

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：17601
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790372
 研究課題名（和文）NDRG2 欠損マウスは全身性 AKT リン酸化によりがんを含む各種成人病を引き起こす
 研究課題名（英文）NDRG2 deficient mice induces tumor formation and lifestyle related disease through the activation of AKT phosphorylation
 研究代表者
 市川 朝永（ICHIKAWA TOMONAGA）
 宮崎大学・医学部・助教
 研究者番号：80586230

研究成果の概要（和文）：成人 T 細胞白血球・リンパ腫(ATLL)の病態解析から NDRG2(N-myc downstream-regulated gene 2)を PI3K/AKT 情報伝達系を制御するがん抑制遺伝子候補として同定した。NDRG2 欠損マウスは全身で恒常的に AKT リン酸化が亢進し、さまざまな臓器で腫瘍形成を示した。さらに、脳神経疾患、心肥大および脂肪肝等の循環器疾患に関与していることを明らかにした。NDRG2 の機能解析並びに欠損マウスの病態解析ががんを含む各種成人病に対する病態解明と新規診断治療法の開発につながる可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：We reported that NDRG2 (N-myc downstream-regulated gene 2) is a candidate for tumor suppressor gene in ATLL(adult T-cell leukemia-lymphoma), which can modulate signal transduction of PI3K/AKT pathway. NDRG2 deficient mice developed various type of tumor with increased phosphorylated AKT in all organs. Furthermore, we indicated that NDRG2 deficient mice associated with lifestyle related disease such as brain disease, cardiac hypertrophy and fatty liver. These finding suggest that NDRG2 may become a new therapeutic target for many type of disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：がん 成人病 AKT

1. 研究開始当初の背景

現代人は多くのストレスにさらされ、加齢に伴いその対応に破綻が生じ、メタボリックシンドローム、心筋梗塞、脳卒中、動脈硬化性を含む心血管疾患、うつ病、そしてがん等の各種成人病を引き起こすと考えられている。したがってストレスからの防御機構を明らかにし、その破綻による疾患の発症機構が分かってくれば、これら成人病は予防できる可能性が出てくる。

NDRG2(N-myc downstream regulating gene

2)は、N-myc により発現低下する遺伝子 NDRG1 ファミリーとして同定された遺伝子である。数多くの固形がんでプロモーターメチル化により発現低下し、各種がん細胞系で NDRG2 過剰発現により AKT リン酸化が抑制され、細胞増殖を押さえられた。構造的には Hydrolase 様ドメイン構造を持つものの酵素学的活性は見つかっていない。正常組織では脳、筋組織、心臓、肝臓などで高発現しており、特に脳ではアルツハイマー病に多く発現しており病態との関連性が示唆されている。

さらに抗うつ薬イミプラミンが脳組織における NDRG2 の発現を抑制し抗うつ効果を発揮し、また NDRG2 のサブファミリーである NDRG4 の発現低下が心電図上で QT 延長による心停止突然死の原因であると疑われている。このことから、NDRG2 はがん抑制遺伝子として作用だけでなく、脳/神経疾患や心血管病に対しても関連が示唆されている。また、低酸素、ストレスなどで発現が誘導されるストレス応答遺伝子である事も幾つか報告されている。

我々は成人性 T 細胞白血病・リンパ腫 (adult T-cell leukemia-lymphoma; ATLL)、口腔がん等固形腫瘍の統合的ゲノム解析を行ない、その原因遺伝子群の単離を行っている。ATLL において第 14 染色体の 14q11 領域に染色体転座集中領域とゲノム欠損領域を発見し、染色体切断点集中領域近傍の NDRG2 発現が、網羅的遺伝子発現解析により ATLL で有意に減少していた (Blood 2008 と未発表)。さらに口腔がんにおいても NDRG2 はプロモーターメチル化により有意に転写抑制され、口腔がん細胞に NDRG2 を過剰発現させると AKT の脱リン酸化を促進し細胞増殖を押さえた。NDRG2 低発現と AKT リン酸化亢進が口腔がん組織で正の相関が見られた。したがって NDRG2 は PI3K/AKT 情報伝達系を負に制御し、細胞増殖を抑えるがん抑制遺伝子として働く事が考えられる。そこで NDRG2 欠損マウスを作成したところ、加齢に伴い心血管疾患、さらにはがんを発症していた。この研究では、NDRG2 欠損によるこれら各種成人病発症機構について、PI3K/AKT 情報伝達系の恒常的活性化という観点からその発症の分子機構を明らかにする。

2. 研究の目的

NDRG2 は多くの固形がんにおいて特異的発現低下が見られ、がん抑制遺伝子として知られる。我々は成人 T 細胞白血病や口腔がんの解析から NDRG2 が PI3K/AKT 情報伝達系の活性抑制に働くことを発見し、さらなる解析を進めるために NDRG2 欠損マウスを作製した。NDRG2 欠損マウスは全身で恒常的に AKT リン酸化され、情緒の変化、心肥大、がんの発症など、成人病として知られる疾患群を引き起こす事が分かってきた。この研究では NDRG2 欠損による恒常的な PI3K/AKT 情報伝達系の活性化による全身性の多重疾患の分子機構

を明らかにし、これら疾患の病態解明と新規診断治療法の開発につなげる。

3. 研究の方法

NDRG2 欠損マウスの解析を行い、さらに全身的に異常亢進した AKT によって引き起こされたさまざまな疾患を下記(1)-(3)に分けて解析する。さらに、NDRG2 の PI3K/AKT 情報伝達系制御機構を検討する。

NDRG2 欠損マウスの長期観察

野生型、ヘテロ欠損、ホモ欠損マウス (n=5-10) の外見ならびに腫瘍発生を長期間にわたって経過観察し生存曲線を取っていく。安楽死後臓器を取り出し、生化学的および病理学的実験を行う。

(1) 恒常的 PI3K/AKT 活性化による情動変化の解明

脳においてアルツハイマー病で NDRG2 の発現が増加し、イミプラミンにより発現量が低下し、また違う報告では AKT 活性が増加することによって、抗うつ効果を発揮するといわれており、NDRG2 欠損マウスおよびイミプラミン投与マウスを解析することで NDRG2 の作用を検討する。

(2) 恒常的 PI3K/AKT 活性化による心血管疾患の解明

NDRG2 欠損マウスでは加齢に伴い心肥大が見られた。NDRG2 欠損による AKT 活性上昇がメタボリックシンドロームおよび糖尿病、さらには心疾患を引き起こすかどうか検討を行う。

(3) 恒常的 PI3K/AKT 活性化による発がん機構の解明

N-エチル-N-ニトロソ尿素 (N-ethyl-N-nitrosourea:ENU) を単回腹腔内投与により、NDRG2 欠損マウスと同じように情報伝達系 PI3K/AKT 経路の活性が増加する rasH2 マウスにおいて肺、肝臓および胃で腫瘍が誘発されることが知られている。そこで NDRG2 欠損マウスにも同様の処理を行い、発がん機構を検討する。

PI3K/AKT 情報伝達系における NDRG2 の機能解

析

NDRG2はPI3K/AKT情報伝達系を調節するがん抑制遺伝子であることが示唆されるが、詳しい分子機構については不明な点が多い。AKT上流(PTEN)、下流(GSK3beta等)のシグナルやクロストークして作用するシグナル(IKK等)についてさらに詳しく研究する。Mouse embryonic fibroblast (MEF)を作製し、また癌細胞株にNDRG2を過剰発現させることにより、NDRG2の機能の解析を目指す。

4. 研究成果

ヘテロ同士を掛け合わせた結果、メンデルの法則に従い、野生型:ヘテロ:ホモが1:2:1で生まれた。組織からのタンパク質を使ったウェスタンブロットで、特に脳、心臓、肝臓でNDRG2の発現が高く、ホモ欠損マウスでは完全に発現が消失している一方で、AKTリン酸化が増加していた。NDRG2欠損マウスは短期間(-6ヶ月)では野生型に比べて明らかな外見的差異はみられなかった。さらに、長期間(6-24ヶ月)飼育すると、NDRG2欠損マウスでは生存率が低下した。死後解剖してみると肝臓、肺などの臓器に腫瘍が見られ、リンパ腫と思われる腫瘍も認められた。またNDRG2欠損マウスでは脂肪肝や心肥大を起こしていた。NDRG2はがん抑制遺伝子として働いている一方で、心疾患や循環器疾患の発症にも関与している可能性を示唆した。

NDRG2はアルツハイマー病において高発現し、抗うつ薬イミプラミンにより脳内のNDRG2発現が低下することから、脳神経疾患に関与している可能性がある。そこでNDRG2欠損マウスおよびイミプラミン投与マウスを解析することでNDRG2の作用を検討した。情緒の状態を調べるために尾懸垂試験およびホールボードを用いた行動実験を行い、NDRG2欠損マウスで明らかに、情動行動の改善が認められた。さらに、野生型マウスにイミプラミンを投与す

ると脳内のNDRG2発現が低下し、AKT活性が亢進し、情動行動も改善した。このことから、NDRG2が情動行動を制御している可能性を示唆した。

NDRG2欠損マウスでは加齢に伴い耐糖能が変化し、絶食後グルコース値が増加していた。また、病理学的所見から肝臓に脂質の蓄積が認められ、NDRG2欠損MEFにおいても野生型に比べて脂質の蓄積が増加していた。心臓においても重量の増加、心筋の肥大が認められ、心機能に関与する遺伝子(BNF, aMHC等)の発現変化が認められた。NDRG2欠損による循環器疾患の発症が明らかとなった。

発がん物質投与により、NDRG2欠損マウスでは肝臓等に腫瘍が誘発されていた。

腫瘍形成および循環器疾患の発症のメカニズムとして、NDRG2はPTEN/AKT/GSK3betaのリン酸化を減少させ、またIKK/IkBa/NFkappaB系を制御していることが明らかとなった。NDRG2はPTENと結合することによりPTEN活性を調節し、下流シグナルを制御している可能性を示唆した。

NDRG2の発現低下がこれらのシグナル伝達系の異常な活性を惹起し、ひいてはさまざまな成人病を引き起こす可能性を示唆した。

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4件)

1. Villacorta L, Chang L, Salvatore SR, **Ichikawa T**, Zhang J, Petrovic-Djergovic D, Jia L, Carlsen H, Schopfer FJ, Freeman BA, Chen YE. Electrophilic Nitro-Fatty Acids Inhibit Vascular Inflammation by Disrupting LPS-Dependent TLR4 Signaling in Lipid Rafts. *Cardiovasc Res.* 2013, 98:116-24

2. Liu S, Lv J, Han L, Ichikawa T, Wang W, Li S, Wang XL, Tang D, Cui T. A pro-inflammatory role of deubiquitinating enzyme cylindromatosis (CYLD) in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012, 420:78-83
3. Kondo Y, Nagai K, Nakahata S, Saito Y, Ichikawa T, Suekane A, Taki T, Iwakawa R, Enari M, Taniwaki M, Yokota J, Sakoda S, Morishita K. Overexpression of the DNA sensor protein, absent in melanoma 2 and interferon-inducible 16, contributes to tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma with p53 inactivation. *Cancer Sci*, 2012, 103:782-90
4. Tan Y, Ichikawa T (equal author), Li J, Si Q, Yang H, Chen X, Goldblatt CS, Meyer CJ, Li X, Cai L, Cui T. Diabetic Downregulation of Nrf2 Activity via ERK Contributes to Oxidative Stress-Induced Insulin Resistance in Cardiac Cells In Vitro and In Vivo. *Diabetes*, 2011, 60:625-33

[学会発表] (計 9 件)

1. 市川朝永、中畑新吾、森下和広. 新規癌抑制遺伝子 NDRG2 の遺伝子改変マウスを用いたがん発症機構解析. 個体レベル支援活動ワークショップ. 2013年2月6日-7日. 琵琶湖ホテル (滋賀県)
2. 市川朝永、中畑新吾、森下和広. Molecular mechanism of tumor suppressor gene NDRG2 suppression mediated by HTLV-1/Tax. 第85回日本生化学会. 2012年12月14日-16日. 福岡国際会議場 (福岡県)
3. 市川朝永、中畑新吾、森下和広. Chronic inflammation induces DNA promoter methylation of tumor suppressor gene NDRG2. 第71回日本癌学会. 2012年9月19日-21日. ロイトン札幌 (北海道)
4. 市川朝永. がん抑制遺伝子 NDRG2 による HTLV-1/Tax 誘導性 NFkappaB 活性抑制機構の解析. 第23回宮崎造血因子研究会 (招待講演). 2012年09月14日. 宮崎観光ホテル (宮崎県)

5. 市川朝永、中畑新吾、森下和広. がん抑制遺伝子 NDRG2 による HTLV-1/Tax 誘導性 NFkappaB 活性抑制機構の解析. 第5回 HTLV-1 研究会. 2012年8月25日-26日. 東京大学医科学研究所講堂 (東京都)
6. 市川朝永、中畑新吾、森下和広. 癌抑制遺伝子 NDRG2 は炎症反応によって発現が調節される. 第33回日本炎症・再生医学会. 2012年7月5日-6日. ホテル日航福岡 (福岡県)
7. 市川朝永、中畑新吾、近藤雄大、長井健太郎、迫田隅男、森下和広. A critical role of tumor-suppressor NDRG2 for anti-inflammatory function in oral squamous-cell carcinoma. 第70回日本癌学会. 2011年10月3日-5日. 名古屋国際会議場 (愛知県)
8. 市川朝永、中畑新吾、山口良二、西片一朗、森下和広. T細胞特異的 TSLC1 Tg マウスは ATL 様の病態を示す. 第4回 HTLV-1 研究会. 2011年9月18日-19日. 東京大学弥生講堂 (東京都)
9. 市川朝永、中畑新吾、近藤雄大、長井健太郎、迫田隅男、森下和広. 癌抑制遺伝子 NDRG2 による炎症抑制作用. 第32回日本炎症・再生医学会. 2011年7月2日-3日. 国立京都国際会館 (京都府)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川 朝永 (ICHIKAWA TOMONAGA)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：80586230

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：