

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：特定領域研究（計画研究）

研究期間：2005～2009

課題番号：17013067

研究課題名（和文） タンパク質分解異常による発がん機構の研究

研究課題名（英文） Deciphering the mechanisms underlying cancer development induced by deregulation of proteolysis

研究代表者

中山 敬一（Nakayama Keiichi）

九州大学・生体防御医学研究所・主幹教授

研究者番号：80291508

研究成果の概要（和文）：がんは種々の原因によって引き起こされるが、最終的には細胞周期の制御異常に収斂すると考えられている。われわれは特に静止状態（G0 期）と増殖ループの制御の異常によって発がんにつながる分子機構を明らかにするために、G0 期の制御に関わるタンパク質の分解制御に注目し、モデルマウスを作製して実際にがんが発生するかどうかを検証してきた。その結果、特に G0 期への脱出を抑制する原がん遺伝子産物 c-Myc の分解を制御するユビキチンリガーゼ Fbw7 が発がんの制御や幹細胞維持に重要な役割を果たすことを突きとめた。

研究成果の概要（英文）：Regulation of the exit of cells from the cell cycle is important in the development of multicellular organisms and is also implicated in the maintenance of stem cells. Furthermore, defects in cell cycle exit are thought to be a major cause of cancer. However, the mechanisms responsible for regulation of cell cycle exit have remained largely unknown. Fbw7 is the F-box protein subunit of an SCF-type ubiquitin ligase complex that targets positive regulators of the cell cycle including c-Myc for ubiquitylation and subsequent degradation by the 26S proteasome in order to promote cell cycle exit. Consistent with such a function, mutations of the Fbxw7 gene have been detected in various human malignancies. We have recently generated conventional and conditional *Fbxw7* knockout mice and examined stem cells, progenitor cells, and differentiated cells in the mutant animals for cell cycle defects. Here we summarize the pleiotropic phenotypes of Fbxw7 deficiency in various cell types including T cells, hematopoietic stem cells, and embryonic fibroblasts. Such phenotypes have provided insight into the biological roles of Fbxw7 in cell cycle exit, stem cell maintenance, and oncosuppression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	10,000,000	0	10,000,000
2006年度	10,000,000	0	10,000,000
2007年度	10,000,000	0	10,000,000
2008年度	8,800,000	0	8,800,000
2009年度	8,800,000	0	8,800,000
総計	47,600,000	0	47,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：細胞周期、ユビキチン、タンパク質分解、サイクリン、がん

1. 研究開始当初の背景

がんは種々の原因によって引き起こされるが、最終的には細胞周期の制御異常に収斂すると考えられている。細胞周期の制御因子のほとんどはタンパク質分解機構によって量的制御を受けており、その機構の破綻の多くは発がんの要因になっている。特に細胞が静止状態（G0 期）と増殖ループの制御が異常になると発がんにつながると考えられるが、その分子機構はほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、G0 期と細胞周期の移行に関する制御分子群として、G1 サイクリン(サイクリン D 及びサイクリン E)や c-Myc 等の増殖促進分子と、CDK 阻害分子群等の増殖抑制分子について、タンパク質分解による発現調節機構の解明を中心に研究を進めた。具体的には、これらの分子をユビキチン化依存的に分解する酵素（ユビキチンリガーゼ）本体やその調節因子を単離同定し、そのメカニズムの全貌解明を行った。さらにその個体機能を遺伝子改変動物を作製して解析すると共に、がん細胞におけるこの分解メカニズムの制御異常について検討した。

3. 研究の方法

G0 期と細胞周期との移行に必要な因子（G1 サイクリン、c-Myc、CDK 阻害分子群等）の組換えタンパク質を大腸菌又はバキュロウイルス系を用いて作製し、種々の細胞抽出液を加えて、*in vitro* でユビキチン化反応の構築を試みた。またその際に E2 の特異性や耐熱性等についても検討を加えた。

