

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18日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010年度～2011年度

課題番号：22791476

研究課題名（和文）

前立腺における新規がん抑制遺伝子 REIC/Dkk-3 と相互作用する分子の検索

研究課題名（英文）

A search for the interaction molecules with REIC/Dkk-3 in prostate gland.

研究代表者

落合 和彦（OCHIAI KAZUHIKO）

日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教

研究者番号：30550488

研究成果の概要（和文）：

本研究では、強制発現によりがん細胞選択的アポトーシス誘導能を発揮するがん抑制遺伝子 REIC/Dkk-3 と相互作用する分子の検索を行い、分子間ネットワークの解明を試みた。

ヒト REIC/Dkk-3 を bait としてヒト正常前立腺 cDNA ライブラリーを検索したところ、相互作用候補分子として Tctex-1 を同定した。さらに上記 2 分子の相互作用部位が [-E-X-G-R-R-X-H-] ドメインであることも同定した。本成果は、相互作用分子との併用によってさらに強力ながん選択的治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

REIC/Dkk-3 acts as a tumor suppressor in multiple cancer cell lines by inducing apoptosis through endoplasmic reticulum (ER) stress signaling. However, the intracellular interaction partners of REIC/Dkk-3 have not been fully elucidated. By employing yeast two-hybrid screening, we identified the human dynein light chain, Tctex-1, as a novel interaction partner of REIC/Dkk-3. The binding region of REIC/Dkk-3 with Tctex-1 contains an amino acid sequence motif [-E-X-G-R-R-X-H-] which was previously reported as the Tctex-1 binding domain of dynein intermediate chain (DIC). The link between REIC/Dkk-3 and Tctex-1 may be of significance for understanding the molecular functions of the proteins in ER stress signaling and intracellular dynein motor dynamics, respectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：① 癌 ② 遺伝子 ③ REIC/Dkk-3

1. 研究開始当初の背景

正常線維芽細胞に比較し不死化ヒト線維芽細胞において発現が消失ないし著しく低下

している遺伝子、すなわち不死化関連遺伝子として我々が同定した REIC/Dkk-3 は、がん細胞での強制発現により強力なアポトーシ

ス誘導能を發揮する (Abarzua F. et al. 2005 Cancer Res.). これまでの研究で、REIC/Dkk-3 の強制発現によるアポトーシス誘導のシグナルである JNK 活性化の上流メカニズムとして、Bip や Chop を介する小胞体ストレスのメカニズムが重要であること (Kashiwakura Y. et al. 2008 Cancer Res.), また、HSP70 や HSP90 などのタンパク質の JNK の機能制御への介入が明らかとなっている (Abarzua F. et al. 2007 Int. J. Mol. Med.). さらに、分泌タンパク質である REIC/Dkk-3 は、T リンパ球刺激作用を持つ樹状細胞の分化を促進し (Watanabe M. et al. 2009 Int. J. Oncol.), さらには NK 細胞の活性化因子である IL-7 の分泌を全身性に促すことも明らかとなっている (Sakaguchi M. et al. 2009 J. Biol. Chem.). しかし、REIC を取り巻く分子間相互作用のメカニズムには未解明な部分が多かった。

2. 研究の目的

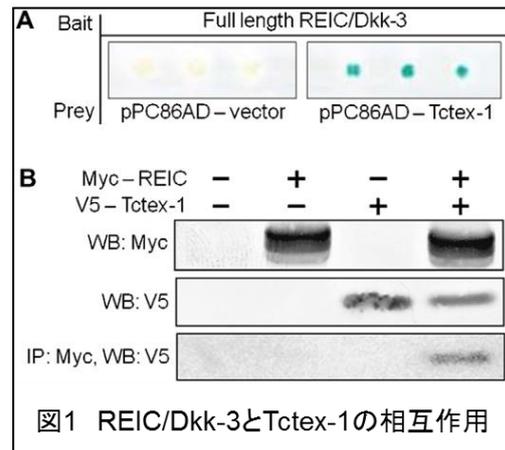
がん細胞選択的にアポトーシスを誘導する REIC/Dkk-3 を取り巻く分子間相互作用ネットワークをヒト組織由来 cDNA ライブラリーの網羅的スクリーニングにより明らかにすることで、本遺伝子と相互作用する分子を同定し、その既知の機能から REIC/Dkk-3 との相互作用様式およびがん抑制効果に及ぼす影響を考察する。また、本遺伝子との併用によりさらにその効果を上昇させる多剤併用方法を構築し、難治性固形がんの新規治療戦略の開発に寄与すべく、REIC/Dkk-3 分子と相互作用する分子の検索を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

