

様式 C-19 (記入例)

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17014011

研究課題名(和文) がん細胞の異常増殖の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of tumor cell growth

研究代表者

秋山 徹 (AKIYAMA TETSU)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：70150745

研究成果の概要(和文): p53 の標的遺伝子 D8 を見出し、ゲノムストレスにより誘導されるアポトーシスに関わることを見出した。また、APC により活性化される GEF 分子 Asef および Asef2 を見出し、腸管腫瘍の形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。Asef および Asef2 は大腸がん治療の新たな分子標的となることが期待された。

研究成果の概要(英文): We identified D8 as a p53 target gene and found that D8 is involved in genome stress-induced apoptotic cell death. We also identified Asef and Asef2, guanine nucleotide exchange factors that are activated by the tumor suppressor APC, and found that they are critically involved in intestinal adenoma formation and tumor progression and may be promising molecular targets for therapy of colorectal tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	72,000,000	0	72,000,000
2006年度	79,000,000	0	79,000,000
2007年度	79,000,000	0	79,000,000
2008年度	83,000,000	0	83,000,000
2009年度	78,800,000	0	78,800,000
総計	391,800,000	0	391,800,000

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：

キーワード：がん抑制遺伝子、がん遺伝子、アポトーシス、増殖、p53、APC、Asef

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子の異常により「がん化」した細胞は、細胞周期の異常、脱分化、細胞死からの脱却等の性質を獲得することが明らかになった。
(2) より悪性度を増すステップとして、細胞間の接着が抑制されると同時に運動能が増し、より高い浸潤・転移能を有するようになることや、この過程で周囲の間質との相互作用、

血管新生の促進なども必要不可欠であることが明らかになった。

(3) ヒト等の全ゲノム解析の成果によって生命科学は大きく様変わりしつつあり、さらに日々新技術が次々と生み出されるようになった。

2. 研究の目的

「がん細胞の異常増殖の分子機構」を明らかにする為に、

増殖促進シグナル(主に Wnt シグナル)、増殖抑制および細胞死誘導シグナル(主に APC および p53 シグナル)の個々の伝達機構を詳細に明らかにし、さらに相互のクロストークを解明すること、

シグナル伝達経路と細胞分化、細胞接着、細胞運動などとの関連、がん細胞における異常を解明すること(特に APC により活性化される新規 GEF 分子 Asef/asef2 と APC による細胞接着、運動・浸潤の制御機構)、

がん幹細胞の自己複製、分化に関わる遺伝子群を同定することを目的として研究を進める。常に分子標的治療薬開発への応用を視野に入れて研究を進める。

3. 研究の方法

(1)DNA ストレス、p53 により誘導される RNA 結合蛋白質 D8 の機能解析

D8 のゲノムストレス (camptothecin 処理) を介したアポトーシス誘導における役割を RNAi、過剰発現などの手法を用いて明らかにする。特に、D8-Ago2 複合体および miRNA の関与に着目して解析を進める。

D8 欠失マウスの表現形質の異常を詳細に解析する。

(2)APC-Asef 複合体の機能解析

Asef/Asef2 が腺腫形成に重要な役割を果たす機構を、運動・浸潤能、血管新生などの観点から解明する。

HGF、bFGF、VEGF、EGF の作用により Asef/Asef2 が lamellipodia に集積し細胞運動を引き起こすに至るシグナル伝達機構を明らかにする。

X 線解析により Asef の立体構造を明らかにし、Asef の活性制御機構を明らかにする。

(3)がん幹細胞の解析

脳腫瘍、大腸がん、卵巣がんなどの手術検体を血清非存在下、EGF、bFGF を含む培地で sphere として培養することにより、がん幹細胞を濃縮する。RNAi ライブラリを導入し CD133、Lgr5 などの幹細胞マーカーの発現および造腫瘍能を調べることにより、自己複製、分化に関わる遺伝子群を同定し、それらの機能を解析する。

4. 研究成果

(1)DNA ストレス、p53 により誘導される RNA 結合蛋白質 D8 の機能解析

DNA ストレスにより p53 を介して RNA 結合蛋白質 D8 (仮称) の発現が増大することを見出した。ノックダウン実験から、D8 は p53、DNA ストレスによるアポトーシスの誘導に重要な役割を果たしていることが明らかになった。アポトーシスの誘導は、Bim を

はじめとした BH3-only family mRNA の 3' UTR に D8 が結合して mRNA の安定化および翻訳の促進を引き起こすためであると考えられた。D8 は mRNA-Ago-miRNA 複合体の形成を阻害することによりこのような作用を及ぼすと考えられた。D8 欠失マウスはサイトカインの発現制御機構、アレルギー応答に異常があり、D8 の生理的重要性が実証された。

(2)APC-Asef 複合体の機能解析

大腸癌で見出される断片化した変異 APC による GEF 分子 Asef の恒常的活性化の重要性を明らかにするために Asef^{-/-}マウスを作製し、APC に胚性変異があり腸管に多数の腺腫を発症する Min マウスとかけあわせたところ、腺腫の発症が激減することが明らかとなった。したがって、変異 APC 断片による Asef の活性化は腺腫発症に決定的に重要な役割を果たしていると考えられる。さらに、Asef はメタロプロテアーゼ 9、13 などの発現を誘導することにより腺腫、腫瘍の浸潤能を高めることを明らかにした。また、ヒト大腸癌では 80% 程度の症例で Asef の発現亢進が見いだされた。

HGF、bFGF、EGF、VEGF 刺激により APC/Asef 複合体が PI3K あるいは Ras 依存的にラフリング膜へ濃縮し、細胞運動の活性化を引き起こすことを明らかにした。また、Asef は HGF、bFGF、VEGF による血管内皮細胞の運動、血管新生に重要な役割を果たしていることが判明した。さらに、Asef^{-/-}マウスでは皮下移植した B16 メラノーマの造腫瘍性と腫瘍血管新生が Asef^{+/+}マウスと比べて顕著に抑制された。これらの知見から、Asef は APC に変異をおこした細胞自身の運動能・浸潤能促進と血管新生の両面から癌化に重要な役割を果たしていると考えられた。Asef^{-/-}マウスは正常に発生し大きな異常を示さないことから、Asef は癌治療薬の有望なターゲットに成り得ると期待される。

この他、Asef の立体構造決定、各種 APC および beta-catenin 結合蛋白質の機能を解析し、splicing、APC 分解、Dlg シグナル、cadherin 輸送、複製などに関する重要な新知見を得た。

(3)がん幹細胞の解析

神経膠芽腫、大腸がん、卵巣がんについて、NAi ライブラリを用いることにより CD133、Lgr5 などの幹細胞マーカーの発現および造腫瘍能に関わる遺伝子を多数同定した。Notch、Wnt シグナルなどの構成要素に加えて、機能未知の 1 回膜貫通タンパク質、7 回膜貫通タンパク質、プロテインキナーゼ、プロテインフォスファターゼ、転写因子をコードする遺伝子が見出され、これらの機能の解析を進めた。

上記の研究成果はすべて我々が独自に見出

した知見をもとに研究を展開して得られたもので、世界的にみてもユニークで独自性が高く、当該研究領域に大きなインパクトを与えるものである。

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 63 件)

Nakamura T., Hayashi T.,
Mimori-Kiyosue Y., Sakaue F.,
Matsuura K., Imura S., Natsume T.,
and T. Akiyama. The
PX-RICS/14-3-3 ζ / θ complex couples
N-cadherin/ β -catenin with
dynein/dynactin to mediate its export
from the endoplasmic reticulum. *J.*
Biol. Chem. in press. 査読あり
Kawasaki Y., Jigami T., Furukawa
S., Sagara M., Echizen K., Shibata
Y., Sato R., and Akiyama T. The
adenomatous polyposis coli-associated
guanine nucleotide exchange factor
Asef is involved in angiogenesis. *J Biol*
Chem. 285, 1199-207, 2010. 査読あり
Taniue K., Nishida A., Hamada F.,
Sugie A., Oda T., Ui-Tei K., Tabata
T., and Akiyama T. Sunspot, a link
between Wingless signaling and
endoreplication in
Drosophila. *Development* 137,
1755-1764 (2010). 査読あり
Sagara M., Kawasaki Y., Iemura S.,
Natsume T., Takai Y., Akiyama T.
Asef2 and Neurabin2 cooperatively
regulate actin cytoskeletal
organization and are involved in
HGF-induced cell migration.
Oncogene 28, 1357-1365 (2009). 査
読あり
Kawasaki Y., Tsuji S., Sagara M.,
Echizen K., Shibata Y., and
Akiyama T. APC and Asef function
downstream of the HGF receptor and
phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol.*
Chem. 284, 22436-22443, 2009. 査

読あり

Kawasaki Y., Tsuji S., Muroya K.,
Furukawa S., Shibata Y., Okuno M.,
Ohwada S., and Akiyama T. The
APC-associated exchange factors Asef
and Asef2 are required for adenoma
formation in *Apc*^{Min/+} mice. *EMBO Rep.*
10, 1355-1362, 2009. 査読あり
Nakamura T., Hayashi T.,
Nasu-Nishimura Y., Sakaue F., Okabe
T., Ohwada S., Matsuura K., Akiyama
T. PX-RICS mediates ER-to-Golgi
transport of the
N-cadherin/ β -catenin complex. *Genes*
Dev. 22, 1244-1256 (2008). 査読あり
Kawasaki Y., Sagara M., Shibata S.,
Shirouzu M., Yokoyama S., Akiyama
T. Identification and Characterization
of Asef2, a guanine-nucleotide
exchange factor specific for Rac1 and
Cdc42. *Oncogene* 26, 7620-7627 (2007).
査読あり
Haraguchi K., Hayashi T., Jimbo T.,
Yamamoto T., Akiyama T. Role of the
kinesin-2 family protein, KIF3, during
mitosis. *J Biol. Chem.*
281, 4094-4099 (2006). 査読あり

[学会発表](計 5 件)

分子生物学会 2009.12 (横浜)
Role of the APC-associated guanine
nucleotide exchange factor Asef/Asef2
in intestinal adenoma formation
川崎善博、辻真之介、室谷研、古川史織、
大和田進、秋山徹
日本癌学会 2009.10 (横浜)
Role of the APC-associated guanine
nucleotide exchange factor Asef/Asef2 in
intestinal adenoma formation
川崎善博、辻真之介、室谷研、古川史織
大和田進、秋山徹
日本癌学会 2008.10 (名古屋)
Role of Asef2, a guanine-nucleotide
exchange factor specific for Rac1 and
Cdc42
相良将樹、川崎善博、秋山徹
分子生物学会 2008.7 (横浜)

Role of the APC-associated guanine nucleotide exchange factor Asef in signal transduction and angiogenesis
川崎善博、地神貴史、古川史織、相良将樹、柴田葉子、佐藤梨奈、秋山徹
日本癌学会 2007.10 (横浜)

Role of the APC-associated guanine nucleotide exchange factor Asef in intestinal adenoma formation
辻真之介、川崎善博、秋山徹

Identification and Characterization of Asef2, a guanine-nucleotide exchange factor specific for Rac1 and Cdc42
相良将樹、川崎善博、秋山徹

〔図書〕(計3件)

高井義美、秋山 徹、東京大学出版会「がん細胞の生物学」2006、179
秋山 徹、河府和義、羊土社「阻害剤活用ハンドブック」2006、468
秋山 徹、河府和義、羊土社「細胞・培地活用ハンドブック」2007、397

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：大腸癌抑制遺伝子関連蛋白質
発明者：秋山 徹
川崎 善博
権利者：第一三共株式会社
種類：特許
出願番号：2009-208771
出願年月日：21年9月10日
国内外の別：国内

取得状況(計1件)

名称：アポトーシス誘導遺伝子およびその利用
発明者：秋山 徹
権利者：秋山 徹
大正製薬株式会社
種類：特許
番号：特許第 4429269 号
取得年月日：平成 22 年 3 月 10 日
国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/5ken/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋山 徹 (AKIYAMA TETSU)
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授
研究者番号：70150745

(2)研究分担者

那須 亮 (NASU RYO)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：30466859

川崎 善博 (KAWASAKI YOSHIHIRO)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号:10376642

中村 勉 (NAKAMURA TSUTOMU)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：10376642

(3)連携研究者

()
研究者番号：