また上記因子（G1 サイクリン、c-Myc、CDK 阻害分子群等）に対し、各々最もユビキチン化活性の高い細胞抽出液からユビキチンリガーゼを生化学的に精製した。精製がある程度進んだ段階で、液体クロマトグラフィー・質量分析計を用いて、候補ユビキチンリガーゼのタンパク質同定を行った。同定したタンパク質が本当にユビキチンリガーゼであるかどうかを *in vitro* 系にて確認した。

さらに単離したユビキチンリガーゼを生化学的に解析した。まず複合体形成の有無、E2 との特異性の検討、基質特異性の検討、等である。さらに細胞生物学的に検討を加えた。つまり過剰発現系による基質分解の促進の有無の検討、細胞周期に及ぼす影響の検討、がん細胞の性質の変化の有無の検討等であ

る。また RNA 干渉法を用いた遺伝子ノックダウンによって機能抑制実験も行い、同様の項目について検討を加えた。

4. 研究成果

われわれは細胞周期（増殖サイクル）からの脱出（G1 期から G0 期への移行）と再進入（G0 期から G1 期への移行）とのメカニズムを研究しており、さらに G0 期から細胞分化や死に移行する分子機構の研究を進めてきた。これらの機構の破綻はがんに直結することが理論的に考えられており、実際にがん細胞では細胞周期脱出が抑制され、再進入が進んでいる（図 1）。

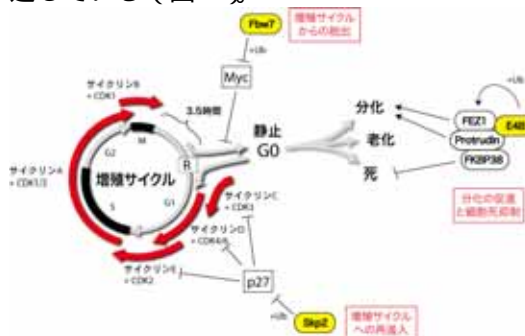


図 1 われわれが発見したユビキチンリガーゼ複合体とその推定される機能

Fbw7 ユビキチンリガーゼは増殖期 静止期へ、Skp2 ユビキチンリガーゼは静止期 増殖期への進行を促す作用を持つ。一方、E4B ユビキチンリガーゼを中心とした複合体は神経の分化と細胞死を調節していることが明らかになっている。

われわれは細胞周期からの脱出にはユビキチンリガーゼ Fbw7 による c-Myc の分解が重要であり、一方で再進入にはユビキチンリガーゼ Skp2 による p27 の分解が必要であることを示してきた。さらに Skp2 や p27 のノックアウトマウスを作製して、生体におけるこれらユビキチンシステムの役割と発がんとの関連を詳細に検討してきた。一方で Fbw7 ノックアウトマウスは胎生 10 日前後で致死となり、強い血管分化の障害が認められた。これは恐らく血管分化に重要な Notch4 を分解できなくなるためであると結論された。

この胎生早期の死亡によって十分な細胞周期解析ができないため、われわれはコンディショナルノックアウトマウスを作製することとした。われわれは哺乳類で最も細胞分化の研究が進んでいる T リンパ球において、

特異的に Fbw7 を欠失させ、どのように分化特異的な細胞周期制御が影響されるかを検討した。T リンパ球は胸腺内において CD4-8- (DN) CD4+8+ (DP) CD4+8- /CD4-8+ (SP) という分化段階を経て成熟していくが、細胞が激しく増殖するのは DN 後期に限られ、DP 以降では細胞周期は停止する。われわれは c-Myc のユビキチン依存性分解を促進する F-box タンパク質である Fbw7 の T 細胞系列におけるコンディショナルノックアウトマウスを作製したところ、胸腺が腫大しており、DP が特異的に増加していることを見出した。BrdU の取込み実験を行うと、DN では Fbw7 の有無にかかわらずその増殖率は高いが、DP では本来細胞周期が停止するべきところ、Fbw7 が欠損していると細胞周期が停止せず、増殖を続けることが判明した(図 2)。このとき c-Myc の異常な蓄積が顕著に認められた。