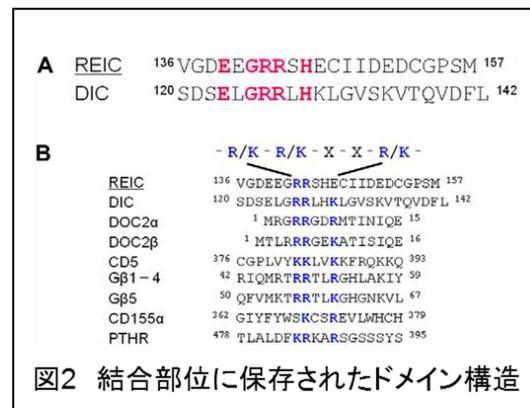
ヒト REIC/Dkk-3 を bait として Yeast two-hybrid assay によりヒト正常前立腺、前立腺がんおよび正常心臓組織 cDNA ライブラリーを対象に相互作用候補遺伝子を検索した。相互作用候補分子については哺乳類細胞内での相互作用様式をより正確に模倣できる実験方法である Mammalian two-hybrid assay 及び in vitro における相互作用を証明するのに適した免疫沈降法で結合の証明と結合部位の詳細な解析を行った。さらに、相互作用部位のアミノ酸配列と類似したモチーフを持つ他の分子について検索し、REIC/Dkk-3 が持つ構造から類推される機能を明らかとした。

4. 研究成果

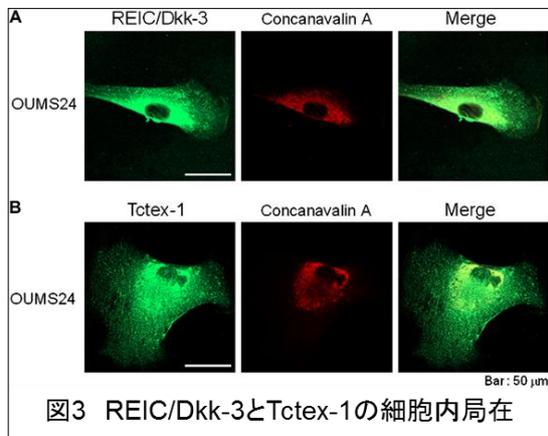
各種 cDNA ライブラリーにつき約 100 万クローンをスクリーニングした結果、相互作用候補分子として細胞構造維持に重要な役割を果たす Dynein light chain のサブユニットである Tctex-1 を同定した (図 1)。



Tctex-1 は細胞の形態維持に必須であり、本相互作用の解明は REIC/Dkk-3 が持つがん選択的アポトーシス誘導能の機序解明に大いに役立つものである。また、本研究によって上記 2 分子の相互作用部位は Tctex-1 が Dynein intermediate chain と相互作用する [-E-X-G-R-R-X-H-] ドメインであることも同定した (図 2)。



さらに、免疫染色により REIC/Dkk-3 と Tctex-1 の細胞内局在が小胞体で一致することを明らかとし、両分子の相互作用が REIC/Dkk-3 が持つ強力ながん細胞特異的アポトーシス活性の原動力である小胞体ストレス誘導と何らかのかかわりを持つことを示唆した (図 3)。



本研究成果は、未解明な部分が多かった REIC/Dkk-3 の細胞内挙動を知るために非常に有用な手掛かりとなるだけでなく、REIC/Dkk-3 を用いた分子創薬による臨床応用に際し、相互作用分子との併用によってさらに強力ながん選択的治療法の開発につながる可能性があり、本研究は当初目的を達成し、一定の成果を得たものと考えられる。

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 6 件)

- ① Kawauchi, K., Watanabe, M., Kaku, H., Huang, P., Sasaki, K., Sakaguchi, M., Ochiai, K., Huh, NH., Nasu, Y., and Kumon, H. (2012)
Preclinical Safety and Efficacy of in Situ REIC/Dkk-3 Gene Therapy for Prostate Cancer.
Acta Med. Okayama, 66(1):7-16. 査読有 http://www.lib.okayama-u.ac.jp/www/acta/pdf/66_1_7.pdf
- ② Ochiai, K., Yoshikawa, Y., Oonuma, T., Tomioka, Y., Hashizume, K., and Morimatsu, M. (2011)
Interactions between canine RAD51 and full length or truncated BRCA2 BRC repeats.
Vet. J., 190(2011):293-295. 査読有 doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.11.001
- ③ Ochiai, K., Watanabe, M., Ueki, H., Huang, P., Fujii, Y., Nasu, Y., Sakaguchi, M., Huh, NH., Kashiwakura, Y., Kaku, H., and Kumon, H. (2011)
Tumor suppressor REIC/Dkk-3 interacts with the dynein light chain, Tctex-1.
Biochem. Biophys. Res. Com., 412(2): 391-395. 査読有 doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.109
- ④ Watanabe, M., Ueki, H., Ochiai, K., Huang, P., Kobayashi, Y., Nasu, Y., Sasaki, K., Kaku, H., Kashiwakura, Y., and Kumon, H. (2011)
Advanced two-step transcriptional amplification as a novel method for cancer-specific gene expression and imaging.
Oncol. Rep., 26(4): 769-776. 査読有 [doi. 10.3892/or.2011.1371](http://doi.org/10.3892/or.2011.1371)
- ⑤ Ochiai, K., Yoshikawa, Y., Yoshimatsu, K., Oonuma, T., Tomioka, Y., Takeda, E.,

Arikawa, J., Mominoki, K., Omi, T., Hashizume, K., and Morimatsu, M. (2011)
Valine 1532 of human BRC repeat 4 plays an important role in the interaction between BRCA2 and RAD51.

FEBS Lett., 585(12): 1771-1777. 査読有 doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.027

- ⑥ Zhang, K., Watanabe, M., Kashiwakura, Y., Li, SA., Edamura, K., Huang, P., Yamaguchi, K., Nasu, Y., Kobayashi, Y., Sakaguchi, M., Ochiai, K., Yamada, H., Takei, K., Ueki, H., Huh, NH., Li, M., Kaku, H., Na, Y., and Kumon, H. (2010)
Expression pattern of REIC/Dkk-3 in various cell types and the implications of the soluble form in prostatic acinar development.
Int. J. Oncol., 37(6): 1495-1501. 査読有 [doi: 10.3892/ijo_00000802](http://doi.org/10.3892/ijo_00000802)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 落合和彦、吉川泰永、近江俊徳、森松正美 (2011. 9. 20)
イヌ乳腺腫瘍関連遺伝子産物 BRCA2 の BRC repeat 4 のアミノ酸が DNA 相同組換え修復に必須な RAD51 ホモ会合体形成に与える影響
第 152 回日本獣医学会学術集会
- ② 近江俊徳、鄭英和、市東正幸、宇田川智野、河上剛、落合和彦、杉山将、土田修一 (2011. 9. 20)
イヌにおけるヒト ABO 組織血液型遺伝子に相同な full length cDNA の同定と特徴
第 152 回日本獣医学会学術集会
- ③ 吉川泰永、森松正美、鈴木優、西村百合香、落合和彦、折野宏一、埤田高広、近澤征史朗、岩井聡美、島村麻子、新井敏郎、渡辺清隆 (2011. 9. 20)
癌抑制遺伝子 BRCA2 の PCR 法による変異解析法の確立
第 152 回日本獣医学会学術集会
- ④ 吉川泰永、森松正美、落合和彦、折野宏一、相田成一、埤田高広、近澤征史朗、岩井聡美、渡辺清隆 (2011. 12. 15)
イヌおよびヒト BRCA2 の BRC repeat 3 領域におけるミスセンス変異の比較
第 34 回日本分子生物学会年会

[図書] (計 0 件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: REIC/Dkk-3 タンパク質の部分領域ポリ

ペプチド

発明者：公文裕巳、渡部昌実、二見淳一郎、
藤井康之、植木英雄、落合和彦

権利者：国立大学法人岡山大学

種類：国際出願

番号：PCT/JP2011/014319

出願年月日：2011年7月1日

国内外の別：国外

○取得状況（計0件）

該当なし

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

該当なし

6. 研究組織

単独研究のため該当なし

(1) 研究代表者

()

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：