

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2006～2010

課題番号：18109003

研究課題名（和文） 足場依存性・非依存性細胞増殖の分子機構

研究課題名（英文） Molecular Mechanism of Anchorage-Dependent and -Independent Proliferation

研究代表者

岡山 博人 (OKAYAMA HIROTO)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40111950

研究成果の概要（和文）：身体を形成するほとんどの細胞は、細胞外マトリックスタンパクを足場にして増える。足場がないと細胞は、G1 期に増殖を停止し死に至る。一方、癌細胞は、普遍的に足場が無くとも増殖できる能力を獲得している、この獲得が、癌細胞が腫瘍形成を行い転移するためには必要であると考えられている。本研究は、これまで全く未解明であった、正常細胞の増殖制御の根幹であり癌化の根底機構である足場依存性・非依存性増殖機構の解明を目指し、ほぼその全貌の解明を終えた。その結果、これまで考えられたなかで最も効果が期待される新たな制癌の標的因子が浮かび上がった。

研究成果の概要（英文）：Virtually all the cells composing solid organs of adult animals require an anchorage to the extracellular matrix and without this, arrest in G1 phase and die of apoptosis. Upon malignant transformation, these cells acquire the ability to proliferate without anchorage. This ability is generally believed to underlie their tumorigenicity. In this research project, we sought to understand the molecular mechanism controlling anchorage-dependent and -independent proliferation, which remains totally unknown, and now, the entire mechanism is largely understood. Consequently, a new, seemingly most effective target for anticancer therapy emerged.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	24,900,000	7,470,000	32,370,000
2007 年度	23,700,000	7,110,000	30,810,000
2008 年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
2009 年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
2010 年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
総計	86,700,000	26,010,000	112,710,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：癌、細胞周期、シグナル伝達、タンパク分解、チェックポイント、mTORC1

1. 研究開始当初の背景

哺乳類を含む高等多細胞生物を構成するほぼすべての細胞は（造血細胞および発癌した細胞を除く）、細胞外マトリックスタンパクあるいはその等価物を足場として増殖する。足場を無くすと、細胞は細胞周期の G1 期から S 期へ進行できず、G1 期に停止すると共に

死に至る。この制御の消失が癌細胞で普遍的に見られることから、全世界で多くの研究者によって、この制御機構の解明が試みられてきた。1990 年代終わりから 2000 年初めにかけて、足場消失に伴い、2 種類の G1 期サイクリンの発現低下とサイクリン依存性キナーゼの阻害タンパクである p27^{Kip1} の発現上昇

が起り、当該サイクリン依存性キナーゼである Cdk4/Cdk6 および Cdk2 が不活化されることが報告された。しかし、単なるサイクリンの強制発現や p27^{Kip1} の発現低下だけでは当該キナーゼの活性化が起らないことから、より深いレベルでキナーゼの制御が行われていると考えられたが、その実態は謎のままであった。

2001-2003 年、我々は、D 型サイクリン依存性キナーゼのうち、サイクリン D3 と結合した Cdk6 は、いずれのサイクリン依存性キナーゼ阻害タンパクに対しても阻害されず、これらの発現が増殖抑制の条件下で細胞の増殖能を決定付けていること、加えて、この組み合わせを高発現させると細胞の化学発癌感受性が飛躍的に高まることを見出した。さらに、足場消失に伴い、G1 サイクリン依存性キナーゼの不活化以外に、染色体 DNA の複製に必須な Cdc6 タンパクが強制的に分解され消失することを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究は、これまで高い壁に阻まれほとんど手付かずであった、足場シグナルによる細胞周期 G1-S 期遷移制御の機構、すなわち足場依存性細胞周期開始機構と、癌細胞や造血細胞で見られる足場非依存性細胞周期開始機構の全貌の解明を進め、それによって、多細胞生物の発生分化の制御機構解明と新しい癌抑制の治療法開発のための基盤知識を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

遺伝子操作を中心とする分子生物学的解析およびタンパクの酵素学的解析は生化学的手法を用いた。

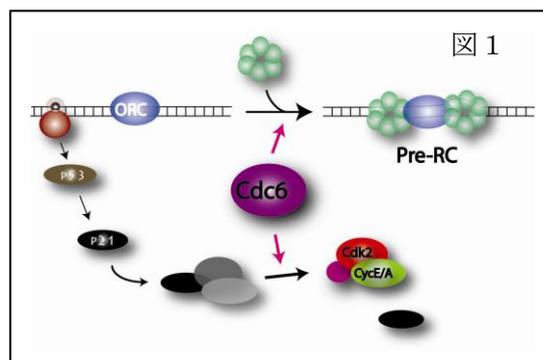
具体的項目

- (1) 各種遺伝子のクローニングと変異導入。
- (2) ラットおよびマウス胎性繊維芽細胞に遺伝子を導入および発現し、足場を消失させるメチルセルロース培地で培養し、形質の変化をみた。
- (3) 大腸菌発現システムによる Cdc6 およびその変異体の作成と試験管内での p21 および p27 で不活化された Cdk2 活性化のアッセイ。
- (4) 各種抗体によるウェスタンブロットおよび抗体沈殿による結合タンパクの解析。
- (5) リアルタイム RTPCR 法を用いて mRNA の定量。
- (6) RNAi による Cdc6 遺伝子発現のノックダウン。

4. 研究成果

Cdc6 タンパクの機能と分解機構を手掛かりに研究を進めた結果、足場依存性・非依存性細胞周期開始機構を包括的に解明する、3つの重要な突破口を得た。

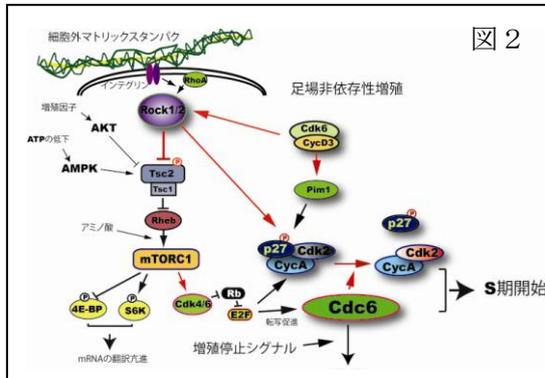
一つ目は、これまで想定されていなかった Cdc6 の新規機能の発見である(図 1)。従来 Cdc6 タンパクは、Mcm 複合体を複製開始点に充填し、複製開始前複合体の形成を行う機能のみしか持たないと考えられてきた。しかし、それ以外に ATP の加水分解エネルギーを利用して Cdk2 に結合した阻害タンパクの一つである p21^{Cip1} を引き剥がすことによって複製開始に必須な Cdk2 を活性化するというそれまで全く想定されなかった機能を持つことを見出した。その結果、それまで謎であった DNA 損傷に伴う S 期におけるチロジン酸化と p21 結合による Cdk2 の不活化機構の使い分けのメカニズムを解明することができた。更に後述するように、この新規の Cdc6 の新規関連機能が、足場依存性・非依存性細胞周期開始の制御に深く関わっていることが明らかになった。



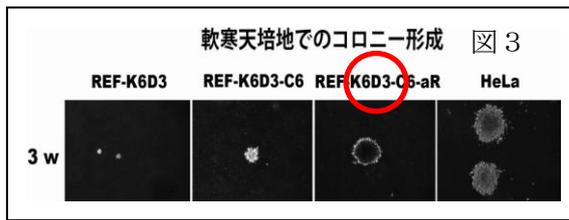
二つ目は、細胞周期を制御する足場シグナルを伝達する経路の同定である。足場シグナルは、インテグリンによって感知され、Rho キナーゼ (Rock) や FAK によってその一部は下流に伝達と考えられているが、その真偽については定かではなかった。

家族性結節性硬化症は、多発性の良性腫瘍を主徴とする遺伝性疾患で、その原因は、増殖因子、細胞内代謝およびアミノ酸の貧富によって制御され翻訳制御を行う mTORC1 のシグナル経路を形成する Tsc1/2 の機能消失変異であることは良く知られている。我々は、この Tsc1/2-Rheb-mTORC1 経路が、細胞周期を制御する足場シグナルの主たる部分を伝達し、翻訳のみならず Cdk4/6 の活性を直接制御することによって G1 期から S 期への進行を促進すること、更に最近、インテグリンからの足場シグナルは、これによって活性化された Rock が Tsc2 の Thr¹²⁰³ を直接リン酸化することによってこの経路に伝達

され、mTORC1 を活性化していることを見出した (図 2 左部分)。これによって、足場消失に伴って起こる諸々の G1 期細胞周期因子の発現と活性状態の変化をうまく説明できるようになった。他方、mTORC1 による Cdk4/6 の活性化機構については、現在解析中であり結論は得られていないが、新しい機構でこれらのキナーゼ活性が制御されている可能性が浮かび上がってきている。



三つ目は、発現操作のみによってラット胎性線維芽細胞に足場非依存性増殖を誘導できる G1 期細胞周期因子の組み合わせを見いだしたことである (図 3)。結論を言えば、既述の Cdk6 とサイクリン D3 ならびに複製開始点の活性化および p21^{Cip1} によって不活化された Cdk2 を活性化できる Cdc6、更に mTORC1 を活性化する活性化 Rheb の 4 つの因子を高発現することによって、ラット胎性線維芽細胞に典型的なヒト癌細胞である HeLa 細胞と比べて遜色ない速度で足場非依存性増殖を誘導することに成功した。興味深いことに、この組み合わせで Cdk2 が活性化されるようになり、この場合も Cdk2 の活性化に Cdc6 が深く関わっていることが後述のように明らかになった。Cdk6/D3 の高発現は、本来足場非依存性増殖を行う造血細胞や癌細胞で起こっていることから、発癌の根底にある足場非依存性増殖機構の包括的解明にも重要な突破口となると期待され、その分子機構の解明を精力的に進めた。



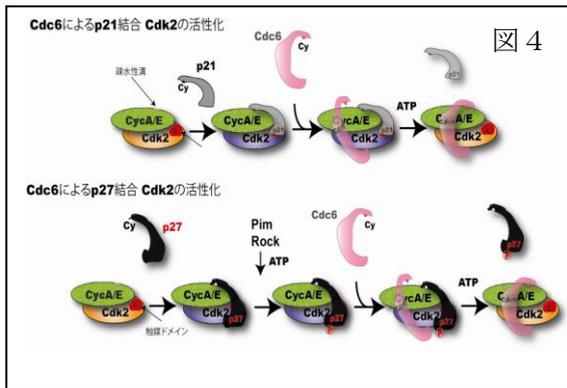
その結果、図 2 の右部分に示すように、これまで想定されることがない、全く新しい機序による Cdk2 の活性化機構の存在が明らかになった。まず、サイクリン D3 との高発現により活性化された Cdk6 が、機序は不明であるが足場が消失した状態で Rock の

活性化と癌遺伝子産物 Pim1 タンパクの安定化を引き起こす。次に、活性化された Rock および安定化された Pim1 は、Cdk2-サイクリン A/E 複合体に結合し Cdk2 を不活化していた p27^{Kip1} の C 末端をリン酸化する。そこで高発現された Cdc6 が、ちょうど p21^{Cip1} で不活化された Cdk2 を活性化するように、ATPase ドメインとサイクリン結合モチーフに依存して Cdk2 を活性化する。Rock が p27^{Kip1} の C 末端をリン酸化すること、および C 末端をリン酸化された p27^{Kip1} によって不活化された Cdk2 を Cdc6 が活性化することは、今回の新たな発見である。p27 の C 末端のリン酸化は以前から知られていたもののその生物学的意義が判然としていなかったが、今回、同時にその意義を解明することができた。

以上の研究成果をまとめると、

- (1) 細胞増殖を制御する足場シグナルの伝達経路のほぼ全貌を解明した。
- (2) 従来 Cdk2 の活性は、p27^{Kip1} の発現と分解の制御のみによって行われていると思われていたが、今回全く新しい機構で G1-S 期遷移時の Cdk2 が制御されていることを見出した。
- (3) mTORC1 経路の活性化共に G1 期細胞周期制御因子 4 種の高発現によって典型的なヒト癌細胞の HeLa 細胞と同等の速度でラット胎性線維芽細胞に足場非依存性増殖を誘導することに成功した。これによって足場非依存性増殖が誘導されるために必要な条件が判明した。したがって、個々の癌細胞でこれら 4 種の遺伝子に関連した遺伝子について変異の存在や発現レベルの変化を調べることによって、その細胞で起きている発がんの機構を特定することができる。
- (4) 複製開始前複合体形成に必須な Cdc6 が、この機能以外に p21^{Cip1} および p27^{Kip1} で不活化された Cdk2 を活性し、S 期開始制御に二重に係っている多機能 AAA+ ATPase であることを見出した。興味深いことは、p21^{Cip1} と異なり、p27^{Kip1} の場合は、Cdk2 を不活化している p27^{Kip1} の C 末端がリン酸化されるまでは、Cdc6 が Cdk2 を活性化できないことである (図 4)。いずれの場合も、活性化には、Cdc6 の ATPase ドメインおよびサイクリン結合モチーフが必要である。これは、複製前複合体形成には、サイクリン結合モチーフが必要ではないのと対照的である。
- (5) 以上の知見から、Cdc6 が制癌剤開発

