

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08624

研究課題名(和文) 腫瘍抑制分子RASSFの多面的効果に関する研究

研究課題名(英文) Study of tumor suppressors RASSF on pleiotropic effect

研究代表者

岩佐 宏晃 (Iwasa, Hiroaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：70582188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Ras association domain family (RASSF) 蛋白質は腫瘍抑制分子と作用を共にすることが知られており、その発現抑制がヒト癌で高頻度に認められている。本研究では、RASSF蛋白質と共に作用する多数の新たな腫瘍抑制分子の存在が明らかになった。それらの分子の中には、遺伝子発現を制御する分子、細胞死を抑制する分子、或いは、細胞内輸送に関わる分子が含まれていた。これらのことから、RASSFは異なる機能をもつ複数の分子と相互作用することにより、腫瘍抑制分子として多面的効果を発揮すると考えられた。今後、さらなる進展すれば、RASSFを起点とする多面的ながん治療の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療を難しくしている理由は、がん細胞の進化による遺伝的不均一性のためと考えられる。腫瘍はがん遺伝子やがん抑制遺伝子の突然変異をもつクローンからなる遺伝的に不均一な細胞集団であるため、患者は悪性化したがん細胞との軍拡競争に敗北することになる。このようながん細胞の進化に対抗する術を私たちはまだ知らない。突然変異が起こらない宿主が宿敵がん細胞の進化に追いつくためには、多様な効果を発揮する腫瘍抑制遺伝子を保有する(活性化する)必要がある。本研究で明らかにされたように、RASSFには多様な腫瘍抑制効果があることから、未だ確立していないがん進化に対抗するための新しい基盤研究になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Ras association domain family (RASSF) cooperates with tumor suppressors. The RASSF tumor suppressor genes are frequently inactivated in many types of human cancer. In this study we found that several tumor suppressors act through RASSF. Among them, these molecules are capable of anything such as gene expression, cell death, and cellular export. These findings suggest that RASSF is pleiotropic, potentially causing such diverse effects as tumor suppressor. Thus we expect that pleiotropic intervention for cancer therapy will be developed on the basis of RASSF family.

研究分野：分子生物学

キーワード：シグナル伝達 腫瘍抑制 多面的効果 RASSF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 低分子 G 蛋白質である Ras は幅広い細胞内プロセスを調節することが知られている。これまでに Ras に結合する蛋白質は数多く同定されており、その中には Ras の活性化制御に関わるものや Ras の下流で機能するエフェクター分子などが知られている。Ras association domain family (RASSF) 蛋白質はその名の由来通り、Ras に結合するエフェクター分子として機能すると考えられてきた。私たちは RASSF6 に着目して研究を行ってきたが、RASSF1 と同様の腫瘍抑制作用が RASSF6 にあることを報告している。さらに、私たちは RASSF6 には RASSF1 とは異なる生理活性があることを報告しており、世界の RASSF 研究における独自路線として研究実績を着実に積み上げている。

(2) ヒトがんにも目を向けると、RASSF 遺伝子座の多くで不活化されたことによる発現抑制が生じているため、RASSF 遺伝子には腫瘍抑制効果があると云われている。一方、当研究室では、過去、酵母ツーハイブリッド法、質量分析、遺伝学的相互作用解析などによって RASSF6 と結合活性を有する蛋白質を同定してきた。多くの場合、特異的に相互作用する蛋白質には共通する構造的な特徴やドメインが存在するが、RASSF6 と相互作用する蛋白質にはあまり共通する構造が見出せない。加えて、これらの相互作用蛋白質には共通する機能はなく、それぞれ固有の機能を持ち合わせている。このことから、RASSF6 には多種多様な蛋白質との相互作用を通じて、多面的な効果を発揮することが予想されていた。

2. 研究の目的

(1) 網膜芽細胞腫の原因遺伝子として同定された Rb は、腫瘍抑制因子としてこれまでに研究されている。転写リプレッサーとして機能する Rb はリン酸化によって制御されているが、私たちはこの過程に RASSF6 が関与することを見出していた。一方、RASSF6 は Rb との共発現によって分子修飾と細胞内局在変化を起こすが、この二つのイベントには相関関係があることを示しつつあった。これらの予備的知見を元に、本研究では、RASSF6 と Rb との関係性を明らかにすることを目的とした。

(2) 私たちは、酵母ツーハイブリッド法によって RASSF6 と結合活性を有する蛋白質として脂質修飾結合蛋白質である UNC119 を同定している。本研究では、RASSF6 の生理活性における UNC119 の役割について検証を行った。さらに、UNC119 の機能的な側面から、RASSF6 がもたらす役割についても併せて検証を行った。

(3) 私たちは、RASSF6 がユビキチンリガーゼである MDM2 との相互作用を通じて p53 を制御することをこれまでに報告している。この研究を行ってきた過程で、私たちは RASSF6 が抗アポトーシス分子である BCL-XL に相互作用することを見出していた。本研究では、RASSF6 と BCL-XL との相互作用にどのような役割があるかについて明らかにすることを目的とした。

(4) これまでに私たちは、RASSF6 の細胞生物学的な解析を精力的に行ってきた。多くの場合、RASSF6 は細胞質中に局在するが、ある局面では、核内に移行することが判明した。このことから、RASSF6 が核内でも機能することが予想された。本研究では、RASSF6 と相互作用する候補分子 BAF60a に着目し、その相互作用がもたらす生理的意義を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Rb と RASSF6 との相互作用については生化学的手法、細胞生物学的手法により検出した。また、Rb の標的となる遺伝子群について過剰発現ならびに遺伝子発現抑制を細胞レベルで行い、細胞死、細胞周期、発現変動などの表現型について生化学的手法、細胞生物学的手法、分子生物学的手法によって解析を行った。加えて、遺伝子改変技術 (CRISPR) による遺伝子改変細胞を作製し、遺伝子発現抑制と併せた遺伝学的解析についても行った。

(2) UNC119 と RASSF6 との相互作用については生化学的手法、細胞生物学的手法により検出した。また、p53 の標的となる遺伝子群について過剰発現ならびに遺伝子発現抑制を細胞レベルで行い、細胞死、細胞周期、発現変動などの表現型について生化学的手法、細胞生物学的手法、分子生物学的手法によって解析を行った。加えて、遺伝子改変技術 (CRISPR) による遺伝子改変細胞を作製し、遺伝子発現抑制と併せた遺伝学的解析についても行った。さらに、本研究過程において、UNC119 による KRAS への機能制御が判明したため、前述した研究手法を同様に適用した。

(3) RASSF6 および BCL-XL についてドメインを欠損させた変異蛋白質を発現するプラスミドベクターを多数作製した。全長蛋白質と欠損変異蛋白質、欠損変異蛋白質と欠損変異蛋白質などを組み合わせて細胞に共発現させ、その細胞抽出物を用いた免疫沈降実験を行った。また、p53 の発現誘導やアポトーシスなどの表現型に必要な各ドメインについての解析も行った。さらに、BCL-XL が RASSF6 と MDM2 の相互作用にどのような影響を及ぼすかについて同様の解析を行った。

(4) BAF60a と RASSF6 との相互作用については生化学的手法、細胞生物学的手法により検出し

た。また、p53の標的となる遺伝子群について過剰発現ならびに遺伝子発現抑制を細胞レベルで行い、細胞死、細胞周期、発現変動などの表現型について生化学的手法、細胞生物学的手法、分子生物学的手法によって解析を行った。加えて、遺伝子改変技術(CRISPR)による遺伝子改変細胞を作製し、遺伝子発現抑制と併せた遺伝学的解析についても行った。

4. 研究成果

(1) RASSF6にはRbに対して二つの効果があることが判明した。RASSF6にはRbとその脱リン酸化酵素との相互作用を橋渡しするスキャフォールド活性があることが示された。さらに、RASSF6がポリコム群蛋白質複合体構成因子であるBMI1に作用し、ユビキチン化を促すことで分解誘導することが示された。この場合、BMI1の標的であるINK4A/B遺伝子座の脱抑制が起こり、CDK阻害因子であるp16の発現上昇によるRbの不活化といった一連のプロセスが誘導される。つまり、RASSF6にはRbに対して二通りの負の制御活性があることを意味している。本研究は平成30年にMolecular and Cellular Biology誌に報告された。

(2) UNC119はRASSF6と相互作用することによってRASSF6-MDM2-p53の経路を制御することが判明した。具体的には、UNC119の存在下でRASSF6とMDM2の相互作用はより頻度を増す。その結果、MDM2フリーとなったp53は細胞周期停止や細胞死を実行することになる。以上のことから、UNC119には腫瘍抑制活性があることを示唆された。本研究は平成30年にCancer Science誌に報告された。

本研究では、さらに研究を飛躍させるために、UNC119Aに焦点を当てて解析を行った。UNC119Aには構造や機能が類似する分子が知られており、PDE deltaはそのうちの一つである。PDE deltaはRASと結合することで膜結合から細胞質局在へと促すことが報告されているが、UNC119Aに同様に機能があるかについては不明であった。今回、私たちはUNC119AがKRASと結合することを見出した。しかし、PDE deltaとKRASとの結合様式とは異なり、UNC119Aは別の作用によってKRASと結合することが判明した。さらに、UNC119Aとの結合により、KRASの潜在的な腫瘍化活性が抑制されること、その際、RASSF6-MDM2-p53の経路が働くことについて検証を行っている。本研究は助成終了後も継続中である。

(3) 本研究では、BCL-XLはRASSF6と結合することによってRASSF6がもつ腫瘍抑制機能を抑制することが明らかとなった。具体的には、RASSF6が増強するMDM2の自己ユビキチン化、その後に続いて起こるp53の安定化、その結果として起こるアポトーシスの誘導、これら一連のイベントに対してBCL-XLは阻害的に作用することが示された。本研究は平成29年にGenes to Cells誌に報告された。

(4) 本研究では、RASSF6と相互作用する核内分子があると類推し、新規の相互作用分子を探索した。その結果、SWI/SNFクロマチンリモデリング因子の一つであるBAF60aがRASSF6と相互作用することを見出した。興味深いことに、BAF60aはp53を制御することが報告されており、このことは私たちが同定した新規RASSF6相互作用分子がp53を制御するという類推をより確証あるものへと促した。現在、BAF60aによるp53の制御機構にRASSF6がどのように関わるかについて検証を行っている。本研究は助成終了後も継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwasa Hiroaki, Hossain Shakhawoat, Hata Yutaka	4. 巻 75
2. 論文標題 Tumor suppressor C-RASSF proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 1773 ~ 1787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-018-2756-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hossain Shakhawoat, Iwasa Hiroaki, Sarkar Aradhan, Maruyama Junichi, Arimoto-Matsuzaki Kyoko, Hata Yutaka	4. 巻 38
2. 論文標題 The RASSF6 Tumor Suppressor Protein Regulates Apoptosis and Cell Cycle Progression via Retinoblastoma Protein	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00046-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwasa Hiroaki, Sarkar Aradhan, Shimizu Takanobu, Sawada Takeru, Hossain Shakhawoat, Xu Xiaoyin, Maruyama Junichi, Arimoto-Matsuzaki Kyoko, Withanage Kanchanamala, Nakagawa Kentaro, Kurihara Hidetake, Kuroyanagi Hidehito, Hata Yutaka	4. 巻 109
2. 論文標題 UNC119 is a binding partner of tumor suppressor Ras-association domain family 6 and induces apoptosis and cell cycle arrest by MDM2 and p53	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2767 ~ 2780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Lu Yuxiong, Maruyama Junichi, Kuwata Keiko, Fukuda Hiroyuki, Iwasa Hiroaki, Arimoto-Matsuzaki Kyoko, Sugimura Haruhiko, Hata Yutaka	4. 巻 16
2. 論文標題 Doublecortin-like kinase 1 compromises DNA repair and induces chromosomal instability	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 130 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2018.10.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maruyama Junichi, Inami Kazutoshi, Michishita Fumiyoshi, Jiang Xinliang, Iwasa Hiroaki, Nakagawa Kentaro, Ishigami-Yuasa Mari, Kagechika Hiroyuki, Miyamura Norio, Hirayama Jun, Nishina Hiroshi, Nogawa Daichi, Yamamoto Kouhei, Hata Yutaka	4. 巻 16
2. 論文標題 Novel YAP1 Activator, Identified by Transcription-Based Functional Screen, Limits Multiple Myeloma Growth	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 197 ~ 211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-17-0382	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Xu Xiaoyin, Iwasa Hiroaki, Hossain Shakhawoat, Sarkar Aradhan, Maruyama Junichi, Arimoto-Matsuzaki Kyoko, Hata Yutaka	4. 巻 22
2. 論文標題 BCL-XL binds and antagonizes RASSF6 tumor suppressor to suppress p53 expression	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 993 ~ 1003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12541	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwasa H, Hossain S, Hata Y.	4. 巻 75
2. 論文標題 Tumor suppressor C-RASSF proteins.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 1773 ~ 1787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-018-2756-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shakhawoat Hossain, Hiroaki Iwasa, Yutaka Hata
2. 発表標題 RASSF6 tumor suppressor protein regulates apoptosis and the cell cycle via Retinoblastoma protein
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----