

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650610

研究課題名(和文)新規のX染色体がん抑制遺伝子Nr kによる細胞増殖抑制機構の解明

研究課題名(英文)Inhibitory mechanism of cell proliferation by a novel X-linked tumor suppressor Nr k

研究代表者

駒田 雅之(Komada, Masayuki)

東京工業大学・生命理工学研究科・准教授

研究者番号：10225568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：1) PTEN阻害タンパク質CSIGがNr k結合分子として同定され、Nr kがAkt経路を抑制して胎盤スポンジオトロホプラストの増殖を抑制することが示唆された。また、Nr k欠損スポンジオトロホプラストで細胞周期停止因子p27の発現低下が見出され、Nr kがp27の発現誘導あるいは分解抑制を引き起こすことが示唆された。

2) 乳腺腫瘍を発症したNr k欠損 マウスにおいて血中および卵巣のエストロゲン・レベルが上昇していることを見出した。また、授乳期および高齢の野生型マウスの卵巣でNr kの発現が検出され、Nr kが卵巣でエストロゲン産生を負に制御することにより、乳腺上皮細胞の過増殖を防いでいることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：1) We identified CSIG (cellular senescence-inhibited gene), a protein which inhibits PTEN in the Akt signal transduction pathway, as a Nr k-binding protein in placenta, suggesting that Nr k inhibits the proliferation of spongiotrophoblasts in placenta by inhibiting the Akt signaling pathway. We also found that the level of a cell cycle inhibitor protein p27 is downregulated in Nr k knockout spongiotrophoblasts, suggesting that Nr k increases p27 gene expression or inhibits p27 protein degradation in spongiotrophoblasts.

2) We found that the estrogen level is elevated in the blood and ovary of mammary tumor-harboring Nr k knockout female mice, suggesting that the high estrogen level in the blood causes mammary tumors in Nr k knockout mice. In addition, we found that Nr k is expressed in lactating and old (~12 months) wild-type mice, suggesting that Nr k suppresses the overgrowth of mammary epithelial cells by downregulating estrogen synthesis in the ovary.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：癌 細胞・組織 シグナル伝達 蛋白質 酵素

1. 研究開始当初の背景

Nrk は、germinal center kinase ファミリーに属する X 連鎖セリン/スレオニンキナーゼである。Nrk を過剰発現させた哺乳動物培養細胞の解析から、Nrk が JNK 経路の活性化やアクチン細胞骨格の制御に関与するとの報告がこれまで散見されていたが、その生理機能は最近まで全く不明であった。私たちは *Nrk* ノックアウトマウスの作製と解析を行い、以下に記すように妊娠♀マウスの胎盤、および妊娠・出産を経験した♀マウス (経産マウス) の乳腺において *Nrk* 欠損が細胞の過増殖を引き起こすことを見出した。

(1) 胎盤の過形成 (*J. Biol. Chem.* 2011) : 胎盤における *Nrk* 欠損により、胎盤スポンジオトロホプラスト細胞 (胎仔由来) が過増殖し、胎盤の過形成を引き起こす。Nrk は胎性中期以降にスポンジオトロホプラストに局限して発現しており、*Nrk* 欠損によるその過増殖は cell autonomous な作用であることが明らかになっている。

(2) 乳腺の過形成 (未発表) : *Nrk* 遺伝子にホモあるいはヘテロ変異をもつ経産♀マウスにおいて、高頻度で乳腺上皮細胞の過増殖による乳腺腫瘍が生じ、それが数ヶ月のうちに増大してマウスを死に至らしめる。経産していない *Nrk* 変異マウスでは、このような乳腺腫瘍は決して見られない。

以上の結果は、*Nrk* が胎盤スポンジオトロホプラストと乳腺上皮細胞に共通の細胞増殖抑制機能をもつこと、さらに *Nrk* が新規の癌抑制遺伝子である可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究課題は、プロテインキナーゼ *Nrk* の欠損が 1) 胎盤スポンジオトロホプラストの増殖を抑制する分子機構、および 2) 乳腺腫瘍の形成を誘導する分子機構を解明することで、*Nrk* による細胞増殖抑制のシグナル伝達機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 胎盤の過形成

- 胎盤で *Nrk* と相互作用するタンパク質を酵母 two-hybrid 法を用いてスクリーニングした。
- *Nrk* 欠損胎盤における細胞周期制御因子の発現レベル異常を網羅的に解析した。

(2) 乳腺腫瘍

- *Nrk* 欠損の乳腺腫瘍の性状を病理組織学的に解析した。
- 乳腺腫瘍を発症した *Nrk* 欠損♀マウスにおける性ホルモンのレベル異常を解析した。
- 成体マウスでの *Nrk* 発現組織を探索した。

4. 研究成果

(1) 胎盤の過形成

- *Nrk* と相互作用する胎盤タンパク質の同定 :
Nrk cDNA をベイトとしたヒト胎盤 cDNA ライブラリーの酵母 two-hybrid スクリーニングを行った。その結果、CSIG (cellular senescence-inhibited gene) という Akt 経路において PTEN を阻害するタンパク質が *Nrk* 結合タンパク質の候補として同定された。したがって、*Nrk* は CSIG を阻害して最終的に Akt 経路を抑制することにより、胎盤スポンジオトロホプラストの増殖を抑制する可能性が示唆された。
- *Nrk* 欠損胎盤における細胞周期制御因子の発現レベルの解析 : 妊娠マウスから正常および *Nrk* 欠損胎盤を解剖により摘出し、顕微鏡下で脱落膜およびラビリンス層からスポンジオトロホプラスト層を物理的に単離した。スポンジオトロホプラスト層のライセートを用いて各サイクリン、CDK、および CDK インヒビターに対する抗体によるイムノブロット解析を行った結果、*Nrk* 欠損胎盤において p27 の発現が低下している傾向が観察された (図 1)。しかし、*Nrk* 欠損胎盤ではスポンジオトロホプラスト層がラビリンス層に食い込んでいたために、ラビ

リンス層の混入なくスポンジオトロホブラスト層を単離することが難しく、サンプル間でラビリンス層の混入の程度の違いによる実験結果のぶれが見られることもあった。そこで、胎盤の切片を用いた抗 p27 抗体による免疫組織染色を行った。その結果、増殖している細胞のマーカーである Ki67 陽性のスポンジオトロホブラスト層の領域において再現性よく p27 の発現低下が見られることが確認された。したがって、*Nrk* 欠損スポンジオトロホブラストの過増殖が p27 の発現低下により引き起こされていること、すなわち *Nrk* がそのシグナル伝達経路の下流で p27 の遺伝子発現の誘導、あるいは p27 タンパク質の分解抑制を引き起こすことが示唆された。



図1: *Nrk* 欠損胎盤における p27 の発現低下

(2) 乳腺腫瘍

- *Nrk* 欠損の乳腺腫瘍の病理組織学的解析：
Nrk 欠損マウスに形成した乳腺腫瘍の組織切片の病理学的解析を行った結果、過増殖した乳腺上皮細胞の他組織への浸潤は見られず、この腫瘍は乳がんではなく乳腺症に似た良性腫瘍であることが明らかとなった。
- 乳腺腫瘍を発症した *Nrk* 欠損♀マウスにおける性ホルモンのレベルの解析：プロゲステロンやエストロゲンのレベル異常が乳がんや乳腺症の原因となることが知られている。そこで、乳腺腫瘍を発症した *Nrk* 欠損♀マウスにおける血中および卵巣のプロゲステロン、エストロゲンのレベルを ELISA 法で測定した結果、正常な野生型マウスと比較してプロゲステロ

ン濃度に有意な差は見られなかったが、エストロゲン濃度が顕著に上昇していることが明らかとなった。乳腺腫瘍を発症していない *Nrk* 欠損♀マウスにおいても、授乳期にエストロゲン濃度が野生型マウスより上昇していることがわかった。したがって、経産の *Nrk* 欠損♀マウスにおける乳腺腫瘍の形成は、血中エストロゲン濃度の上昇によるものであることが示唆された。

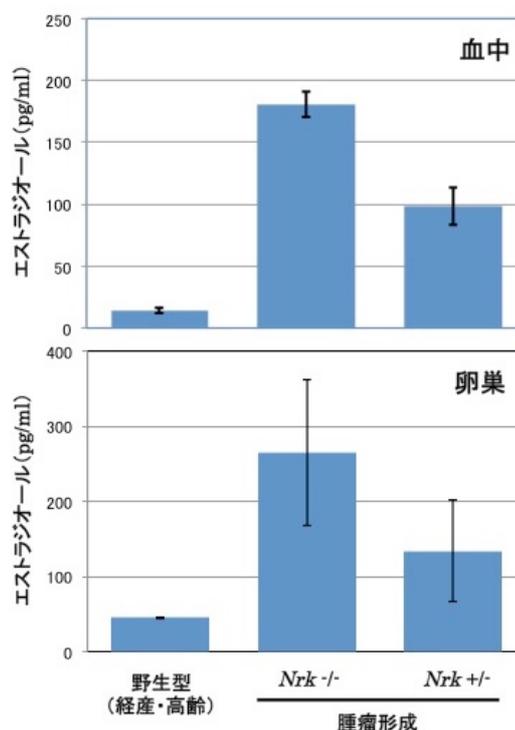


図2: 乳腺腫瘍を形成した *Nrk* 欠損♀マウスにおけるエストロゲン・レベルの上昇

- 成体マウスにおける *Nrk* 発現組織の探索：
Nrk 欠損♀マウスが乳腺腫瘍を発症することから、野生型♀マウスの乳腺組織を用い、免疫ブロット法、免疫組織染色、RT-PCR 法で乳腺上皮細胞における *Nrk* の発現の検出を試みた。しかし、いずれの方法においても *Nrk* タンパク質や mRNA の発現を検出することはできなかった。一方、成体マウスにおける主要なプロゲステロンやエストロゲンの産生・分泌組織は卵巣であることから、卵巣における *Nrk* 発現を免疫ブロ

ット法により調べた結果、授乳期および高齢の野生型マウスの卵巣において Nrk タンパク質の発現が検出された。したがって、Nrk 欠損♀マウスにおける血中エストロゲン濃度の上昇は、卵巣における Nrk の機能喪失により引き起こされていること、すなわち Nrk が卵巣においてエストロゲンの産生を負に制御していることが示唆された。

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 4 件)

1. Tanno, H., Shigematsu, T., Nishikawa, S., Hayakawa, A., Denda, K., Tanaka, T., and Komada, M. (2014) Ubiquitin-interacting motifs confer full catalytic activity, but not ubiquitin chain substrate specificity, to deubiquitinating enzyme USP37. **J. Biol. Chem.** 289, 2415-2423 (査読有)
2. Le Bras, B., Fréal, A., Czarnecki, A., Legendre, P., Bullier, E., Komada, M., Brophy, P.J., Davenne, M., and Couraud, F. (2013) In vivo assembly of the axon initial segment in motor neurons. **Brain Struct. Funct.**, doi:10.1007/s00429-013-0578-7 (査読有)
3. Terada, N., Saitoh, Y., Ohno, N., Komada, M., Yamauchi, J., and Ohno S. (2013) Involvement of Src in the membrane skeletal complex, MPP6-4.1G, in Schmidt-Lanterman incisures of mouse myelinated nerve fibers in PNS. **Histochem. Cell Biol.** 140, 213-222 (査読有)
4. Terada, N., Saitoh, Y., Ohno, N., Komada, M., Saitoh, S., Peles, E., and Ohno, S. (2012) Essential function of protein 4.1G in targeting of MPP6 into Schmidt-Lanterman

incisures in myelinated nerves. **Mol. Cell. Biol.** 32, 199-205 (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. 柳川享世、稲谷卓也、伝田公紀、駒田雅之
「Negative regulation of mammary epithelial cell proliferation by protein kinase Nrk」第 36 回 日本分子生物学会大会 2013 年 12 月 5 日 神戸
2. 伝田公紀、井田加奈子、廣崎賢、岡本直樹、柳川享世、林宣宏、駒田雅之「分娩発来をもたらす胎盤特異的なプロテインキナーゼ Nrk が与えるシグナル伝達」第 36 回 日本分子生物学会大会 2013 年 12 月 4 日 神戸

[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

<http://www.komada-lab.bio.titech.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

駒田 雅之 (KOMADA MASAYUKI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
准教授

研究者番号：10225568

(2) 研究分担者

伝田 公紀 (DENDA KIMITOSHI)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
助教
研究者番号：50212064