

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390502

研究課題名（和文） ヒトの主要ながん抑制経路における核マトリクス結合因子の機能的役割の解明

研究課題名（英文） Functional Roles of Nuclear Matrix Binding Factors in Major Tumor Suppressor Pathways in Human

研究代表者

池田 正明（IKEDA MASAOKI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：20193211

研究成果の概要（和文）：

p53、RB がん抑制遺伝子、および TGF β シグナルによって制御される経路は、ヒトのがん抑制過程において重要な役割を担っている。本研究は、これらの三つのがん抑制経路における ARID (AT-rich interaction domain) DNA 結合タンパク質 DRIL1 および DRIL2 の役割を解析した。その結果、(1) DRIL1 は p53 と協調的に働いて細胞周期停止に関与する *p21/WAF1* の転写活性化を活性化すること、(2) DRIL1 および DRIL2 は E2F 標的遺伝子の転写活性化と細胞増殖において重要な役割を担っていること、さらに (3) DRIL2 の発現が骨分化に必要であることが分かった。以上の結果は、主要ながん抑制経路の制御について重要な知見をもたすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The pathways regulated by p53 and RB tumor suppressors and TGF- β signaling play important roles in tumor suppression in human. In this study, we investigated the functional roles of DRIL1 and its closely related DRIL2, family members of ARID (AT-rich interaction domain) DNA-binding proteins, in three major tumor suppressor pathways. We found that DRIL1 cooperates with p53 to activate pro-arrest *p21^{WAF1}* transcription, and that DRIL1 and DRIL2 play important roles in E2F-target gene expression and cell cycle progression. In addition, our results suggest that DRIL2 function is required for osteogenic differentiation. These results provide important insights in the regulation of human tumor suppressor pathways.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：実験腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

DRIL1 は、核マトリクス結合因子として同定され、特異的な DNA 塩基配列に結合する性質をもつことが知られている。

DRIL1 の最も注目すべき特徴は、核内構造の主要な構成要素（クロマチン DNA、核ボディ、核マトリクス）と相互作用する点であり、遺伝子の発現調節

に重要な役割を担っていることが予想されていた。最近の研究により、DRIL1 が p53、RB および TGF β がん抑制経路に関与することが明らかになりつつあるが、DRIL1 が制御する標的遺伝子が明らかになっておらず、DRIL1 の機能的役割については不明の点が多い。

p53、RB がん抑制遺伝子、および TGF β シグナルによって制御される三つのがん抑制経路は、ヒト腫瘍において多くの遺伝子変異が検出され、がん抑制過程において重要な役割を担っている。これまでの研究により、核マトリクス結合因子 DRIL1 がその三つの経路全てに関与していることが報告されているが、その機能的役割の詳細についてはほとんどわかっていない。

申請者らは、DRIL1 の DNA 結合配列を同定し、DRIL1 が p53 がん抑制経路に重要な役割を担っていることを見出した。この DRIL1 の DNA 結合配列の同定は、不明であった DRIL1 の標的遺伝子を明らかにする糸口となり、がん抑制経路における DRIL1 の機能的な役割を解明する突破口となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、ヒトの主要ながん抑制経路である p53、RB および TGF β 経路に焦点を当て、ヒト発がんにおける主要ながん抑制経路における DRIL1 の機能的役割を明らかにし、口腔がんを含むヒト腫瘍のがん抑制経路における制御異常への DRIL1 の関与を明らかにすることを目的とする。

(1) p53 がん抑制経路における DRIL1 の機能解析

p53 は、ヒト癌において最も高頻度に遺伝子の変異が見つかっている重要な癌抑制遺伝子の一つである。p53 は、DNA 傷害等によって活性化される転写因子であり、細胞周期停止やアポトーシスに関与する遺伝子 (p53 標的遺伝子) の発現を誘導する。本研究は、p53 によって誘導される DRIL1 が、p53 と協調的に働き、p53 による標的遺伝子の活性化およびアポトーシス誘導に重要な役割を担う転写因子であることを明らかにする。

(2) RB がん抑制経路における E2F と DRIL1 の機能解析

p53 と並んで重要ながん抑制遺伝子 RB の遺伝子産物は、転写因子 E2F を抑制することにより、細胞増殖を抑制する。既に DRIL1 が E2F と結合し、発がん遺伝子によって誘導される細胞老化を回復させる活性をもつことが報告されている。したがって、DRIL1 は RB がん抑制経路においても重要な役割を担っていることが予想される。しかしながら、細胞周期あるいは老化に関与する遺伝子における DRIL1 の標的遺伝子は不明である。そこで本研究では、まず RB 経路によって制御される遺伝子における DRIL1 結合配列を明らかにし、それを突破口として RB 経路における DRIL1 の機能的役割を明らかにする。

(3) TGF β シグナル応答における DRIL1 の機能解析

TGF β シグナル伝達経路は、シグナル伝達に関与する因子 (リセプター、転写因子 Samd・Runx、転写仲介因子 p300) における遺伝子変異がヒト腫瘍において高頻度に見つかっている主要ながん抑制経路の一つである。近年、DRIL1 が、アフリカツメガエルの発生過程における TGF β ・BMP シグナル応答に関与することが示され、DRIL1 が Samd・Runx と相互作用する可能性が出てきた。しかしながら、哺乳類の TGF β シグナル伝達経路および発生・分化過程における DRIL1 の機能および役割については、全く報告がない。そこで本研究では、TGF β がん抑制経路における DRIL1 の機能的役割を解析する。

3. 研究の方法

(1) p53 がん抑制経路における DRIL1 の機能解析

DRIL1 が p53 標的遺伝子の転写活性化に重要な役割を担っていることを明らかにする。①クロマチン沈降法を用いて p53 標的遺伝子に DRIL1 が直接結合することを明らかにする。②siRNA あるいは shRNA を用いて DRIL1 をノックダウンし、DRIL1 が DNA 傷害による p53 標的遺伝子の活性化に重要であるかどうかを検討する。③さらに同様の手法を用いて、DRIL1 の p53 による細胞周期停止およびアポトーシス誘導に

における機能的役割を検討する。以上の研究により、DRIL1が、p53の機能活性化に重要な役割を担っていることが明らかになると考えられる。

(2) RB がん抑制経路における E2F と DRIL1 の機能解析

RBは転写因子E2Fを抑制することにより、細胞増殖を制御している。E2Fは細胞周期の進行に必要な遺伝子(E2F標的遺伝子)の転写活性化に中心的な役割を担っている。DRIL1は、E2Fと結合すること、細胞老化を回復させる活性をもつことが報告されている。しかしながら、細胞周期あるいは老化に関与する遺伝子におけるDRIL1の結合はわかっていない。

そこで、①E2F標的遺伝子におけるDRIL1結合配列を検索する。②次に、ゲルシフト法およびクロマチン沈降法を用いて、DRIL1がE2F標的遺伝子に結合することを明らかにする。③さらにDRIL1の過剰発現あるいはsiRNAを用いたDRIL1のノックダウンにより、E2F標的遺伝子の転写活性化におけるDRIL1の役割を検討する。以上の解析により、RBがん抑制経路におけるDRIL1の役割が明らかになると考えられる。

(3) TGFβシグナルおよび発生段階における DRIL1 の機能解析

転写因子Smad・RunxはTGFβ・BMPシグナルにより制御されている。近年、DRIL1が、アフリカツメガエルの発生過程におけるTGFβ・BMPシグナル応答に関与することが示された。この事実はDRIL1が、SmadあるいはRunxと相互作用することにより、TGFβ・BMPシグナル伝達経路に関与していることを示唆している。しかしながら、哺乳類のTGFβシグナル伝達経路および発生・分化過程におけるDRIL1の機能および役割については、全くわかっていない。

そこで、申請者らの見出したDRIL1のDNA結合配列の情報をもとに、TGFβ・BMPシグナル応答遺伝子におけるDRIL1結合配列を検索する。次に、DRIL1がTGFβ・BMPシグナル応答遺伝子に結合し、転写を活性化に関与するかどうかを調べる。以上の解析により、TGFβがん抑制経路におけるDRIL1の役割が明らかになると考えられる。

TGFβ・BMPシグナル経路は、発生・分化過程においても重要な役割を担ってい

る。そこでまず骨分化におけるDRIL1の役割を解析する。

4. 研究成果

当初、本研究はヒトの主要な三つのがん抑制経路におけるDRIL1の機能を明らかにすることを目的としていた。しかしながら、その後の解析の結果、DRIL1と類似した他のARID3ファミリー遺伝子であるDRIL2およびDRIL3も関与し、また、それぞれのファミリー遺伝子が固有の役割を担っていることが明らかになってきた。得られた結果は以下の通りである。

(1) p53 がん抑制経路における DRIL1/2 の機能解析

① DRIL1はp53と協調的に働いて細胞周期停止に関与する*p21/WAF1*の転写活性化を活性化することが明らかになった(Lestari, et al., 2012)。② DRIL1およびDRIL2はアポトーシス誘導に関与するp53標的遺伝子の転写活性化にも関与していることが明らかになった(投稿準備中)。③ さらにDRIL3がアポトーシス関連p53標的遺伝子の活性化に関与していることを示す結果を得ている。

以上の結果から、ARID3ファミリー遺伝子は、p53標的遺伝子の活性化、細胞増殖停止、およびアポトーシス誘導に互いに共通した機能と固有の機能をもっていることが明らかとなった。

(2) RB がん抑制経路における DRIL1/2 の機能解析

RBは細胞増殖に重要な転写因子E2Fの抑制因子である。そこでE2F標的遺伝子の転写活性化と細胞増殖におけるDRIL1/2の機能を解析した。その結果、① DRIL1/2を過剰発現するとE2F標的遺伝子の転写を活性化し、逆にノックダウン(発現抑制)は転写を抑制することが分かった。② DRIL1/2の発現を抑制すると細胞増殖が抑制されることが分かった。したがって、DRIL1およびDRIL2はE2F標的遺伝子の転写活性化と細胞増殖において重要な役割を担っていることが明らかになった(投稿中)

(3) TGF β シグナル応答における

DRIL1/2 の機能解析

TGF β /BMPシグナルは骨分化過程において重要な役割を担っている。マウス骨芽様細胞株MC3T3-E1を用いて骨分化におけるDRIL1/2の役割を解析した。その結果、DRIL2の発現を抑制すると骨分化が阻害されることが分かった。

以上の結果は、主要ながん抑制経路の制御と ARID3 ファミリー遺伝子の役割について重要な知見をもたらし、細胞増殖、細胞分化および癌の研究の進展に寄与すると考えられる。

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 12 件)

1. Lestari W, Ichwan SJA, Otsu M, Yamada S, Iseki S, Shimizu S, Ikeda MA: Cooperation between ARID3A and p53 in the transcriptional activation of p21WAF1 in response to DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 710-716 (2012)
2. Ma, T, Yamada S, Ichwan SJA, Ohtani K, Iseki S, Otsu M, Ikeda MA: Inability of p53-Reactivating compounds Nutlin-3 and RITA to overcome p53 resistance in tumor cells deficient for p53Ser46 phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 931-937 (2012)
3. Wimardhani SY, Sunia DF, Freisleben H-J, Septelia Wanandi SI, Ikeda MA: Cytotoxic effect of chitosan against oral cancer cell lines is molecular-weight-dependent and cell-type-specific. *Int. J. Oral Res.* 3; e1 (2012)
4. Kato T, Esaki M, Matsuzawa A, Ikeda Y, NE5A1 is required for functional maturation of Sertoli cells during postnatal development, *Reproduction*, in press.
5. Liu J, Uematsu H, Tsuchida N, Ikeda MA: Essential Role of Caspase-8 in p53/p73-Dependent Apoptosis Induced by Etoposide in Head and Neck Carcinoma Cells. *Molecular Cancer* 10: 95 (2011)
6. Ikeda Y, Matsunaga Y, Takiguchi M, Ikeda MA: Expression of cyclin E in postmitotic neurons during development and in the adult mouse brain. *Gene Expr Patterns.* 11, 64-71 (2011)
7. Suda N, Shibata H, Kurihara I, Ikeda Y, Kobayashi S, Yokota K, Murai-Takeda A, Nakagawa K, Oya M, Murai M, Rainey

WE, Saruta T, Itoh H. Coactivation of SF-1-mediated transcription of steroidogenic enzymes by Ubc9 and PIAS1. *Endocrinology.* 152: 2266-2277, (2011)

8. Ohno Y, Yasunaga S, Ohtsubo M, Mori S, Tsumura M, Okada S, Ohta T, Ohtani K, Kobayashi M, Takihara Y: Hoxb4 transduction down-regulates Geminin protein, providing hematopoietic stem and progenitor cells with proliferation potential. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 21529-21534 (2010)
9. Liu J, Uematsu H, Tsuchida N, Ikeda MA: Association of Caspase-8 Mutation with Chemoresistance to Cisplatin in HOC313 Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 989-994 (2009)
10. Murugan AK, Hong NT, Cue TTK, Hung NC, Munirajan AK, Ikeda MA, Tsuchida N: Detection of two novel mutations and relatively high incidence of H-RAS mutations in Vietnamese oral cancer. *Oral Oncology*, 45, e161-166 (2009)
11. Ozono E, Komori H, Iwanaga R, Ikeda MA, Iseki S, Ohtani K: E2F-like elements in p27(Kip1) promoter specifically sense deregulated E2F activity. *Genes Cells*, 14, 89-99 (2009)
12. Althunibat OY, Hashim, RB, Taher M, Daud JM, Ikeda MA, Zali BI: In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Three Malaysian Sea Cucumber Species. *European Journal of Scientific Research* 37, 376-387 (2009)

[学会発表] (計 28 件)

1. Teng Ma Shumpei Yamada, Solachuddin J. A. Ichwan, Sachiko Iseki, Kiyoshi Ohtani, Megumi Otsu, Masa-Aki Ikeda "Inability of p53-Reactivating compounds Nutlin-3 and RITA to overcome p53 resistance in tumor cells deficient for p53Ser46 phosphorylation." 3rd Cancer Targets and Therapeutics, Las Vegas, Nevada, USA, February 27-28, 2012.
2. Khandakar A S M Saadat, Endrawan Pratama, Kiyoshi Ohtani, Masa-Aki Ikeda "Role of ARID3A and ARID3B in Cell Growth and E2F-target gene expression." 2nd Heidelberg Forum for Young Life Scientists, Heidelberg, Germany, February 23- 24t 2012.
3. Teng Ma Shumpei Yamada, Solachuddin J.

- A. Ichwan, Sachiko Iseki, Kiyoshi Ohtani, Megumi Otsu, Masa-Aki Ikeda "Inability of p53-Reactivating compounds Nutlin-3 and RITA to overcome p53 resistance in tumor cells deficient for p53Ser46 phosphorylation." 2nd Heidelberg Forum for Young Life Scientists, Heidelberg, Germany, February 23- 24t 2012.
4. 池田やよい、加藤朋子、生殖腺特異的 SF-1 ノックアウトマウスの精巣におけるセルトリ細胞の分化異常, 第 117 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 甲府, 2012.
 5. Widya Lestari, Solachuddin J.A Ichwan, Megumi Otsu, Shumpei Yamada, Shihoko Shimizu, Masa-Aki Ikeda "Role of ARID3A in p53-mediated Transcriptional Transactivation of p21Waf1/Cipl." 第 34 回 日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日、横浜
 6. Teng Ma, Shumpei Yamada, Solachuddin J. A Ichiwan, Kiyoshi Ohtani, Megumi Ostu, Masa-Aki Ikeda "Inability of Nutlin-3 and RITA to overcome p53 resistance in tumor cells deficient for p53Ser46 phosphorylation." 第 34 回 日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、横浜
 7. Khandakar A S M Saadat , Endrawan Pratama, Kiyoshi Ohtani, Masa-Aki Ikeda "Role of ARID3A and ARID3B in Cell Growth and E2F-Target Gene Expression." 第 34 回 日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、横浜
 8. Yuniardini Septorini Wimardhani, Dewi Fatma Suniarti, Hans-Joachim Freisleben, Septelia Inawati Wanandi, Masa-Aki Ikeda "Inhibition of two chitosans with different molecular weight against the growth of several oral cancer cell lines." Congress of Indonesian Dental Association, April 1, 2011, Bali, Indonesia.
 9. Ikeda Y, Kato T, Postnatal development of the gonad specific SF-1 KO mouse testis. The Endocrine Society's 93rd Annual Meeting, Boston, 2011
 10. 加藤朋子, 池田やよい, 生殖腺特異的 SF-1 ノックアウトマウスにおける生殖腺の組織学的解析, 第 84 回 日本内分泌学会学術総会, 神戸, 2011
 11. Yuniardini Septorini Wimardhani, Dewi Fatma Suniarti, HJ Freisleben, Septelia Inawati Wanandi, Masa-Aki Ikeda "Low Molecular Weight Chitosan: Antitumor Efficiency against Oral Cancer Cells" The 25th International Association for Dental Research South East Asian Regional Meeting, October 28-30, 2011, Singapore.
 12. Yuniardini Septorini Wimardhani, Dewi Fatma Suniarti, HJ Freisleben, Septelia Inawati Wanandi, Masa-Aki Ikeda "Low Molecular Weight Chitosan: Mechanism of Antitumor Activity against Oral Cancer Cells." FDI-IDA Joint Meeting, November 12-13, 2011, Semarang, Indonesia.
 13. Juan Liu, Nobuo Tsuchida , Masa-Aki Ikeda "Caspase-8 and p53/p73 deficiencies confer resistance to drug induced apoptosis in head and Neck carcinoma cells" 第 69 回 日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22 日～24 日、大阪
 14. Ikeda Y, Takiguchi M, Ikeda M-A, Cyclin E expression in early neural stem cells during adult hippocampal neurogenesis Keystone Symposia: Stem Cell Differentiation and Dedifferentiation, 2010
 15. Ikeda Y, Kato T, Takiguchi M, Effects of gestational diethylstilbestrol treatment on gonadal differentiation, 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, 2010
 16. Ikeda Y, Takiguchi M, Ikeda M-A, Effects of voluntary physical activity on cyclin E expression in the subgranular layer of the mouse hippocampal dentate gyrus. Neuroscience 2010 (40th Annual Meeting), San Diego, 2010
 17. Ichwan Solachuddin J. A., Masa-Aki Ikeda "In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in human oral cancer cell lines by thymoquinone" 第 69 回 日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22 日～24 日、大阪
 18. Teng Ma, Shumpei Yamada, Ichwan Solachuddin J. A., Megumi Ostu, Kiyoshi Ohtani, Masa-Aki Ikeda "Effect of Nutlin-3 on p53 resistance in tumor cells lacking the ability to phosphorylate Ser46 on p53" 第 33 回 日本分子生物学会年会・第 83 回 日本生化学会大会合同年会、2010 年 12 月 7 日～10 日、神戸
 19. 池田やよい, 滝口雅人, 松永裕子, 池田正明, マウス海馬歯状回顆粒下層における細胞増殖因子サイクリン E の発現, Neuro2010(第 33 回 日本神経科学大会/第 53 回 日本神経化学学会大会/第 20 回 日本神回路学会大会合同大会), 神戸, 2010
 20. Yayoi Ikeda, Masahiko Takiguchi, Masa-Aki Ikeda "Cyclin E expression in early neural stem cells during adult hippocampal neurogenesis" Keystone Symposia "Stem Cell Differentiation and Dedifferentiation" February 15 - 20, 2010,

- Keystone, Colorado, USA.
21. 池田やよい, 生殖腺発生に働く転写調節因子へのエストロゲン暴露の影響. 第 82 回日本内分泌学会学術総会, 群馬, 2009 (シンポジウム)
 22. 池田やよい, 卵胞細胞特異的 SF-1 ノックアウトマウスの卵巣分化. 第 82 回日本内分泌学会総会, 群馬, 2009
 23. 池田やよい, 胎生期 DES 暴露による生殖腺発生初期への影響, 日本解剖学会関東支部 第 19 回懇話会・シンポジウム, 2009
 24. Ikeda Y, Matsunaga Y, Ikeda M-A, Expression of cyclin E in the cerebral and cerebellar cortices, 第 32 回日本神経科学大会, 名古屋, 2009 Ichwan Solachuddin J. A., Muhammad Taher, Widya Lestari, M. Termidzi, Junaidi, Masa-Aki Ikeda “Anti-cancer properties of and Thymoquinone, constituents of *Nigella sativa*, on oral cancer cell lines” 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日～12 日、横浜
 25. Juan Liu, Nobuo Tsuchida, Masa-Aki Ikeda “Drug-specific Effects of Caspase-8 and p53/p73 Alterations on Chemosensitivity in Head and Neck Carcinoma Cells” 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日～12 日、横浜
 26. Philippe Olivier D. L., Masa-Aki Ikeda “Spatiotemporal analysis of Cdk2 interaction with its regulatory proteins” 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日～12 日、横浜
 27. Teng Ma, Shumpei Yamada, Ichwan Solachuddin J. A., Megumi Ostu, Kiyoshi Ohtani, Masa-Aki Ikeda “Effect of Nutlin-3 on p53 resistance in tumor cells lacking the ability to phosphorylate Ser46 on p53” 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日～12 日、横浜
 28. Ikeda Y, Pelusi C, Parker KL, Abnormal ovarian development by granulosa cell-specific ablation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1, XXXVI International Congress of Physiological Sciences, Kyoto, 2009

[図書] (計 2 件)

1. Ichwan SJA, Bakhtiar MT, Ohtani K, Ikeda MA: Therapeutic Targeting of p53-Mediated Apoptosis Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Current Progress and Challenges, Tumor Suppressor Genes, Yue Cheng (Ed.), ISBN: 978-953-307-879-3, InTech. 6, 129-144 (2012)

2. Koibuchi N, Ikeda Y, Hormones and cerebellar development in “The Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders”. Eds. Manto M, Gruol D, Schmahmann J, Koibuchi N, and Rossi F, Springer, in press.

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 正明 (IKEDA MASA-AKI)

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合
研

究科 准教授

研究者番号: 20193211

(2) 研究分担者

大谷 清 (OHTANI KIYOSHI)

関西学院大学 理工学部 教授

研究者番号: 30201974

池田 やよい (IKEDA YAYOI)

横浜市立大学 医学部 准教授

研究者番号: 00202903

(3) 連携研究者

()

研究者番号: