

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390471

研究課題名 (和文) 新規細胞死誘導タンパク質 (Monad) 系制御機構の解明による口腔癌治療への応用

研究課題名 (英文) Investigation for apoptosis regulation system of Monad and its application on therapy of oral tumors

研究代表者：

上崎 善規 (KAMISAKI YOSHINORI)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：40116017

研究成果の概要 (和文)：我々が発見した新規タンパク質、Monad は抗腫瘍薬などの細胞死刺激を促進する。Monad は酵母で見られるものと同様に、RPAP3 や PIH1D1、レプチン、ポンチンなどと複合体を形成して存在すること、さらに、その複合体の各成分のバランスが細胞生存および細胞死のスイッチとして働いていることを解明した。これらの結果は、口腔領域の腫瘍を治療する際に、その抗腫瘍薬感受性の予測や、治療効果を促進する方法の確立につながるものである。

研究成果の概要 (英文)：Monad, a newly discovered protein, promotes apoptosis induced by anti-tumor agents. Monad exists as protein complex with RPAP3, PIH1D1, Reptin, and Pontin, similarly to that in yeast. In addition, cell survival or death is revealed to be regulated by the balance of these components. These results are useful for the treatment of oral tumors by predicting and potentiating the efficiency of anti-tumor agents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2009 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：アポトーシス、口腔腫瘍、Monad、情報伝達、R2TP 複合体、ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

我々はスクラップ・アンド・ビルドにより構築されていく神経系の発生過程を検討するなかで、細胞死の最終段階であるカスパーゼ 3 の活性化に関与するタンパク質を発見した。これを Monad と命名して、その構造や機能を世界に先駆けて解明してきた。例えば、Monad は WD40 リピート・ドメインを持つが、これは、アポトーシスを制御するタ

ンパク質複合体であるアポプトゾームを構成する Apaf-1 にも認められた。従って、Monad の機能解析は細胞の生死を制御する根幹的な機序を解明するものであり、口腔領域に発生する腫瘍の治療に応用できると考えられた。

2. 研究の目的

口腔領域に発生する腫瘍の治療に資する

ため、我々が発見した新規細胞死促進タンパク質 **Monad** のアポトーシス制御機構の解明を目指したものである。これまで、細胞死を誘導促進するタンパク質について、様々な報告が見られるが、**Monad** のように、細胞死刺激が存在する際に、その刺激を促進するというものは、ほとんど知られていない。従って、**Monad** の機能解明とその応用は、腫瘍細胞に限定して抗腫瘍薬を効果的に作用させる可能性を示すものである。つまり、一般的な抗腫瘍薬の有害作用を限定化させ、より有効な治療法を確立することにつながる。

3. 研究の方法

(1) **Monad** の組織分布

Monad 関連タンパク質に対する抗体を用いた免疫組織化学的手法により、正常および腫瘍組織における **Monad** 関連タンパク質の分布を検討する。また、各種組織から抽出した RNA を用い、RT-PCR による mRNA の分布を明らかにする。

(2) **Monad** 結合タンパク質の解析

腫瘍細胞を含む各種培養細胞系において、免疫沈降法により、タンパク質間の直接的相互作用を確認する。また、同定した結合タンパク質を恒常的に高発現する細胞株を樹立し、導入したタグによる分離と検出で、それらの結合特性を確認する。

(3) **Monad** 複合体構成成分の機能解析

Monad および **Monad** 結合タンパク質を恒常的に発現する細胞に各種細胞死刺激を加え、その応答性を検討する。また、逆に、RNA 干渉により、これらの発現を抑制した細胞株の細胞死刺激応答性を検討する。これらの研究に明らかとなった、スプライシング・バリエーションの組成や機能についても明らかにする。さらに、これらのタンパク質が細胞死に対して、どのような機序で関与しているのかを解明するため、細胞の生存や死を制御しているとされる、既知のシグナル伝達系との関連を調べる。

4. 研究成果

(1) **Monad** の組織分布

① 口腔領域に発生した腫瘍細胞には、**Monad** が高発現しているものの悪性度が高い腫瘍では、逆にその発現が低下していた。

② 免疫組織学的手法によっても、**Monad** およびその結合タンパク質（レプチン、ポンチン）が共存していることを確認した。

③ **Monad** および、**RPAP3** の mRNA は精巣や卵巣といった増殖が盛んな組織に多く分布しており、細胞構築とその選択的破壊に関与している可能性が示唆された。しかし、**PIH1D1** やレプチンの mRNA の分布はこれらと異なり、肺、白血球などに多くみられ、その分布からも、これらのタンパク質はその

機能が異なる可能性が示唆された。

(2) **Monad** 結合タンパク質の解析

① 我々が同定し、**Monad** 結合タンパク質 **MoBP1** と **MoBP2** と命名していたものが、プロテオミクス的手法により、**RPAP3** と **PIH1D1** であることが報告され、確認された。

② **Monad** および **Monad** 結合タンパク質を導入した細胞株では、**Monad** は、DNA 修復に関連するとされていたレプチン、ポンチンとも結合することを確認した。

③ **RPAP3** にはアイソフォーム（スプライシング・バリエーション）の存在が推定されたが、実際に各種腫瘍細胞で分布が異なることを明らかにした。このバリエーションには複合体形成に必要なと考えられる **TPR** ドメインが欠如しているものがあった。

④ **RPAP3** は **PIH1D1** と直接結合すること、さらに、**IKK γ** である **NEMO** とも結合していた。

(3) **Monad** 複合体構成成分の機能解析

① 我々が樹立した **Monad** や **RPAP3** の高発現細胞株は、腫瘍壊死因子 **TNF α** 刺激だけではなく、紫外線照射、ドキシソルビンなどの抗腫瘍薬による細胞死刺激に対して、カスパーゼ系の活性化を介して、促進的に作用した。

② 一方、**Monad** 結合タンパク質のレプチンや **PIH1D1** の導入は細胞死刺激に対して抵抗性を示し、**Monad** や **RPAP3** とは逆の作用を示した。

③ **PIH1D1** はロイシン・ジッパー構造や核移行シグナルを持ち、**Monad** 複合体の情報を遺伝子発現に連結させている可能性が示唆された。

④ これらの各成分の発現増強や抑制は、**Monad** 複合体の安定性に影響した。このため、これらの成分間のバランスが、**Monad** 系による細胞生存・死シグナルに重要であると考えられた。

⑤ **NEMO** は、腫瘍細胞ではユビキチン化されることにより、分解される。このため、**IKK** が **I κ B α** をリン酸化し、**NF- κ B** が活性化して、細胞生存機構が促進されている状態にある。**RPAP3** はこの **NEMO** に結合し、そのユビキチン化を抑制した。従って、**Monad** 系による細胞死刺激促進作用は **NF- κ B** 系の抑制による可能性が示唆された。

(4) 総括と応用性

以上の結果から、細胞死刺激、特に、二重鎖 DNA 切断を来たす刺激に対して、**Monad** およびその複合体がそのシグナル伝達を制御していることが明らかとなった。従って、口腔領域に発生する腫瘍においても、事前にこれらの発現を確認することは、抗腫瘍薬の選択やその治療効果を予測することに有効であると考えられる。さらに、遺伝子導入が容易な口腔領域の腫瘍に対して、**Monad** 複合体構成成分の発現増強や抑制により、抗腫瘍

薬の効果を腫瘍細胞に限定して、促進することが可能となり、その治療効果を高めるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

- ① Shimada K, Saeki M, Egusa H, Fukuyasu S, Yura Y, Iwai K, Kamisaki Y, RPAP3 enhances cytotoxicity of doxorubicin by impairing NF-Kappa B pathway、Biochem. Biophys. Res. Comm.、査読有、404: 2011、910-914
- ② Inoue M, Saeki M, Egusa H, Niwa H, Kamisaki Y, PIH1D1, a subunit of R2TP complex, inhibits doxorubicin-induced apoptosis、Biochem. Biophys. Res. Comm.、査読有、403: 2010、340-344
- ③ Nagata M, Wada K, Nakajima A, Nakajima N, Kusayama M, Masuda T, Iida S, Okura M, Kogo M, Kamisaki Y、Role of myeloid cell leukemia-1 cell growth of squamous cell carcinoma、J. Pharmacol. Sci. 査読有、110: 2009、344-353
- ④ Ni L, Saeki M, Xu L, Nakahara H, Saijo M, Tanaka K, Kamisaki Y、RPAP3 interacts with Reptin to regulate UV-induced phosphorylation of H2AX and DNA damage、J. Cellular Biochemistry、査読有、106: 2009、920-928
- ⑤ Itsuki Y, Saeki M, Nakahara H, Egusa H, Irie Y, Terao Y, Kawabata S, Yatani H, Kamisaki Y、Molecular cloning of novel Monad binding protein containing tetratricopeptide repeat domains、FEBS Letters、査読有、582: 2008、2365-2370

〔学会発表〕(計 28 件)

- ① Saeki M、Kamisaki Y、Chemical library screening of orphan ligands for identifying osteoclastogenesis-related small molecular compounds、第 84 回日本薬理学会年会、2011. 3. 22、横浜
- ② 島田佳奈、井上美香、佐伯万騎男、江草宏、由良義明、上崎善規、RNA polymerase II-associated protein3 は NF κ B 活性を抑制しドキシソルビシン誘導性アポトーシスを増強する、第 118 回日本薬理学会近畿部会、2010. 11. 19、大阪
- ③ 成清綾、吉田好紀、佐伯万騎男、井上美香、島田佳奈、江草宏、丹羽均、由良義明、矢谷博文、上崎善規、Monad はヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 細胞の浸潤能を負に制御する、第 118 回日本薬理学会近畿部会、2010. 11. 19、大阪
- ④ 石本俊介、和田孝一郎、大倉正也、古郷

幹彦、上崎善規、扁平上皮癌におけるエンドセリン受容体シグナルの役割、第 118 回日本薬理学会近畿部会、2010. 11. 19、大阪

- ⑤ 小浜恵子、和田孝一郎、平英一、上崎善規、口腔扁平上皮癌における細胞接着分子キゼリン/CD146 の発現と役割、第 117 回日本薬理学会近畿部会、2010. 7. 8、徳島
- ⑥ Horiuchi K, Inoue M, Saeki M, Egusa H, Yura T, Kamisaki Y、RPAP3 promotes doxorubicin-induced apoptosis in human breast cancer T-47D cells、第 83 回日本薬理学会年会、2010. 3. 16、大阪
- ⑦ Inoue M, Horiuchi K, Saeki M, Egusa H, Niwa H, Kamisaki Y、Monad binding protein-2 interacts with RPAP3 and regulates doxorubicin-induced apoptosis in U2OS cell、第 83 回日本薬理学会年会、2010. 3. 16、大阪
- ⑧ Kusayama M, Wada K, Okura M, Kogo M, Kamisaki Y、Role of Aquaporin-3 squamous cell carcinoma、第 83 回日本薬理学会年会、2010. 3. 16、大阪
- ⑨ 井上美香、堀内華奈、佐伯万騎男、江草宏、丹羽均、上崎善規、RPAP3 および Monad binding protein2 (MBP2) のアポトーシスにおける役割、第 116 回日本薬理学会近畿部会、2009. 11. 13、大津
- ⑩ 草山守生、和田孝一郎、永田雅英、飯田征二、大倉正也、古郷幹彦、上崎善規、扁平上皮癌における Aquaporin3 の役割、第 116 回日本薬理学会近畿部会、2009. 11. 13、大津
- ⑪ Saeki M, Ni L, Kamisaki Y、Role of Monad binding protein 1 in UV-induced DNA damage、第 82 回日本薬理学会年会、2009. 3. 16、横浜
- ⑫ Nagata M, Wada K, Kusayama M, Iida S, Okura M, Kogo M, Kamisaki Y、Mcl-1 as a target for the therapy of squamous cell carcinoma、第 82 回日本薬理学会年会、2009. 3. 16、横浜
- ⑬ 永田雅英、和田孝一郎、草山守生、大倉正也、古郷幹彦、上崎善規、扁平上皮癌における Myeloid cell leukemia-1 発現抑制による抗癌剤の作用増強、第 114 回日本薬理学会近畿部会、2008. 11. 14、神戸
- ⑭ 永田雅英、和田孝一郎、草山守生、古郷幹彦、上崎善規、口腔扁平上皮癌細胞の増殖における Myeloid cell leukemia-1 の役割、第 50 回歯科基礎医学会学術大会、2008. 9. 23、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上崎 善規 (KAMISAKI YOSHINORI)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：40116017

(2) 研究分担者

和田 孝一郎 (WADA KOICHIRO)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：90263467

佐伯 万騎男 (SAEKI MAKIO)
大阪大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：30273692

中原 寛和 (NAKAHARA HIROKAZU)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：70324796
(H20 のみ研究分担者として参画)