi motif)を3つ持ち、種々の癌遺伝子によってそのmRNAの発現がdownregulateされる。また大腸癌、肺癌、前立腺癌など種々のヒト癌細胞株や悪性癌組織でdrs mRNAの強い発現抑制が認められることを明かにしてきた。さらにdrs遺伝子をこれらのヒト癌細胞株に導入すると足場非依存性増殖能や造腫瘍能を抑制する活性を持つことを見出した。この抑制活性にはdrsの膜貫通領域の外側と内側の両方が必要であること、またdrs発現細胞では非接着培養条件下でG1/S期進行とサイクリンA mRNAの発現が抑制されていることも明かにしてきた。これらの結果からDrs遺伝子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可能性が高いと考えられる。本研究はDrs遺伝子の機能と癌化抑制機構およびヒト癌発生における役割を明かにすることを目的としている。特にDrsの生理機能と癌化抑制機構を解析するためにDrs 結合蛋白の解析とDrs遺伝子欠損マウス (KO mouse) の作製と解析に取り組んだ。

### [方法と結果]

(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に in situ hybridization 法、Northern法、Southern法によって検討した。まず、大腸腺癌について良性(adenoma)から悪性(adenocarcinoma)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。さらに男性で患者数の多い肺癌と前立腺癌について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の欠失をともなわずに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。

ATL 患者の悪性リンパ腫組織におけるDrs遺伝子の発現と変異をin situ hybridization 法とSouthern hybridization法によって検討したところ、調べた全てのATL患者のリンパ腫 (11例) とATLリンパ腫由来の細胞株 (HUT102, OL-Tml)において遺伝子の欠失をともなわないdrs mRNAの強い発現抑制が起こっていることを見出した。正常T細胞やATL以外のリンパ腫ではdrs mRNAは発現している。また種々のHTLV-1 感染細胞株で検討した結果、drs mRNAの発現抑制はHTLV Tax 遺伝子の発現には依存していないことがわかった。さらにATL細胞株HUT102にレトロウイルスベクターを用いてDrs遺伝子を導入すると軟寒天培地中でのコロニー形成と低血清培地中での増殖が抑制された。したがってdrsの発現抑制はHTLV感染後のATLのprogressionの過程に関与している可能性が考えられる。

(2) プロテオミクスの手法を用いてDrs 蛋白と相互作用する蛋白の網羅的な同定をおこなった。複数のDrs 結合蛋白を検出している。その中のひとつ、GRP78/BiPは小胞体(ER)において蛋白の発現調節やストレスによるアポトーシス誘導に関わる多機能蛋白である。そこ

でDrs遺伝子とアポトーシスとの関連を検討するために種々のヒト癌細胞株にトランスフェクションによってDrs遺伝子を高発現させたところCaspase3の活性化をとまなうアポトーシス誘導を引き起こすことを見出した。Deletion mutantsの解析から、このアポトーシス誘導活性にもDrsの細胞外領域の3つのSushi motifと細胞内領域の両方が必要であることがわかった。この結果は以前にレトロウイルスベクターによってDrs遺伝子をヒト癌細胞株に導入し、足場非依存性増殖の抑制活性をdeletion mutantsによって調べた結果と一致しておりアポトーシス誘導と足場非依存性増殖抑制の間になんらかの関連があることが考えられる。またDrs遺伝子はSaos2やHeLaなどp53とRb遺伝子の機能が失われているヒト癌細胞に対してもアポトーシスを誘導することからDrsによるアポトーシスは少なくともp53非依存性であるか、あるいはp53の下流で機能しているものと考えられる。さらにDrsはCaspase9とCaspase-12も活性化することも明らかにしている。現在、下記のDrsノックアウトマウスとDrs欠損細胞を用いてDrsによるアポトーシス誘導に関わる経路の詳細な解析を行っている。

(3) ジーンターゲティング法によってDrs 遺伝子ノックアウトマウス(Drs KO mouse)を作製することに成功した。Drs 遺伝子はX染色体上にあることがわかっているが、現在までに雄(-/Y)と雌(-/-)の両方のDrs KO mouseが胎生致死にならずに生まれてきている。また、これらのマウスは生殖能力も影響を受けておらず交配可能であることも確認している。これらのDrs KO mouseとそれに由来する初代培養細胞を用いてDrsの生理機能と癌化形質の発現に対する影響、また細胞レベルでの細胞増殖、不死化、癌遺伝子による細胞癌化、アポトーシス、細胞接着、細胞分化などにおけるDrs遺伝子の役割を検討している。

#### [考察]

上記の結果から大腸癌や肺癌、前立腺癌、ATLリンパ腫など様々な実際のヒト悪性癌組織においても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。またDrs遺伝子による癌化抑制にはアポトーシスが関わっている可能性も明らかになってきた。培養上皮細胞では足場をなくすとアポトーシスが誘導される現象(anoikis)が知られており増殖の足場依存性とアポトーシスも密接な関係があることがわかっている。Drs遺伝子機能と関連する分子の解析によってアポトーシスと足場非依存性増殖に関わる新しい経路の解明も期待できると考えられる。今後、Drs蛋白と相互作用する蛋白のさらなる解析とアポトーシス関連分子との関連を詳細に検討することによってDrsによるアポトーシス誘導のシグナル経路を明らかにし、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。また、作製した Drs KO mouse およびDrs 欠損細胞の解析によって個体レベルおよび細胞レベルでの癌発生におけるDrs遺伝子の役割と種々の正常細胞における機能を明らかにしてゆきたい。