のおそらく最も効果的な標的として浮かび上がった。



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 8 件)

- ① Park, J.-H., Arakawa-Takeuchi, S., Jinno, S., and Okayama, H. Rho-associated Kinase Connects a Cell Cycle-controlling Anchorage Signal to the Mammalian Target of Rapamycin Pathway. *J. Biol. Chem.* 査読あり 2011, 掲載確定 (印刷中)
- ② Arakawa-Takeuchi, S., Kobayashi, K., Park, J.-H., Uranbileg, B., Yamamoto, H., Jinno, S., and Okayama, H. Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Signaling Opposes the Effects of Anchorage Loss, Leading to Activation of Cdk4 and Cdc6 Stabilization. *FEBS Lett.* 査読あり 584, 2010, 2779-2785
- ③ Kan, Q., Jinno, S., Kobayashi, K., Yamamoto, H., and Okayama, H. Cdc6 Determines Utilization of p21^{WAF1/CIP1}-dependent Damage Checkpoint in S Phase Cells. *J. Biol. Chem.* 査読あり 283, 2008, 17864-17872.
- ④ Kan, Q., Jinno, S., Yamamoto, H., Kobayashi, K., and Okayama, H. ATP-dependent activation of p21^{WAF1/CIP1}-associated Cdk2 by Cdc6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 査読あり 105, 2008, 4757-4762.
- ⑤ Kan, Q., Jinno, S., Yamamoto, H., and Okayama, H. Chemical DNA damage activates p21^{WAF1/CIP1}-dependent intra-S checkpoint. *FEBS Lett.* 査読あり 30, 2007, 5879-5884.
- ⑥ Horiuchi, K., Umetani, M., Minami, T., Okayama, H., Takada, S., Yamamoto, M., Aburatani, H., Reid, P. C., Housman, D.

E., Hamakubo, T., and Kodama, T. Wilms' tumor 1-associated protein regulates G2/M transition through stabilization of cyclin A2 mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 査読あり 103, 2006, 17278-17283.

- ⑦ Isobe, H., Nakanishi, W., Tomita, N., Jinno, S., Okayama, H., and Nakamura, E. Gene delivery by aminofullerenes: Structure requirement for efficient transfection. *Chemistry an Asian Journal* 査読あり 1, 2006, 168-175.
- ⑧ Isobe, H., Nakanishi, W., Tomita, N., Jinno, S., Okayama, H. and Nakamura, E. Nonviral gene delivery by aminofullerene. 査読あり *Mol Pharm* 3, 2006, 124-134.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Arakawa-Takeuchi, S., Mammalian target of rapamycin complex 1 signaling opposes the effects of anchorage loss, leading to activation of Cdk4 and Cdc6 stabilization., 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), 2010 年 12 月 8 日、神戸ポートアイランド (神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場) (兵庫県神戸市)
- ② Uranbileg, B., Efficient Induction of Anchorage-Independent Proliferation of Rat Embryonic Fibroblast by Overexpression of Cdk6, Cyclin D3, Cdc6 and aRhb. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), 2010 年 12 月 8 日、神戸ポートアイランド (神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場) (兵庫県神戸市)
- ③ Park, J.-H., Rho-Associated Kinase Connects an Anchorage Signal to The Mammalian Target of Rapamycin., 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), 2010 年 12 月 8 日、神戸ポートアイランド (神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場) (兵庫県神戸市)

[その他]

ホームページ

<http://www.cellcycle.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡山 博人 (OKAYAMA HIROTO)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：4 0 1 1 1 9 5 0

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし