

平成 22 年 6 月 21 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005 ～ 2009
 課題番号：17013064
 研究課題名（和文） *INK4A/ARF* 遺伝子座の染色体レベルでの発現調節と細胞老化における役割
 研究課題名（英文） Regulation of *INK4a/ARF* gene locus and its role in cellular senescence
 研究代表者
 原 英二（HARA EIJI）
 財団法人癌研究会・癌研究所がん生物部・部長
 研究者番号：80263268

研究成果の概要（和文）：癌抑制遺伝子である $p16^{INK4a}$ の発現をマウスの生体内でリアルタイムに解析出来る新しいシステムの開発に成功した。このシステムを用いて $p16^{INK4a}$ の生体内での発現動態を解析した結果、 $p16^{INK4a}$ は個体老化に伴い様々な組織で発現するのみならず、ゲノムの守護神として働く $p53$ が失活した場合には、発現レベルが更に増大することで発癌を防御していることを見出した。これらの結果は、癌抑制機構の解明に大きく貢献すると同時に個体老化と発癌との関係解明にも貢献した。

研究成果の概要（英文）：We developed a bioluminescence imaging system for non-invasive and real-time analysis of $p16^{Ink4a}$ expression in living mice. Using this system, we show that various oncogenic insults provoke epigenetic de-repression of $p16^{Ink4a}$ expression through reduction of DNMT1 levels *in vivo*. This pathway is accelerated in the absence of $p53$, indicating that $p53$ normally holds the $p16^{Ink4a}$ response in check. These results unveil a backup tumor suppressor role for $p16^{Ink4a}$ in the event of $p53$ inactivation, expanding our understanding of how tumor suppression mechanism is regulated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	9,400,000	0	9,400,000
2006年度	9,400,000	0	9,400,000
2007年度	9,400,000	0	9,400,000
2008年度	10,700,000	0	10,700,000
2009年度	10,700,000	0	10,700,000
総計	49,600,000	0	49,600,000

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード： $p16^{INK4a}$ 、 $p53$ 、イメージング、細胞老化、癌抑制、加齢

1. 研究開始当初の背景

INK4A/ARF 遺伝子座には2つの重要な癌抑制遺伝子である $p16^{INK4a}$ 遺伝子と *ARF* 遺伝子が一部重複してコードされており、それら遺

伝子の発現は染色体構造の変化によって精密に調節されている。しかしその発現制御メカニズムの実体、特に生体内における発現動態とその調節機構については殆ど明らかに

されていなかった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では p16^{INK4a} 遺伝子の発現変化を生きた細胞やマウス個体においてリアルタイムに可視化できる新しいインビボ・イメージングシステムを構築することを目的とした。

(2) 更にそのインビボ・イメージングシステムを用いて、これまで解析が困難なため明らかにされてこなかった p16^{INK4a} 遺伝子の染色体レベル及び個体レベルでの発現調節機構とその役割を解析し、生態防御機構としての癌抑制機構の分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒトの完全長の *INK4A/ARF* 遺伝子座を含む BAC ベクターを改変し、p16^{INK4a} の C-末端側にルシフェラーゼを融合させた蛋白を発現するレポーターの構築を行なった。作成したレポーターをヒトの初代細胞やマウスの初代細胞に導入し、レポーターが発する発光シグナルが内在性 p16^{INK4a} の発現パターンと同じかを確認後、このレポーターを組み込んだトランスジェニックマウスの作成を試みた。

(2) 作成したトランスジェニックマウスを用いて、マウスの発生過程や個体老化の過程、また様々な発癌ストレスを与えた場合に p16^{INK4a} 遺伝子が生体内のどこで、いつ、どの程度発現するかを詳細に調べた。

(3) 更に、作成したトランスジェニックマウスを様々な遺伝子改変マウスと交配させることにより、p16^{INK4a} の発現制御機構の解明を試みた。

4. 研究成果

(1) マウスの生体内においてヒト p16^{INK4a} 遺伝子の発現をリアルタイムに測定できるインビボ・イメージングシステムの構築に成功した。更に p16^{INK4a} 遺伝子の発現はヒトとマウスにおいて非常に類似しており、生体内において同様の発現制御を受け、同様の役割を果たしていることを見出した。

(2) マウスの生涯を通して p16^{INK4a} 遺伝子の発現動態を解析した結果、p16^{INK4a} 遺伝子は

様々な組織において、加齢とともに発現が緩やかに増大することを見出した。しかし、発癌ストレスを与えると、p16^{INK4a} 遺伝子の発現は急速に上昇することを見出した。

(3) 発癌ストレスに対する p16^{INK4a} 遺伝子の発現制御機構を解明するために皮膚において癌遺伝子である *ras* 遺伝子を活性化させたところ、DNMT1 の発現が低下することで p16^{INK4a} 遺伝子プロモーター周囲のヒストン 3 リジン 9 のメチル化が外れることにより p16^{INK4a} 遺伝子の発現レベルが上昇することを見出した。また、同様の現象が最も重要な癌抑制遺伝子の 1 つである p53 を欠損させた場合にも起こることを見出した。このことは、生体内において、もし、p53 が失活した場合には p16^{INK4a} 遺伝子の発現レベルが上昇することで発癌を防御している可能性を示唆しており、p16^{INK4a} が p53 のバックアップとしての癌抑制機構も担っていることを明らかにした。

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 14 件)

以下の論文は全て査読有

1. Yamakoshi, K., Takahashi, A., Hirota, F., Nakayama, R., Ishimaru, N., Kubo, Y., Mann, D.J., Ohmura, M., Hirao, A., Saya, H., Arase, S., Hayashi, Y., Nakao, K., Matsumoto, M., Ohtani, N. & Hara, E.

Real-time in vivo imaging of p16^{Ink4a} reveals cross-talk with p53.

J. Cell Biol. 186, 393-407 (2009)

2. Inomata, K., Aoto, T., Binh, N.T., Okamoto, N., Tanimura, S., Wakayama, T., Iseki, S., Hara, E., Masunaga, T., Shimizu, H. & Nishimura, E.K.

Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation.

Cell 137, 1088-1099 (2009)

3. Ohtani, N., Imamura, Y., Yamakoshi, K., Hirota, F., Nakayama, R., Kubo, Y., Ishimaru, N., Takahashi, A., Hirao, A., Shimizu, T., Mann, D.J., Saya, H., Hayashi, Y., Arase, S., Matsumoto, M., Nakao, K. & Hara, E.

Visualizing the dynamics of p21^{Waf1/Cip1}
cyclin-dependent kinase inhibitor expression in
living animals
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 15034-15039
(2007)

4. Takahashi, A., Ohtani, N., Yamakoshi, K., Iida,
S., Tahara, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I.,
Ide, T., Saya, H. & Hara, E.
Mitogenic signalling and the p16^{INK4a}-Rb
pathway cooperate to enforce irreversible cellular
senescence
Nature Cell Biol., 8, 1291-1297 (2006)

5. Laman, H., Funes, J., Ye, H., Henderson, S.,
Galinares-Garcia, L., Hara, E., Knowles, P.,
McDonald, N. & Boshoff, C.
Transforming activity of Fbxo7 is mediated
specifically through regulation of cyclinD/cdk6.
EMBO J., 24, 3104-3116 (2005)

6. Maehara, K., Yamakoshi, K., Ohtani, N., Kubo,
Y., Takahashi, A., Arase, S., Jones, N. & Hara, E.
Reduction of total E2F/DP activity induces
senescence-like cell cycle arrest in cancer cells
lacking functional pRB and p53.
J. Cell Biol., 167, 553-560 (2005)

[学会発表] (計 31 件)

1. Eiji Hara (招待講演)
Real-time in vivo imaging of p16^{Ink4a} unveils a
cross talk between p53 and p16^{Ink4a}
IMCB Symposium on Cell Cycle Regulation &
Tumorigenesis
2009年9月 7-8日 シンガポール

2. Kimi Yamakoshi, Akiko Takahashi, Naoko
Ohtani & Eiji Hara
Real-time in vivo imaging of p16^{Ink4a} unveils a
cross talk between p53 and p16^{Ink4a}
The Salk Institute Meeting on Mechanisms
and Models of Cancer
2009年8月 12-16日 ラホヤ、アメリカ

4. Eiji Hara (招待講演)
The role of p16^{Ink4a} CDK inhibitor in cell cycle
control and cellular senescence.
Gene & Cancer Meeting
2007年12月 10-12日 ウォーリック、イギリス

4. Akiko Takahashi, Naoko Ohtani, Kimi
Yamakoshi & Eiji Hara
Mitogenic signaling and p16/Rb-pathway
cooperate to enforce irreversible cellular
senescence through activating ROS/PKC- δ
signaling pathway.

Keystone Symposium
2007年3月 18-23日 ウィスラー、カナダ

[図書] (計 1 件)

1. 高橋暁子、原 英二
細胞周期アッセイ法
がん分子標的治療研究マニュアル
金芳堂 (2009) pp84-91

[その他]
ホームページ等

<http://www.jfcr.or.jp/tci/canbio/index.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
原 英二 (HARA EIJI)

研究者番号 : 80263268

(2) 研究分担者
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
()

研究者番号 :