

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860242

研究課題名(和文) がん抑制遺伝子NDRG2の発現調節機構および破綻に伴う疾患発症機構の解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of tumor suppressor gene NDRG2 function and regulation of expression

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：新規がん抑制遺伝子NDRG2はPTENリン酸化を制御することで下流シグナルPI3K/AKTおよびNF- κ B系を制御し、発がん機構に関与していることを明らかにした。さらにNDRG2は炎症反応を含むストレス反応で発現が亢進し、negative-feedback的にストレス誘導性シグナルを制御する一方で、長期間の暴露によりプロモーターメチル化により発現が低下することを示唆した。NDRG2の機能、発現調節機構およびその破綻による各種疾患の発症メカニズムを明らかにすることにより、治療、予防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 novel tumor suppressor gene NDRG2 (N-myc downstream-regulated gene 2) regulate signal transduction of PI3K/AKT and NF- κ B (NF- κ B) pathway through the suppression of PTEN phosphorylation, resulting in the involvement of tumorigenesis. We demonstrated that transient stress response including inflammation induces NDRG2 expression via NF- κ B pathway. Therefore, the transient stress-induced signal transduction is negatively feedback regulated by NF- κ B-induced NDRG2 expression. Furthermore, chronic stress promotes the own-regulation of NDRG2 through DNA promoter methylation. These finding suggest that elucidating the mechanism of NDRG2 function and regulation of expression may become a new therapeutic target for many type of disease.

研究分野：医歯薬学

キーワード：癌 シグナル伝達 ストレス

1. 研究開始当初の背景

長期的な外的環境(炎症反応、感染、タバコ、アルコールなど)や内的要因(加齢、ストレスなど)の暴露によって体内の恒常性が破綻し心疾患、動脈硬化、糖尿病等の循環器疾患および腫瘍形成が惹起されることが知られている。生体内の恒常性を維持している因子の破綻がさまざまな疾患を誘導することが示唆され、これらの因子の破綻機構およびそれに伴う疾患発症機構の解析が予防、治療法の開発につながる可能性がある。

NDRG2(N-myc downstream regulating gene 2)は、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。数多くの固形がんが発現量が低下している。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ため、詳しい機能は分かっていない。正常組織では脳、筋組織、心臓、肝臓などで高発現し、低酸素、ストレスなどで発現が調節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 T 細胞白血病 ATL(Adult T-cell leukemia-lymphoma)の発症機構を解明するためにゲノム解析を行っており、NDRG2 は 14q11 領域において染色体転座収集領域に存在し、ATL 特異的に転写低下が見られるがん抑制遺伝子候補として同定した。さらに ATL のみならず口腔がんなどの固形がんでも特異的に発現低下を認め、その原因はプロモーターメチル化であった。口腔がん細胞株に NDRG2 を過剰発現させると AKT 活性が抑制され細胞増殖抑制を認め、また LPS および TNF α により誘導される AKT、IKK、NF κ B 活性および細胞移動能を抑制した。さらに、正常細胞に一過性に炎症反応を付加すると NDRG2 の発現が増加した。しかし、長期的に炎症反応を暴露させると NDRG2 の DNA プロモーター領域がメチル化され発現が低下することを

明らかにした。以上の結果から、正常状態では NDRG2 は炎症反応のようなストレスによって自身の発現を増加させ negative-feedback 的に過度なストレス反応を抑制する一方で、長期的な刺激により発現が減少し、抑制機構が破綻し病的状態に陥ることを示唆した。さらなる解析を行うために作製された NDRG2 欠損マウスはヘテロおよびホモ欠損マウス双方において、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。マウスにおける NDRG2 の発現量は特に脳、心臓、肝臓で高く、ホモ欠損マウスでは完全に発現が消失していた。長期間(24 ヶ月)飼育することによって、NDRG2 欠損マウスでは脱毛および外部から見て体内に明らかな腫瘍の存在が認められ、生存率も低下した。死後解剖してみると肝臓、肺、消化器官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、脂肪肝や心肥大等の循環器疾患も合わせて発症していた。このことから、NDRG2 は外的な刺激に対する防御機構を担っている一方で、長期的な刺激の暴露が発現低下をもたらし、ひいてはその発現低下がさまざまな疾患を発症する可能性が示唆された。これら一連の機構を解析することによって NDRG2 の生体維持機構の解析およびその破綻による各種疾患の発症メカニズムが明らかになり、治療、予防法の開発につながると考えている。

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ている。我々は成人 T 細胞白血病 ATL や口腔がんの解析から NDRG2 が有意に発現低下することを、また NDRG2 が細胞増殖や炎症反応を抑制することを明らかにした。また、NDRG2 欠損マウスではさまざまな組織における腫瘍、心肥大および脂肪肝が認められた。この研究では NDRG2 の炎症抑制機構、

発現調節機構およびその発現低下によって惹起される疾患を解析することで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 が AKT/PTEN 系を調節してがん抑制機構を発揮すること、ATL を含む多くの腫瘍で発現が低下していることを示唆した。この研究では(1)-(3)を解析することによって、NDRG2 の炎症抑制および発現調節機構を解析することで NDRG2 の生体恒常性への関与を明らかにし、その破綻による各種疾患の発症メカニズムを解明することによって治療、予防法の開発につなげる。

(1)NDRG2 による炎症反応抑制機構の解析

これまでの研究から NDRG2 は AKT/PTEN 活性を制御し、細胞増殖や炎症反応を抑制することを明らかにした。詳しい NF κ B、AKT/PTEN 調節機構を解析し、他のストレスに対しても抑制機構を働かせるか検討する。

(2)ストレスによる NDRG2 発現調節機構の解析

NDRG2 は腫瘍組織で DNA プロモーターメチル化により発現が低下していることが明らかになっている。また、炎症反応が NDRG2 の発現を増加させる一方で長期的な炎症反応が DNA プロモーターをメチル化し発現を低下することを示唆した。どのようなストレスが NDRG2 の発現を調節するのか、また、どのようなメカニズムによって起こるのか解析する。

(3)NDRG2 欠損により惹起される疾患の解析

NDRG2 欠損マウスは長期的な飼育により、各種臓器での腫瘍形成、心肥大、脂肪肝が認められた。さらにさまざまな刺激を加えた時の病態を解析する。

4. 研究成果

(1) NDRG2 は AKT/PTEN 情報伝達系ならびに NF κ B 炎症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。NDRG2 ヘテロ欠損マウスを掛け合わせ、妊娠マウスから E12.5 の胎児を取り出し、野生型、NDRG2 ヘテロ、NDRG2 ホモ欠損 Mouse embryonic fibroblast (MEF) およびがん細胞株を含むさまざまな細胞に NDRG2 過剰発現/発現抑制 vector をトランスフェクションし、薬剤で選択して stable cell を作製し、LPS や TNF α を使って炎症を惹起し、AKT/PTEN 情報伝達系の活性状態、IKK の活性および I κ Bs タンパク量の減少、NF κ B (p65 等)の細胞質-核の移動、炎症によって誘導される遺伝子が NDRG2 の発現量によって変化するか解析した。NDRG2 の発現量増加によって、LPS や TNF α によって誘導される AKT/PTEN、IKK および I κ B α リン酸化が減少し、I κ B α 量低下が抑制され、p65 の核内移行が抑制され、炎症性遺伝子(COX-2、MCP-1、MMP9 等)が減少し、この結果、細胞移動能が低下していた。NDRG2 は phosphatase である PP2A を PTEN にリクルートすることによって PTEN リン酸化を制御し、下流シグナルである AKT および IKK 活性を抑制することを明らかとした。

(2) NDRG2 は炎症反応を抑制する一方で、炎症反応やさまざまなストレスによって発現量が調節され、NDRG2 発現量低下が生体防御機構の破綻を招き、ひいてはがん、心臓病などの成人病を引き起こすと推測される。また NDRG2 は多くの腫瘍でプロモーターメチル化により発現低下が認められている。293T、Jurkat に炎症刺激(LPS、TNF α 等)およびウイルス刺激(HTLV-1 等)を暴露すると、初期(-1日)では NDRG2 の発現が増加するが、長期間暴露すると発現が低下することを明らかにした。NDRG2 発現増加機構としては、NDRG2 プロモーター上に存在する NF κ B 結合部位に

p65 が結合することによる NDRG2 プロモーターの活性化が関与し、また、NDRG2 発現低下機構としては、長期間暴露による Polycomb 系の EZH2 の発現増加がヒストン修飾およびプロモーターメチル化に関与している可能性を示唆した。

(3) 我々は NDRG2 欠損マウスが長期間飼育により、多臓器のがん、心肥大、耐糖能異常併せ持つ脂肪肝を示すことを明らかとした。さらに刺激を NDRG2 欠損マウスに付加することによってさらに詳しく NDRG2 欠損によって惹起される疾患を解析した。4-ニトロキノリン N-オキシド (4-Nitroquinoline N-oxido:4-NQO) を長期間投与することにより、マウスの口腔内にヒトの口腔がんに類似した病理組織像および分子機構を呈することが知られている。そこで NDRG2 欠損マウスに同様の処理を行い、NDRG2 欠損によって引き起こされる AKT および炎症反応がどのように発がん機構に作用するか検討した。4-NQO によって NDRG2 欠損マウスは野生型に比べて口腔内により多くの悪性腫瘍が誘発され、舌では AKT/PTEN のリン酸化が亢進していた。さらには転移の可能性も示唆した。

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 2 件)

1. Nakahata S, Ichikawa T (equal author), Maneesaay P, Saito Y, Nagai K, Tamura T, Manachai N, Yamakawa N, Hamasaki M, Kitabayashi I, Arai Y, Kanai Y, Taki T, Abe T, Kiyonari H, Shimoda K, Ohshima K, Horii A, Shima H, Taniwaki M, Yamaguchi R, Morishita K. Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers. *Nat Commun*. 2014, 5:3393 (査読有)

2. 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 (査読有)

{ 学会発表 } (計 9 件)

1. 市川朝永、中畑新吾、森下和広. PTEN リン酸化異常における ATL がん発症機構. 第 19 回造血管腫瘍研究会. 2015 年 1 月 22 日-23 日. グランデはがくれ (佐賀県)

2. 市川朝永、中畑新吾、森下和広. NdrG2 deficient mice improve depressive behavior through the activation of AKT signaling. 第 87 回日本生化学会. 2013 年 10 月 15 日-18 日. 国立京都国際会館 (京都府)

3. 市川朝永、中畑新吾、藤井 雅寛、伊波 英克、森下和広. N-myc down-regulated gene 2 suppresses NF- κ B as a PP2A recruiter for defending constitutive activation of NF- κ B after HTLV-1 infection. 第 73 回日本癌学会. 2014 年 9 月 25 日-27 日. パシフィコ横浜 (神奈川県)

4. 市川朝永、中畑新吾、森下和広. ATL における新規 PTEN キナーゼの同定と機能解析. 第 1 回 HTLV-1 学会. 2014 年 8 月 23 日-24 日. 東京大学医科学研究所講堂 (東京都)

5. 市川朝永、中畑新吾、藤井 雅寛、伊波 英克、森下和広. NDRG2 は PP2A リクルーターとして PTEN 及び NIK 活性調節に関わる. 第 18 回造血管腫瘍研究会. 2014 年 2 月 7 日. がん研究会がん研究所吉田富三記念講堂 (東京都)

6. 市川朝永、中畑新吾、田村知丈、迫田隅男、森下和広. Molecular mechanisms of 4-nitroquinoline 1-oxide(4-NQO)-induced oral carcinogenesis in NDRG2-deficient mice. 第

72 回日本癌学会. 2013 年 10 月 3 日-5 日. パシフィコ横浜 (神奈川県)

7. **市川朝永**, 田村知丈, 中畑新吾, 迫田隅男, 森下和広. Molecular mechanisms of 4-nitroquinoline 1-oxide(4-NQO)-induced oral carcinogenesis in NDRG2-deficient mice. 第 86 回日本生化学会. 2013 年 9 月 11 日-13 日. パシフィコ横浜 (神奈川県)

8. **市川朝永**, 中畑新吾, 藤井 雅寛, 伊波 英克, 森下和広. NDRG2 は PP2A リクルーターとして PTEN 及び NIK 活性調節に関わる. 第 6 回 HTLV-1 研究会. 2013 年 8 月 24 日-25 日. 東京大学医科学研究所講堂 (東京都)

9. **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 NF-kB 活性抑制機構の解析. 第 34 回日本炎症・再生医学会. 2013 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：
出願年月日：
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 (ICHKAWA 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：