

平成 22 年 4 月 23 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790263

研究課題名 (和文) Hic-5 介在製サイクリン D1 核局在制御による足場依存性増殖とがん化による破綻

研究課題名 (英文) Competitive nuclear export of cyclin D1 and Hic-5 regulates anchorage-dependence of cell growth and survival

研究代表者

森 一憲 (Kazunori Mori) 昭和大学・薬学部・腫瘍細胞生物学・助教

研究者番号：60349040

研究成果の概要 (和文)：

Cyclin D1 (D1) は細胞の足場非依存性増殖を誘導できるがん遺伝子の 1 つであり、特に乳がんの発症や悪性化に関与すると考えられている。興味深いことに、D1 の細胞内局在が接着に依存しており、接着状態で見られる D1 の核局在が接着喪失と共に細胞質へと変化することを見出した。本研究では、接着依存性 D1 核局在制御機構について、細胞接着斑蛋白質 Hic-5 の酸化ストレス感受性シャトル機構が関与することを示し、さらに、その生物学的意義として、足場依存性増殖能、および細胞のがん化過程との関連性を検討した。その結果、Hic-5 による D1 核局在化機構は、接着細胞でのみ D1 の核局在を許容することにより、足場非依存的な増殖を妨げ、細胞増殖の足場依存性を保障する機構であることが示された。また、癌遺伝子 *ras* による細胞の足場非依存性増殖能獲得に D1 の核局在の接着依存性喪失が関与していることを見出した。

研究成果の概要 (英文)：

Because the oncogenicity of cyclin D1 depends on its subcellular localization, the regulatory mechanisms have been under intense investigation. Here we discovered that the nuclear localization of cyclin D1 was anchorage-dependent and regulated by a focal adhesion protein, Hic-5, shuttling in and out of the nucleus through the CRM1 export system, which localized cyclin D1 in the nucleus by counteracting the nuclear export of cyclin D1. In non-adherent cells, cyclin D1 was actively exported from the nucleus because the shuttling of Hic-5 was interrupted by an elevated level of reactive oxygen species (ROS). Conversely, shuttling of Hic-5 which acquired insensitivity to ROS allowed nuclear localization of cyclin D1 and a concomitant escape of cells from growth arrest or apoptosis in non-adherent cells. Of interest, activated *ras* circumvented the above regulation and achieved predominant nuclear localization of cyclin D1 and anchorage-independent growth in non-adherent cells. Together, a new molecular aspect of cyclin D1, the anchorage-dependency of its nuclear localization, has emerged; this deregulation is intimately associated with tumorigenesis, permitting anchorage-independent growth of cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子生物学、細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：足場依存性増殖/非依存性増殖、

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は、多くの場合足場がない状況下でも増殖できる足場非依存性増殖を獲得しており、古くから正常細胞とがん細胞を区別する指標として用いられている。この足場非依存性増殖機構は、がん発生過程、がん転移に深く関与しており、その分子機構を明らかにすることは、細胞のがん化、転移過程を理解する上で極めて重要である。さらに、この機構の解明は、がん発生、転移過程を理解するだけでなく、それを制御できる方法を考案すれば、新たながん予防、治療に繋がる可能性を秘めている。

Cyclin D1 (D1) は細胞の足場非依存性増殖を誘導し、乳癌などヒトがん化過程に関与するがん遺伝子である。D1 のがん化過程へ関与については、その細胞周期制御因子としての機能を中心として解析されてきた。しかし、近年遺伝子破壊マウスの解析より、生理的条件下での細胞増殖には必須ではなく、浮遊状態での増殖、及び ras, neu などの発癌過程に必要であることが示された (Cell 118:477 (2004))。これら最近の D1 に関する知見は、細胞の異常増殖に促進に働くことを示唆しており、これまでとは視点を変えた検討が必要である。

私は D1 の細胞内局在が接着に依存しており、接着状態で見られる D1 の核局在が、接着喪失と共に細胞質へと変化することを見出した。このことは、D1 は接着細胞内でのみ核局在が許容されるように制御を受けており、浮遊状態での D1 の核局在は、足場非依存性増殖を誘導し、細胞を悪性化させる可能性を想定させる。また、この接着に依存した D1 の核局在の制御には接着斑蛋白質 Hic-5 が関与していることを見出しており、Hic-5 は接着細胞内でのみ接着斑と核をシャトルすることにより、D1 を核に局在させるように機能していた。

2. 研究の目的

本研究では、Hic-5による接着依存性D1核局在制御の生物学意義として、浮遊状態におけるD1の核局在を妨げ、異常な細胞増殖・生存を未然に回避するfailsafeシステムである可能性を考え、制御機構破綻の結果、D1の恒常的な核局在が足場非依存性増殖を誘導し、細胞のがん化に寄与することを想定し、このfailsafeシステムが以下のことに関与しているのかを検討する。

①『D1の恒常的核局在により足場非依存性増殖が誘導される』

②『がん化過程におけるD1の細胞内局在変化、及び制御機構破綻の可能性』

3. 研究の方法

人為的に制御機構を破綻させることによって、D1 の核局在を制御できることを確認し、その上で浮遊状態においても D1 が核に局在すると細胞が増殖・生存できるようになるのか、さらに、癌遺伝子 (ras, neu) 遺伝子導入による癌化過程において、この複合体の機能、D1 の局在は変化するかを検討し、実際のがん化過程への関与の可能性を検討する。

①『D1 の恒常的核局在により足場非依存性増殖が誘導される』可能性について

浮遊状態において D1 が核外へ排出される原因として、細胞内活性酸素種 (ROS) 産生により Hic-5 のシャトル機構が抑制された点に着目し、酸化ストレス感受性システイン残基に変異を導入した変異体を用いることによって、浮遊状態での Hic-5 のシャトル機構を人為的に操作する。浮遊状態で増殖停止、アポトーシスが誘導される上皮細胞を用いて、酸化ストレス非感受性 Hic-5 変異体をレトロウイルスにより導入し、浮遊状態でも D1 は核に局在できるのか、細胞染色法により調べる。その後、D1 発現系をポジティブ

コントロールとして、浮遊状態における細胞増殖/生存能について検討する。具体的には、BrdU 取込みを指標とした DNA 合成能、flow cytometer (Beckman Coulter: Epics XL) を用いた細胞周期解析、アポトーシス、及び生存細胞数の経時変化について、比較検討する。

②『がん化過程におけるD1 の細胞内局在変化、及び制御機構破綻の可能性』について

D1 ノックアウトマウスを用いたヒト乳癌の発癌モデル実験により、*ras*、*neu* 癌遺伝子による乳腺上皮の発癌過程に D1 が必要であることが示された (Nature 411:1017 (2001))。この知見を基に、*in vitro* 培養系でモデル細胞を構築して、接着、浮遊状態での D1 の細胞内局在と癌化に伴う Hic-5 シャトル機能の変化を検討する。細胞系として、マウス乳腺上皮細胞 (NMuMG)、マウス繊維芽細胞 (NIH3T3)、また癌遺伝子として *ras*、*neu*、及び negative control として *myc* を使用し、これら細胞に導入することで癌化モデルとする。このモデル系において、接着、浮遊状態での D1 の細胞内局在を細胞免疫染色法により可視化し、共焦点顕微鏡下で観察する。また、Hic-5 のシャトル機構については、核外排出機構 CRM1 の阻害剤 leptomycin B による核外排出を抑制させた際の核への集積を指標として、共焦点顕微鏡を用いた画像解析により定量化し、評価する。

4. 研究成果

①『D1 の恒常的核局在により足場非依存性増殖が誘導される』可能性について

浮遊状態において細胞内活性酸素種 (ROS) 産生により Hic-5 のシャトル機構が抑制されるが、酸化ストレス感受性システイン残基に変異を導入した変異体を構築したところ、この変異体は浮遊状態でもシャトル可能であった。この変異体を用いて、浮遊細胞内で Hic-5 を人為的にシャトルさせると、浮遊状態にも関わらず、D1 は核に保持されるようになった。さらに、恒常的な D1 核局在が細胞増殖/生存に与える影響を検討したところ、浮遊状態で誘導される増殖停止およびアポトーシスは抑制され、浮遊状態での生存率は増加した。

これら結果から、Hic-5 による D1 核局在化機構は、接着細胞でのみ D1 の核局在を許容することにより、足場非依存的な増殖を妨げ、細胞増殖の足場依存性を保障する機構であることが示唆された。

②『がん化過程におけるD1 の細胞内局在変化、及び制御機構破綻の可能性』について

①の結果から、本機構の破綻は、浮遊状態での D1 の核局在化を引き起こし、足場非依存性増殖に寄与する可能性、及び細胞のがん化過程に関与することが想定された。そこで、活性化

ras を用いて検討したところ、D1 は浮遊状態でも核に局在し、接着依存性は消失した。また、D1 に対する siRNA を用いて D1 の発現を抑制すると、活性化 *ras* による足場非依存性増殖能は完全に消失し、足場非依存性増殖能の獲得は恒常的な D1 核局在化に依存していることが示唆された。この *ras* シグナル存在下で見られた恒常的な D1 の核局在化の原因について、D1 核局在制御機構である Hic-5 のシャトル能が *ras* シグナルにより変化した可能性を検討したが、Hic-5 のシャトル機構については、活性化 *ras* 発現によってその挙動に影響が見られなかった。

D1 の機能に関する最近の知見は、生理的条件下での接着細胞の増殖には D1 は必要とされないが、癌化などの異常増殖、特に浮遊条件下での増殖に必要とされることが示唆されている。今回見出した知見を併せて考えると、浮遊状態での D1 の核局在を阻止することは、がん細胞特異的な異常増殖の抑制手段の 1 つとして、がん治療に有効利用できる可能性が考えられた。今後、細胞増殖における足場依存性の理解深めることによって、がん化過程やがん転移における分子標的を提案することを目指し、がん克服に繋がる新規治療薬、治療法の発展に寄与したいと考えている。

本研究成果 (雑誌論文①) は掲載号のハイライトとして紹介された。

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 2 件)

① Kazunori Mori, Etsuko Hirao, Yosuke Toya, Yukiko Oshima, Fumihiro Ishikawa, Kiyoshi Nose, and Motoko Shibamura: Competitive nuclear export of cyclin D1 and Hic-5 regulates anchorage dependence of cell growth and survival. : *Molecular Biology of the Cell* (2009) 20:218-232 査読有

② Kazunori Mori, Yosuke Toya, Kiyoshi Nose, and Motoko Shibamura: Anchorage-independent nuclear localization of cyclin D1 in v-ki-ras-expressing NIH3T3 cells. *Tissue Culture Research communication* (2008) 27:125-137 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① 荒木 裕理、森 一憲、野瀬 清、柴沼 質子: 足場依存性増殖制御に関わる細胞接着斑一核シャトル Hic-5 複合体による cyclin D1 核局在制御機構の解析: 第 31 回日本分子生物

学会年会、第 81 回日本生化学会大会 合同
学会: 2008 年 12 月 12 日: 神戸ポートアイラ
ンド

②森 一憲、野瀬 清、柴沼 質子: 細胞接
着斑蛋白質Hic-5による細胞接着/生存の足場
依存性制御機構: 第 67 回 日本癌学会学術
総会: 2008 年 10 月 28 日: 名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 一憲 (Kazunori Mori)

昭和大学・薬学部・腫瘍細胞生物学・助教

研究者番号: 60349040

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: