

ノックアウトマウスを用いた  
Drs 誘導アポトーシスと発癌抑制機構の解析

課題番号 17590341

平成17年度～平成18年度  
科学研究費補助金（基盤研究（C））  
研究成果報告書

平成19年6月

研究代表者 井上寛一  
滋賀医科大学  
医学部助教授

ノックアウトマウスを用いた  
Drs 誘導アポトーシスと発癌抑制機構の解析

課題番号 17590341

平成17年度～平成18年度  
科学研究費補助金（基盤研究（C））  
研究成果報告書

平成19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



2006014445

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。現在までに癌化形質抑制活性を指標に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。その中で我々が最も集中的に解析を行っているのが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Drsである。Drsは大腸癌、肺癌、前立腺癌、ATLリンパ腫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はヒト癌の発生に癌抑制遺伝子として重要な働きをしていると考えられる。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ことも明らかにしてきた。さらに、我々が作製に成功したDrsノックアウト(KO)マウスではその約30%にリンパ腫、肺癌、肝癌などの悪性腫瘍が発生した。本研究ではDrs KOマウスおよびDrs KO細胞を用いて、アポトーシス制御などのDrsの生理機能と発癌抑制との関連を明らかにする。

## 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)

## 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	2,000,000	0	2,000,000
平成18年度	1,600,000	0	1,600,000
総計	3,600,000	0	3,600,000

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Watanabe, R., Chano, T., Inoue, H., Isono, T., Koiwai, O., Okabe, H. Rb1cc1 is critical for myoblast differentiation through Rb1 regulation. *Virchows Arch* 446, 643-648, 2005.
2. 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* 117, 51-58, 2005.
3. Shimakage, M., Inoue, N., Oshima, K., Kawahara, K., Oka, T., Yasui, K., Matsumoto, K., Inoue, H., Watari, A., Higashiyama, S. and Yutsudo, M. Down-regulation of ASY/Nogo transcription associated with progression of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int. J. Cancer* 119, 1648-1653, 2006.
4. Chano, T., Saji, M., Inoue, H., Minami, K., Kobayashi, T., Hino, O. and Okabe, H. Neuromuscular abundance of RB1CC1 contributes to the non-proliferating enlarged cell phenotype through both RB1 maintenance and TSC1 degradation. *Int. J. Mol. Med.* 18, 425-432, 2006
5. 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.
6. 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
7. 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.

8. 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.

9. 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*, in press.

## (2) 口頭発表

### 1. 金哲将、磯野高敬、旦部幸博、岡田裕作、井上寛一

「Periostin C末端領域のalternative splicingと悪性化および浸潤・転移との関連」  
第64回日本癌学会総会 2005年

### 2. 磯野高敬、旦部幸博、井上寛一

「v-srcによるトランスフォーメーションにおけるmTOR経路の関与の解析」  
第64回日本癌学会総会 2005年

### 3. 茶野徳宏、磯野高敬、井上寛一、岡部英俊

「RB1CC1とhSNF5の介在がもたらすRB1経路への影響と抗腫瘍効果」  
第64回日本癌学会総会ワークショップ 2005年

### 4. 旦部幸博、向所賢一、茶野徳宏、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による腫瘍抑制効果の解析」  
第64回日本癌学会総会ワークショップ 2005年

### 5. 旦部幸博、向所賢一、茶野徳宏、磯野高敬、九嶋亮治、服部隆則、井上寛一

「Drsによるアポトーシス誘導と腫瘍抑制」  
第28回日本分子生物学会年会 2005年

### 6. 磯野高敬、金哲将、旦部幸博、井上寛一

「Periostin遺伝子による癌の浸潤・転移抑制機構の解析」  
第28回日本分子生物学会年会 2005年

### 7. 南佳ほり、川上亨弘、茶野徳宏、井上寛一、寺下隆夫、岡部英俊、岡田裕作、岡本圭

生

「第14番染色体長腕上の刷り込み遺伝子DLK1はヒト腎細胞癌の癌抑制遺伝子である」  
第28回日本分子生物学会年会 2005年

8. 茶野徳宏、佐治雅史、南佳ほり、井上寛一、岡部英俊

「RB1CC1:RB1, mTOR両経路への貢献と細胞増殖、サイズの調整、そして、その生理的意義」

第28回日本分子生物学会年会ワークショップ 2005年

9. Ryosuke Watanabe, Yukihiro Tambe, Hirokazu Inoue, Kahori Minami, Masataka Haneda, Ken-ichi Isobe, Toshiyuki Kobayashi, Okio Hino, Hidetoshi Okabe, Tokuhiko Chano

"Inhibition of mTOR signaling by GADD34 via TSC1/TSC2 contributes to cell survival against bioenergetic stress"

The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006

10. Tokuhiko Chano, Masashi Saji, Hirokazu Inoue, Takahiro Isono, Hidetoshi Okabe

"Neuromuscular abundance of RB1CC1 contributes the non-proliferating enlarged cell phenotype through both RB1 and TSC-mTOR pathways"

The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006

11. Kahori Minami, Yukihiro Tambe, Hirokazu Inoue, Ryosuke Watanabe, Takahiro Isono, Takahiro Kawakami, Takao Terashita, Tokuhiko Chano

"GADD34 controls cell survival by regulating autophagy"

The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006

12. Yukihiro Tambe, Akitsugu Yamamoto, Takahiro Isono, Tokuhiko Chano, Hirokazu Inoue

"An apoptosis-inducing tumor suppressor gene, drs, is involved in regulation of autophagy and defence for viral infection"

The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006

13. 茶野徳宏、磯野高敬、井上寛一、岡部英俊

「RB1CC1はhSNF5/INI1と介在し、p53を安定化させることによって抗腫瘍効果を発揮する」

第65回日本癌学会総会ワークショップ 2006年

14. 旦部幸博、磯野高敬、茶野徳宏、井上寛一

「癌抑制遺伝子drsによるオートファジー制御」

第65回日本癌学会総会ワークショップ 2006年

15. 金哲将、磯野高敬、茶野徳宏、旦部幸博、岡田裕作、井上寛一

「Periostinのalternative splicing variantsと悪性化および浸潤・転移との関連」

第65回日本癌学会総会 2006年

16. 井上寛一

「ストレス応答遺伝子GADD34からmTOR経路抑制を介したウイルス増殖抑制機構」

第54回日本ウイルス学会学術集会 2006年

17. 南佳ほり、旦部幸博、渡部亮介、磯野高敬、磯辺健一、茶野徳宏、井上寛一

「ストレス応答遺伝子GADD34からmTOR経路を介したウイルス増殖抑制機構」

日本分子生物学会2006フォーラム 2006年

18. 青木健、磯野高敬、旦部幸博、井上寛一

「v-srcによるトランスフォーメーションにおけるmTOR経路の役割とmTOR経路とMAPK経路のクロストーク」

日本分子生物学会2006フォーラム 2006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年

## 研究成果

### [ 要約 ]

Drs KOマウス、およびDrs KO細胞を用いて、アポトーシスやオートファジー制御などのDrsの生理機能と発癌抑制との関連を解析し、以下のことを明らかにした。

1. Drs KOマウスに生じた肺癌から樹立した癌細胞株LC-T1にレトロウイルスベクターによって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、この腫瘍組織ではcaspase-3, -9の活性化を伴うアポトーシスが亢進していた。また、Drs導入LC-T1細胞を低血清条件下で培養するとcaspase-12, -9, -3の活性化を伴うアポトーシスが誘導された。
2. Drs KO 胎児繊維芽(MEF)細胞とwild type (WT) MEF細胞にSV40-LargeTやv-srcなどのウイルス癌遺伝子を導入したところ、Drs KO MEF細胞はWT MEF細胞に比べて癌遺伝子による細胞癌化に高い感受性を示した。
3. Drs KO MEF細胞では低血清条件下で誘導されるオートファジーがWT MEF細胞に比べて顕著に抑制された。また、この抑制はDrs遺伝子をDrs KO細胞にウイルスベクターによって再導入することによって解除された。Drs KO細胞におけるオートファジー抑制の作用点はautophagosome からautolysosomeに移行する後期成熟過程であった。また、Drsはオートファジー後期進行に関わると考えられているRab24分子と相互作用し、オートファジー誘導時に、共局在化した。
4. Drsに結合する分子としてストレス応答蛋白GADD34を新たに同定した。GADD34は癌抑制蛋白TSCと相互作用し、蛋白合成制御に関わるmTOR経路を抑制することを見出した。
5. Drs KO および GADD34 KO MEF細胞ではVSV感染によるウイルス増殖の顕著な亢進が認められた。またGADD34 KO細胞ではグルコース飢餓条件下でアポトーシスが誘導され、このアポトーシスはラパマイシンによって阻害された。

これらの結果からDrsがアポトーシスだけでなくオートファジー制御にも関わっていることが明らかになった。またDrsとGADD34が蛋白合成や細胞成長を制御するmTOR経路を抑制することによってウイルス感染防御やストレス環境化での生存にも関与していることが示唆された。

### [ 研究目的 ]

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は大腸癌、肺癌、前立腺癌、ATLリンパ腫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。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。また、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。さらに、我々が作製に成功したDrsノックア



ウト(KO)マウスではその約30%にリンパ腫、肺癌、肝癌などの悪性腫瘍が発生した。本研究ではDrs KOマウスおよびDrs KO細胞を用いて、アポトーシス制御などのDrsの生理機能と発癌抑制との関連を明らかにする。

## [ 方法と結果 ]

### (1) 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とアポトーシス

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)を樹立した。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)とその悪性化形質とアポトーシス感受性について比較検討した。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抑制された。この時、Drs導入癌細胞の腫瘍組織では活性化caspase-3、caspase-9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でも培地中の血清濃度を下げると(0.2%)、Drs導入癌細胞株でのみcaspase-3、caspase-9、caspase-12の活性化を伴うアポトーシスが誘導された。導入したDrs蛋白の細胞内局在を蛍光抗体法で調べたところDrsは小胞体に局在することを確認した。

### (2) DrsKO胎児繊維芽細胞(MEF)の癌化能の解析

Drsの生理機能と癌化抑制の分子機構を細胞レベルで解析するために、wild-type(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、ウイルス癌遺伝子に対する感受性を軟寒天培地中でのコロニー形成(anchorage-independent growth)を指標に調べた。その結果、DrsKO MEF細胞はSV40-LargeTやv-srcなどのウイルス癌遺伝子による細胞癌化にWT MEF細胞に比べて高い感受性を示した。

### (3) DrsKO MEF細胞におけるオートファジーの抑制

DrsKO MEF細胞では低血清(0.1%)によって誘導されるオートファジーが、WT MEF細胞に比べて顕著に抑制されることを見出した。KO細胞におけるこの抑制はレトロウイルスベクターによってDrs遺伝子を再導入することによって回復した。電子顕微鏡とGFP-LC3による解析から、DrsKO細胞ではオートファゴソームからオートリソソームに移行する後期成熟過程が抑制されていることがわかった。また、プロテオミクスの手法を用いたDrs結合蛋白の探索から、オートファジー進行に関わることが示唆されているsmall G蛋白のRab24がDrsと結合していることを見出した。蛍光顕微鏡による解析では、DrsとRab24は低血清によるオートファジー誘導の際に共局在した。

### (4) ストレス応答蛋白GADD34とDrsの相互作用とエネルギー枯渇下における細胞生存

Drs結合蛋白として新たにストレス応答蛋白GADD34を同定した。それぞれの遺伝子のdeletion mutantsを用いた免疫沈降実験から、Drsの3つのsushi motifを含む領域とGADD34のC末端領域(protein phosphatase 1の結合部位を含む)がこれらの蛋白の相互作用に重要であることがわかった。また、GADD34は癌抑制蛋白TSC1/2と相互作用し

蛋白合成や細胞成長を制御するmTOR経路を抑制することも明らかにした。WT MEF細胞ではグルコース飢餓条件下で誘導されるGADD34はTSC1/2との結合を介してmTOR経路を抑制した。一方、GADD34 KO MEF細胞ではグルコース飢餓条件下でアポトーシスが誘導された。このアポトーシスはmTORの特異的阻害剤ラパマイシンによって阻害された。このことから、GADD34はTSCを介してmTOR経路を抑制することでエネルギー枯渇条件下における細胞の生存に重要な働き果たしていると考えられる。

#### (5) Drs/GADD34によるウイルス感染防御

GADD34はvesicular stomatitis virus (VSV)などのウイルス感染によって誘導されるが、GADD34 KO MEFおよびDrs KO MEF細胞ではWT MEF細胞に比べて顕著にVSVの増殖が亢進されることを見出した。VSVを感染させたWT MEF細胞ではmTOR経路が抑制されたが、GADD34 KO MEF細胞ではmTOR経路の抑制は認められなかった。またGADD34 KO MEF細胞におけるウイルス増殖はラパマイシンによって顕著に阻害された。これらの結果からDrs/GADD34がmTOR経路の抑制を介してウイルス感染防御にも関わっていることが示唆された。

#### [ 考察 ]

DrsKOマウス由来肺癌細胞株LCT1へのDrs再導入の実験から、癌細胞の造腫瘍性抑制とDrsによるアポトーシス誘導には密接な関連があることがわかってきた。我々は以前にDrsがヒト癌細胞株にcaspase-12, -9, -3の活性化をともなうアポトーシスを誘導する活性があることを報告していたが (Tambe et al. Oncogene 2004)、Drs導入LCT1細胞においても低血清条件下で培養するとcaspase-12, -9, -3の活性化をともなうアポトーシスが誘導された。これらの結果から、Drsは小胞体を介した新規の経路でアポトーシスを誘導することにより癌化抑制に関わることがKOマウスの実験系でも明らかになった。これらの結果から、Drsは癌のprogression過程でおこる栄養や増殖因子の枯渇などのストレス環境下でのアポトーシス制御を介して癌化抑制に関わっている可能性が考えられる。

DrsKOマウスの胚から調製した胎児繊維芽細胞 (MEF) (およびwild-type MEF)のウイルス癌遺伝子に対する感受性の実験から、Drsは個体レベルだけでなく細胞レベルでも細胞癌化に対して抑制的に働くことがわかった。これらのMEF細胞を用いて、様々なストレスに対するDrsKO MEF細胞の応答をWT MEF細胞と比較検討したところ、Drsがアポトーシスだけでなく、オートファジーの制御にも関わっていることがわかってきた。また、新たに同定したDrs結合蛋白Rab24を介してDrsがオートファジー後期成熟過程の進行に関わることも明らかにした。オートファジーは栄養枯渇などによって誘導され、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る。近年、癌細胞でオートファジーが抑制されることから癌との関連も示唆されているがその詳細な分子機構はいまだ明らかではない。DrsKOマウスおよび DrsKO細胞を用いた遺伝学的解析、およびDrs結合蛋白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、今後分子レベル

で明らかにしてゆきたい。

我々はまたDrsがGADD34と結合することを明らかにした。さらに、KO MEF細胞を用いた実験から、DrsとGADD34がグルコース飢餓での細胞の生存や、ウイルス増殖制御にも関わることを新たに見出した。GADD34はDNA傷害、栄養枯渇、エネルギー枯渇、低酸素などによって誘導されるストレス応答蛋白でProtein Phosphatase1と結合しeIF2 $\alpha$ やp53のリン酸化の制御に関わることが報告されている。我々は、GADD34がmTORを上流から制御するTSC1/2と結合することによりmTOR経路を抑制することも見出している。mTORはオートファジーを抑制するという報告もなされていることから、DrsがmTORを介してオートファジーに関与している可能性も考えられる。今後、DrsとGADD34によるウイルス感染感染防御の分子機構を解明していくとともに、ストレス環境化における細胞応答にどのように役割を担っているかを明らかにしてゆきたい。