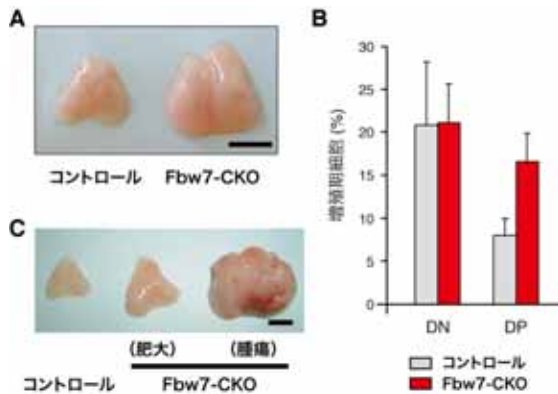


図 2 T 細胞特異的 Fbw7 コンディショナルノックアウトマウスにおける胸腺肥大と発がん

Lck-Cre マウスと Fbw7(Flox) マウスを交配して T 細胞特異的に Fbw7 ユビキチンリガーゼを欠失するマウス(Fbw7 コンディショナルノックアウトマウス)を作製した。このマウスでは胸腺が肥大し(A)、本来細胞周期が停止すべき DP 細胞で細胞周期が停止できなくなる(B)。さらに最終的に胸腺腫が発生する(C)。このことから Fbw7 が G0 期停止に重要な役割を果たす分子であることが判明した。

つまり Fbw7 は DP における細胞周期停止に必須であった。さらに、このマウスでは胸腺原発の T 細胞リンパ腫を発症、死亡することがわかった。これらの知見は、c-Myc が細胞周期からの脱出を阻害しており、Fbw7 が c-Myc をユビキチン化して分解を導くことにより、細胞周期から脱出して G0 期へ向かうことが示唆された。

次にわれわれは骨髄造血幹細胞において条件的に Fbw7 を欠損させることを試みた。これは Fbw7(Flox/Flox);Mx1-Cre マウスに poly(I)(C)を腹腔注射することにより、ほぼ

完全に骨髄細胞より Fbw7 を欠損させることに成功した。このマウスでは幹細胞分画において G0 期の細胞が減少しており、骨髄移植による再建能が著しく低下していた。つまり Fbw7 は G0 期への導入に必須であり、G0 期に長期に維持されることが骨髄幹細胞としての機能に重要な役割を果たすものと推測された。Fbw7 が欠損すると、幹細胞は G0 期に維持されなくなり、細胞周期が回転するために増殖分化プログラムが開始してしまい、その結果として幹細胞が枯渇するものと考えられる(図 3)

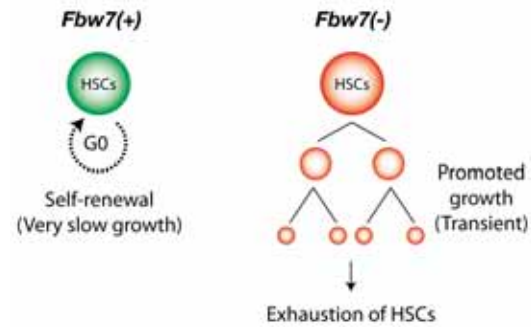


図 3 骨髄特異的 Fbw7 コンディショナルノックアウトマウスにおける幹細胞の枯渇

Mx1-Cre マウスと Fbw7(Flox) マウスを交配して骨髄細胞特異的に Fbw7 ユビキチンリガーゼを欠失するマウス(Fbw7 コンディショナルノックアウトマウス)を作製した。このマウスでは骨髄幹細胞(HSC)中の G0 期の細胞が減少して増殖サイクルに入ってしまう、最終的には HSC の枯渇を来す。このことから Fbw7 が G0 期維持と幹細胞機能に重要な役割を果たす分子であることが判明した。

さらにわれわれは乳腺における Fbw7 コンディショナルノックアウトマウスを作製した。これは Fbw7(Flox/Flox);Blg-Cre マウスを作製し、妊娠させることによって乳腺上皮において Fbw7 を欠失させたものである。この乳腺上皮は著しい低形成と高度のアポトーシスを示した。Fbw7 がないと c-Myc の蓄積を介して p53 経路が活性化され、最終的に細胞周期が強制的に停止させられ、同時にアポトーシスが誘導されているものと考えられた。しかし長期間の後に p53 に変異が入った細胞では、急速に眼科が起ることが観察された(図 4)。



図 4 乳腺特異的 Fbw7 コンディショナルノックアウトマウスにおける晩発性発がん

Blg-Cre マウスと Fbw7(Flox) マウスを交配して乳腺特異的に Fbw7 ユビキチンリガーゼを欠失するマウス(Fbw7 コンディショナルノックアウトマウス)を作製した。このマウスでは乳腺の低形成を示すが、半年から1年で p53 の欠失が起こって急に発がんする。

さらにわれわれは肝臓における Fbw7 のコンディショナルノックアウトマウスを作製し、高度の脂肪肝およびヒト NASH 様の病変が起こることを観察した。さらにこのマウスは過誤腫を発症し、それは Notch1 の分解不全による蓄積とそれに伴う肝幹細胞からの分化異常が原因であることを突き止めた。しかし肝細胞がんの発生は観察されなかった。この知見は、ヒト肝細胞がん患者において Fbw7 の変異・欠失がほとんど報告されていないことに一致する所見である。

またわれわれは Fbw7 ユビキチンリガーゼの基質を網羅的に探索するため、プロテオミクス技術を用いて正常とノックアウトマウスにおける蓄積タンパク質を検出するディフレンシャル・プロテオミクスを開発し、その実証性について検討を行った。その結果、多くの新規基質タンパク質が同定された。現在その新規基質群と発がんの関係を研究中である。

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118件)

Tsukada, Y., Ishitani, T., Nakayama, K. I.: KDM7 is a dual demethylase for histone H3 Lys 9 and Lys 27 and functions in brain development. *Genes Dev.*, 24: 432-437 (2010).

Lin, H. K., Chen, Z., Wang, G., Nardella, C., Lee, S. W., Chan, C. H., Yang, W. L., Wang, J., Egia, A., Nakayama, K. I., Cordon-Cardo, C., Teruya-Feldstein, J., Pandolfi, P. P.: Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature*, 464: 374-379 (2010).

Chan, C. H., Lee, S. W., Li, C. F., Wang, J., Yang, W. L., Wu, C. Y., Wu, J., Nakayama, K. I., Kang, H. Y., Huang, H. Y., Hung, M. C., Pandolfi, P. P., Lin, H. K.: Deciphering the transcriptional complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis. *Nature Cell Biol.*, in press. (2010).

Wang, H., Bauzon, F., Ji, P., Xu, X., Sun, D., Locker, J., Sellers, R. S., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Cobrinik, D., Zhu, L.: Skp2 is required for survival of aberrantly proliferating Rb1-deficient cells and for

tumorigenesis in Rb1+/- mice. *Nature Genet.*, 42: 83-88 (2010).

Nishiyama, M., Oshikawa, K., Tsukada, Y., Nakagawa, T., Iemura, S., Natsume, T., Fan, Y., Kikuchi, A., Skoultchi, A. I., Nakayama, K. I.: CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis. *Nature Cell Biol.*, 11: 172-182 (2009).

Lin, H. K., Wang, G., Chen, Z., Teruya-Feldstein, J., Liu, Y., Chan, C. H., Yang, W. L., Erdjument-Bromage, H., Nakayama, K. I., Nimer, S., Tempst, P., Pandolfi, P. P.: Phosphorylation-dependent regulation of cytosolic localization and oncogenic function of Skp2 by Akt/PKB. *Nature Cell Biol.*, 11: 420-432 (2009).

Susaki, E., Nakayama, K., Yamasaki, L., Nakayama, K. I.: Common and specific roles of the related CDK inhibitors p27 and p57 revealed by a knock-in mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106: 5192-5197 (2009).

Onoyama, I., Tsunematsu, R., Matsumoto, A., Kimura, T., de Alboran, I. M., Nakayama, K., Nakayama, K. I.: Conditional inactivation of Fbxw7 impairs cell-cycle exit during T cell differentiation and results in lymphomatogenesis. *J. Exp. Med.*, 204: 2875-2888 (2007).

Takahashi, A., Ohtani, N., Yamakoshi, K., Iida, S., Tahara, H., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Ide, T., Saya, H., Hara, E.: Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nature Cell Biol.*, 8: 1291-1297 (2006).

Shirane, M., Nakayama, K. I.: Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking. *Science*, 314: 818-821 (2006).

Nakayama, K. I., Nakayama, K.: Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nature Rev. Cancer*, 6: 369-381 (2006).

[学会発表](計180件)

Nakayama, K. I. Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship in ubiquitylation by differential proteomics: Say good-bye to western blotting. Biology of the ubiquitin and the ubiquitin-like systems. Jerusalem. (3/14, 2010).

Nakayama, K. I., Yumimoto, K., Matsumoto, M. Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship by differential proteomics. The 4th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest.

Onna, Okinawa, Japan. (12/2, 2009).

Nakayama, K. I. Two F-box proteins Skp2 and Fbw7 control cell cycle exit and re-entry. ZOMES V: The Fifth International Symposium on the COP9 signalosome, Proteasome, and eIF3: At the interface between signaling & proteolysis. Yokohama. (11/12, 2008).

Nakayama, K. I. Cell cycle control during T-cell development. Japan-German Immunology Seminar "International Conference on Immune Regulation in Health and Disease". Fukuoka. (11/5, 2008).

中山敬一, 白根道子. プロトルーディン は Rab11-GDP に結合し、特定の方向へ向かう膜輸送により神経突起形成を起こす. 第 60 回日本細胞生物学会大会. 横浜. (6/30, 2008).

Nakayama, K. I., Onoyama, I., Tsunematsu, R., Matsumoto, A., Nakayama, K. Conditional inactivation of Fbxw7 results in a defect in cell cycle exit and tumorigenesis. Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle". Cold Spring Harbor, NY. (5/18, 2008).

Nakayama, K. I. Fbw7 is required for G0 maintenance and tumor suppression: Lessons from a series of conditional knockout mice. The Second International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest. Onna, Okinawa, Japan. (3/26, 2007).

Nakayama, K. I. Fbw7 is a key regulator of cell cycle exit during development. US-Japan Cooperative Research Workshop on Mouse Models for Cell Cycle and Ubiquitin-mediated Degradation. Frederick, MD, USA. (9/7, 2006).

Nakayama, K. I., Onoyama, I. Fbw7 is a key regulator of cell-cycle arrest and tumorigenesis during development. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Kyoto, Japan. (6/23, 2006).

Nakayama, K. I., Shirane, M. Protrudin-Rab11 system regulates directional membrane traffic to induce neurite formation. International Symposium on "Membrane Dynamics and Cell Regulation". Fukuoka. (6/29, 2005).

[図書](計2件)

中山敬一, 中山啓子. 細胞周期:細胞増殖の制御メカニズム. 細胞周期:細胞増殖の制御メカニズム (中山敬一, 中山啓子 編) pp. メディカル・サイエンス・インターナショナル (東京). (2008).

中山敬一. 細胞周期ブレーキ p27 の分解

と発がん. 発がんの分子機構と防御 (笹月健彦, 野田哲生 編) pp. 120-134. 東京大学出版会 (東京). (2006).

[産業財産権]

出願状況(計2件)

名称: タンパク質の定量方法

発明者: 中山敬一、松本雅記

権利者: 国立大学法人九州大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-169045

出願年月日: 2009年7月17日

国内外の別: 国外

名称: 抗肥満薬のスクリーニング方法

発明者: 中山敬一、洲崎悦生

権利者: 国立大学法人九州大学

種類: 特許

番号: 特願 2006-160965

出願年月日: 2006年6月9日

国内外の別: 国外

取得状況(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:

[その他]

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 敬一 (Nakayama Keiichi)

九州大学・生体防御医学研究所・主幹教授

研究者番号: 80291508

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし