

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25年5月27日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500998

研究課題名（和文）がん幹細胞化における Rb-Ras 経路の研究

研究課題名（英文）The role of Rb-Ras pathway in cancer stem cells

研究代表者

シヤムマ アワド (SHAMMA AWAD)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：50402839

研究成果の概要（和文）：がん抑制遺伝子 *RB* は多くのクロマチン修飾因子と結合し、その機能を制御する。このような *RB* によるエピジェネティック制御機能を解明するために、我々は *RB* 欠損モデルマウスとヒト原発がん組織を使い、*RB* と *ATM* の相互作用が DNA メチル化酵素 DNMT1 の安定性を制御すること、また、DNA マイクロアレイ解析から数百のがん関連遺伝子の DNA メチル化状態が、*RB-ATM-DNMT1* の相互作用により調節されていることを発見した。

研究成果の概要（英文）：The retinoblastoma tumor suppressor gene (*RB*) product has been implicated in epigenetic control of gene expression due to its ability to physically bind to and regulates many of chromatin modifying factors. To elucidate the mechanism of *RB* epigenetic function, we performed genetic and epigenetic analyses in an *Rb*-deficient mouse and human primary cancer tissues. Here we report that the genetic interaction of *Rb* and *ATM* regulates DNMT1 protein stability, and microarray analysis indicated that *RB-ATM-DNMT1* interaction controls the DNA methylation status in the promoter of hundreds of cancer related genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：エピジェネティク

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：Rb、ATM、DNMT1、p16^{Ink4}、クロマチンリモデリング、エピジェネティク、がん、抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

我々は最近 *Rb* ががん抑制遺伝子と ras プロトがん遺伝子の遺伝学的関係が癌前癌病変から悪性病変への進展に重要な役割を果たしていることを報告した (Shamma et al., Cancer Cell 15:255~269, 2009)。*Rb* 不活性化によって誘導される Ras 活性の亢進が、細胞老化を引きおこし、がん化に拮抗するのである。本研究では、*Rb* が不活性化することによって誘導される DNA 損傷応答が、細胞老化の誘導に必須であるかどうかを、*Rb* と ATM 遺伝子を同時に欠損するマウスを作製することによって検証する。また、同様の遺伝学的背景をもつ繊維芽細胞の挙動を解析することにより、DNA 損傷応答と細胞老化をつなぐ分子機能の本態に迫る。この研究によって、細胞老化機構の破綻を特徴とするがんの悪性進展を制御する方策を探索する。

2. 研究の目的

がん抑制遺伝子 *RB* は多くのクロマチン修飾因子と結合し、その機能を制御することにより標的遺伝子の発現をエピジェネティックに制御している。しかしながら、この *RB* の機能は生物学的にも臨床学的にも十分に解明されていない。このような *RB* によるエピジェネ

ティック制御機能を解明するために、我々は甲状腺 C 細胞腫瘍を生じる *RB* 欠損モデルマウスとヒト原発がん組織を使い、遺伝学的、そして、エピジェネティックな解析を行った。

3. 研究の方法

RB ヘテロ欠損型マウスからは甲状腺カルシトニン産生細胞 (C 細胞) 由来の腺腫 (以下、甲状腺 C 細胞腫瘍) が生じる。さらに *N-ras* ホモ型欠損が導入されると甲状腺 C 細胞腫瘍は高度に悪性化する。*RB* 経路ががん悪性化の過程でどのような役割を果たすかを解明するためにエピジェネティカルな手法を用いて解析することにした。

4. 研究成果

がん抑制遺伝子 *RB* は多くのクロマチン修飾因子と結合し、そのヘテロクロマチン形成機能を制御すると考え、この機能を生物学的、および、臨床学的に解明することを目指した。我々は *RB* と *ATM* の相互作用が DNA メチル化酵素 *DNMT1* の安定性を制御することを発見し、この相互作用による DNA メチル化状態の変化と *RB* 欠損によるがん悪性化の関連を検討する。*RB* と *ATM* の相互作用が DNA メチル化酵素 *DNMT1* の安定性を制御すること、また、DNA

マイクロアレイ解析から Ink4a、Shc2、FoxO6、そして、Noggin を含む数百のがん関連遺伝子プロモーターの DNA メチル化状態が、*RB-ATM-DNMT1* の相互作用により調節されていることを発見した。さらに、bisulfite (重亜硫酸ナトリウム) 法により、これら遺伝子プロモーターの DNA メチル化状態は *RB* と ATM によって緊密に調節されていることを示した。定量化 ChIP (クロマチン免疫沈降) 法による解析結果も *RB* と ATM の状態が、Ink4a プロモーターへの DNMT1 の結合を制御するという上記の観察と一致した。*RB* の不活性化は、アセチル化酵素 Tip60 を介しての ATM の活性化を引き起こし、Tip60 および UHRF1 (E3 リガーゼ) と複合体を形成した DNMT1 への ATM の結合を促進すること、その結果 DNMT1 は Tip60 によるアセチル化、続いて UHRF1 によるユビキチン化を受け、分解されることを明らかにした。加えて、ヒトがんにおいて、*RB* の低発現が ATM のリン酸化 (S1981)、DNMT1 及び p16^{INK4a} の発現と非常によく相関することを明らかにした。これらの研究結果は、*RB* 経路の不活性化が、DNMT1 の不安定化を介して、異常な DNA メチル化状態を引き起こしていることを示している。

近年、DNA メチル化やヒストン修飾異常を標的とした治療が臨床の場に取り入れられており、がん細胞におけるエピジェネティクス制御機構を理解することは、がんの発生・進展に関わる制御機構の解明につながる。DNMT1 安定性が *RB*、および、ATM との相互作用で制

御されており、*RB* の低発現が ATM のリン酸化 (S1981)、DNMT1 及び p16^{INK4a} の発現と非常によく相関することを明らかにした発見から、将来有効な診断・治療標的開発の展望が期待できる。

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 1 件)

- ① Shamma A., Suzuki M., Hayashi N., Kobayashi M., Sasaki N., Nishiuchi T., Doki Y., Okamoto T., Kohno S., Muranaka H., Kitajima S., Yamamoto K., Takahashi C. ATM mediates pRB function to control DNMT1 protein stability and DNA methylation. *Molecular and Cellular Biology* (In press). 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

- ① Shamma A., Sasaki N., Takahashi C. Epigenetic function of retinoblastoma protein entails functional association of ATM and DNMT1. 第 71 回日本癌学会学術総会 24 年 9 月 19 日～24 年 09 月 21 日 札幌市教育文化会館、札幌市
- ② Shamma A., Kido Y., Sasaki N., Takahashi C. ATM regulates DNMT1 protein stability and coordinates its acetylation-driven

ubiquitination during Rb loss-induced carcinogenesis Gordon Conference. 24年3月25日～3月31日 California, USA.

- ③ Shamma A., Takahashi C. DNMT1 Links DNA Damage Response and Cellular Senescence during Rb deficiency-induced Tumorigenesis. 第70回日本癌学会学術総会（招待講演）23年10月3日（月）～10月5日（水）名古屋国際会議場、愛知県
- ④ Shamma A., Takahashi C. ATM mediates the Rb loss-induced DNA damage response and senescence through chromatin remodeling and p16Ink4a regulation. 第69回日本癌学会学術総会（招待講演）22年9月22日～2010年9月24日 大阪国際会議場、大阪）

[その他]

ホームページ等

<http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/>

<http://omb.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.htm>

1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

シヤママ アワド (SHAMMA AWAD)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：50402839

(2) 研究分担者

高橋 智聡 (TAKAHASHI CHIAKI)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：50283619