

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2009

課題番号：20012027

研究課題名（和文） 複合遺伝子変異マウスを用いたがん化・転移シグナルの解明

研究課題名（英文） Analysis of cellular signals toward carcinogenesis and metastasis using genetically modified mice

研究代表者

高橋 智聡 (TAKAHASHI CHIAKI)

金沢大学・がん研究所・教授

研究者番号：50283619

研究成果の概要（和文）：Rb がん抑制遺伝子ヘテロ型欠損マウスを中心に、様々な複合遺伝子変異マウスを作製し解析した。Rb 不活性化時に、Ras 依存的な DNA 損傷応答と細胞老化シグナルが誘導され、がんの悪性化に拮抗することを証明した。また、Rb が、E2F と SREBP 依存的に、Ras 蛋白質等のイソプレニル化を制御することを見いだした。一方、Ras の拮抗的下流遺伝子 RECK が、MMP-2 依存的に、 $\beta$ 1-integrin シグナルと EGFR シグナルを制御することを見いだした。

研究成果の概要（英文）：We analyzed Rb-heterozygous mice simultaneously lacking various Rb-related genes. We proved that Rb-deficient carcinogenesis is antagonized by cellular senescence and DNA damage response in a Ras-dependent manner. We also discovered that Rb inactivation upregulates number of genes involved in protein isoprenylation via E2F or SREBP leading to accelerated membrane trafficking of Ras. In addition, we discovered that RECK, an antagonistic downstream target of Ras, regulates beta1-integrin and EGFR signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	9,000,000	0	9,000,000
2009 年度	9,000,000	0	9,000,000
年度			
年度			
年度			
総計	18,000,000	0	18,000,000

研究分野：分子腫瘍学、腫瘍遺伝学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：がん、がん抑制遺伝子、がん遺伝子、細胞老化、DNA 損傷

1. 研究開始当初の背景

(1) Rb-Ras 経路の解析：Rb は、ヒトがんの発生・進展において、極めて中心的な役割を

果たすがん抑制遺伝子である。しかし、Rb の突然変異が観測されるヒトがんの種類は、意外に限定的である。これは、Rb が不活性化し

ても、すぐには細胞をがん化させない生体防御反応が存在するからだと考えられる。我々は、Rb ヘテロ型マウスに生じる悪性度の低い C 細胞腫瘍が、N-ras の追加欠損によって高度に悪性化することを見出していた (Takahashi et al., Nat. Genetics., 38: 118-123, 2006)。同時に、PTEN や VHL 等のがん抑制遺伝子の不活性化が、細胞老化等の生体防御機能によって拮抗されるという報告が相次いでなされていた。これらの知見を踏まえ、我々は、Rb と Ras の遺伝学的関係の機序と生物学的意義の探索を試みた。

**(2) RECK によって制御されるシグナル伝達経路の解明:** RECK は、活性化型 K-Ras の拮抗的下流遺伝子として研究代表者らがクローニングした遺伝子産物である。RECK は、MT1-MMP、CD13 や ADAM10 等の膜型プロテアーゼと結合して作用すること、この遺伝子をホモ型欠損するマウスが、Notch シグナルの減弱による大脳皮質の発達異常を示すことを 2007 年に報告した (Muraguchi et al., Nat. Neurosci., 10: 838-835, 2007)。さらに、RECK 発現は、様々な種類のがんの転移浸潤能・予後に関与することが相次いで報告されていた。RECK が制御する細胞シグナルの解明に焦点が集まった。

## 2. 研究の目的

**(1) Rb-Ras 経路の解析:** N-ras の存在が、如何にして、Rb 欠損腫瘍の悪性かを阻害するのかを明らかにしようとした。また、ヒト癌で Rb と N-Ras 両方の不活性化が観察される例があるかどうか探索した。このことによって、Rb 不活性化によるがん化に拮抗する生体防御機構を明らかにしようとした。また、Ras 活性が Rb によって制御されるメカニズムの全貌を明らかにすることを目標とした。

**(2) RECK によって制御されるシグナル伝達経路の解明:** RECK によって制御される細胞内シグナルを解明することにより、がんの予後決定や転移浸潤あるいは大脳皮質発達や血管新生のメカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

**(1) Rb-Ras 経路の解析:** Rb ヘテロ型に加え、N-ras, Ink4a, Arf, Suv39h1, ATM 等を追加欠損するマウスを作製、C 細胞腫瘍を観察した (図 1 および表 1)。また、Rb-N-ras 両欠損 C 細胞腫瘍や線維芽細胞を樹立、Rb が N-Ras の膜輸送に及ぼす影響を探索、また、この制御にかかわる Rb の標的遺伝子をマイクロアレイ解析や ChIP 法・ルシフェラーズアッセイによって探索・解析した。

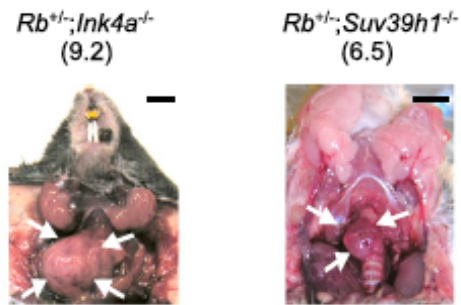


図 1 我々が解析に用いたマウスに生じた C 細胞腫瘍の典型像

Genotype	AE (months)	n	AD	CA	MD (mm)	CEA (%)	PCNA (%)	Ki-67 (%)
Rb <sup>+/+</sup> ; Ink4a <sup>+/+</sup>	10.0 ± 1.0	5	0	0	—	—	—	—
Rb <sup>+/+</sup> ; Ink4a <sup>-/-</sup>	9.8 ± 0.4	9	8	0	1.0 ± 0.2	1.4 ± 0.2	5.4 ± 0.4	4.6 ± 1.7
Rb <sup>+/+</sup> ; Ink4a <sup>-/-</sup> ; Arf <sup>-/-</sup>	11.6 ± 0.4	3	0	0	—	—	—	—
Rb <sup>+/+</sup> ; Ink4a <sup>-/-</sup> ; Suv39h1 <sup>-/-</sup>	10.0 ± 0.4	6	0	6	3.9 ± 0.2	66.3 ± 2.5	77.3 ± 2.0	74.7 ± 2.4
Rb <sup>+/+</sup> ; Ink4a <sup>-/-</sup> ; Arf <sup>-/-</sup> ; Suv39h1 <sup>-/-</sup>	10.1 ± 0.3	8	0	8	8.6 ± 0.2	74.2 ± 2.0	84.2 ± 1.0	86.5 ± 1.8
Rb <sup>+/+</sup> ; Arf <sup>-/-</sup> ; Suv39h1 <sup>-/-</sup>	9.2 ± 0.5	8	2	0	0.2 ± 0.1	NA	NA	NA
Rb <sup>+/+</sup> ; Arf <sup>-/-</sup> ; Ink4a <sup>-/-</sup>	6.8 ± 0.1	5	0	0	—	—	—	—
Rb <sup>+/+</sup> ; Arf <sup>-/-</sup> ; Ink4a <sup>-/-</sup> ; Suv39h1 <sup>-/-</sup>	7.3 ± 0.2	5	0	5	1.9 ± 0.2	2.5 ± 0.2	78.8 ± 1.5	76.9 ± 2.2
Rb <sup>+/+</sup> ; Arf <sup>-/-</sup> ; Suv39h1 <sup>-/-</sup>	5.6 ± 0.3	6	0	6	3.5 ± 0.3	2.2 ± 0.3	82.4 ± 1.2	84.1 ± 1.6
Rb <sup>+/+</sup> ; Arf <sup>-/-</sup>	5.4 ± 0.5	6	0	0	—	—	—	—
Rb <sup>+/+</sup> ; Arf <sup>-/-</sup> ; Suv39h1 <sup>-/-</sup>	6.5 ± 1.0	6	0	0	—	—	—	—
Rb <sup>+/+</sup> ; Arf <sup>-/-</sup> ; Ink4a <sup>-/-</sup>	6.5 ± 1.4	2	0	0	—	—	—	—
Rb <sup>+/+</sup> ; Arf <sup>-/-</sup> ; Suv39h1 <sup>-/-</sup> ; Ink4a <sup>-/-</sup>	5.2 ± 0.3	5	0	5	1.7 ± 0.1	2.1 ± 0.2	57.8 ± 2.3	55.6 ± 2.2
Rb <sup>+/+</sup> ; Suv39h1 <sup>-/-</sup>	4.8 ± 0.3	6	0	0	—	—	—	—
Rb <sup>+/+</sup> ; Suv39h1 <sup>-/-</sup> ; Arf <sup>-/-</sup>	4.8 ± 0	2	0	0	—	—	—	—
Rb <sup>+/+</sup> ; Suv39h1 <sup>-/-</sup> ; Ink4a <sup>-/-</sup>	5.0 ± 0	3	0	0	—	—	—	—
Rb <sup>+/+</sup> ; Suv39h1 <sup>-/-</sup> ; Arf <sup>-/-</sup> ; Ink4a <sup>-/-</sup>	4.6 ± 0.2	8	0	8	3.6 ± 0.1	26.8 ± 2.3	81.1 ± 2.1	79.7 ± 2.3

表 1 様々な遺伝学的背景のマウスから生じた腫瘍の病理学的解析の結果

**(2) RECK によって制御されるシグナル伝達経路の解明:** ヒトの血管内皮細胞およびマウス線維芽細胞において、RECK のノックダウンを行い、細胞周期・分化・細胞老化・DNA 損傷応答等様々な細胞の応答反応を観察する。このことによって、RECK の制御する細胞内シグナルを性格づけようとした。

## 4. 研究成果

**(1) Rb-Ras 経路の解析:** Rb がん抑制遺伝子ヘテロ型欠損マウスを中心に、様々な複合遺伝子変異マウスを作製し解析してきた。Rb 不活性化時に、Ras 依存的な DNA 損傷応答と細胞老化シグナルが誘導され、がんの悪性化に拮抗することを遺伝学的に証明した。また、その機序として、Rb が、E2F と SREBP 依存的に、Ras 蛋白質等のイソプレニル化を制御することを見いだした (図 1)。よって、Rb 不活性化は、N-Ras の膜輸送を促進 (図 2)、この結果、N-Ras の活性化が亢進し、いわゆる oncogene-induced senescence と類似した機構によって細胞老化を誘導すると考えられた。また、散発性のヒトの甲状腺髄様がんを解析、Rb の発現の消失した腫瘍では、ほぼ全例 N-Ras の発現も消失することを見出した。ヒト癌においても、Rb 不活性化が、Ras に依存した細胞老化機構によって拮抗されている可能性が示された。更には、Rb-Ras 経路 (図 3) が、がん幹細胞化において重要な役割を果たすことを見出した。Rb は腫瘍の悪性進展過程でしばしば不活性化する。今後は、この

こととがん幹細胞様集団の発生をリンクする機構の解明を行う。

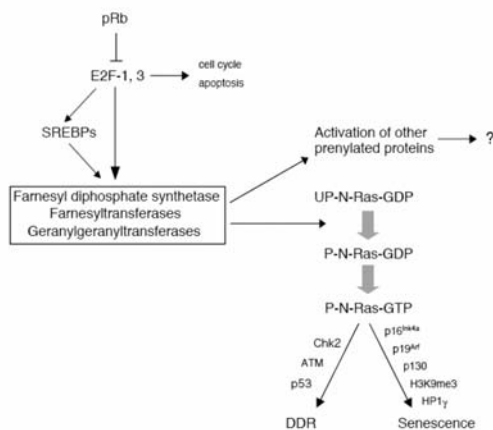


図1 RbによるRas蛋白質イソプレニル化制御の機構と細胞内における働き

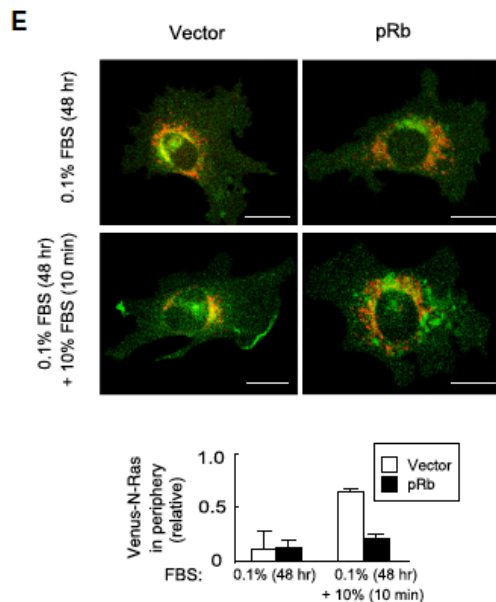


図2 Rb不活性化は、N-Rasの細胞膜輸送を促進する

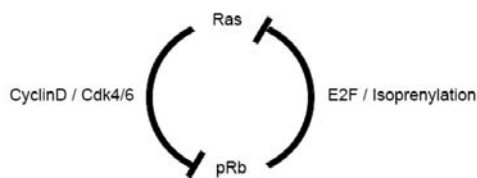


図3 本課題によって判明したRbとRasの相互抑制的関係

(2) RECKによって制御されるシグナル伝達経路の解明：血管内皮細胞とマウス線維芽細胞におけるRECKノックダウンは、どちらも細胞老化を誘導した。前者においては、

beta1-integrinシグナルの減弱、FAK活性の低下とp21の発現亢進が見出された。後者では、EGFRシグナルの一時的亢進に続いて、MAPKシグナル活性化・Sprouty2の発現亢進によるnegative feedback機構の誘導が見出された(図)。逆に、RECKを大腸がん由来の細胞株において強制発現すると、EGFR/Rasシグナルの抑制が観察された。これらの知見から、RECKが、MMP-2依存的に、beta1-integrinシグナルとEGFRシグナルを制御することを見いだした。とくに後者の発見は、なぜRECKがRasの機能に拮抗するのかを説明するものとなった。RECKは肺がん等様々な腫瘍の予後決定因子であることが知られる。今回明らかになったEGFRとの関係は、この機序を理解するための大きな一歩といえる。

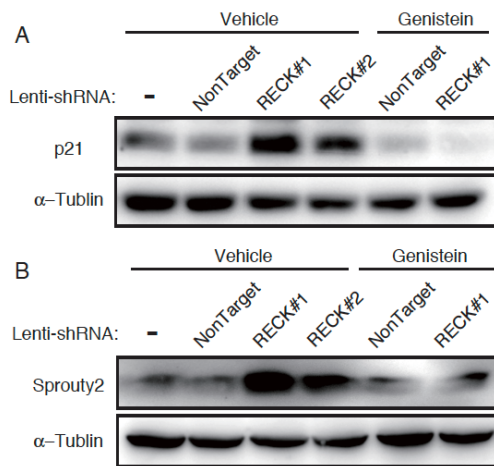


図 RECKノックダウンによるネガティブフィードバック機構と細胞老化の誘導

## 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5件)

1. T. Miki, A. Shamma, S. Kitajima, Y. Takegami, M. Noda, Y. Nakashima, K. Watanabe and C. Takahashi. The  $\beta$ 1-integrin-dependent function of RECK in physiologic and tumor angiogenesis. *Mol. Cancer Res.* オンライン版 Apr. 20, 2010. 査読有

2. F. Loayza-Puch, Y. Yoshida, T. Matsuzaki, C. Takahashi, H. Kitayama, and M. Noda. Hypoxia and RAS signaling pathways converge on, and cooperatively down-regulate, the RECK tumor suppressor

protein via microRNAs. *Oncogene* オンライン版 Feb 15, 2010 査読有

3. A. Shamma, Y. Takegami, T. Miki, S. Kitajima, M. Noda, T. Obara, T. Okamoto, and C. Takahashi. Rb regulates DNA damage response and cellular senescence through E2F-dependent suppression of N-Ras Isoprenylation. *Cancer Cell* 15: 255-269, 2009. 査読有

4. A. Omura, T Matsuzaki, K. Miio, T. Ogura, M. Yamamoto, A. Fujita, K. Okawa, H. Kitayama, C. Takahashi, C. Sato and M. Noda. RECK forms cowbell-shaped dimmers and inhibits MMP-catalyzed cleavage of fibronectin. *J. Biol. Chem.* 284: 3461-3169, 2009. 査読有

5. S. Kawashima, T. Noda, E. Chandana, Y. Imamura, R. Takahashi, E. Adachi, C. Takahashi and M. Noda. Localization of the membrane-anchored MMP-regulator RECK at the neuromuscular junctions.

*J. Neurochem.* 104: 376-385, 2008. 査読有

[学会発表] (計9件)

1. C. Takahashi. The Rb-Ras pathway in malignant progression. National Sun Yat-Sen University International Cancer Biology Symposium (2010) 6月27日 National Sun Yat-Sen University (Taiwan)

2. S. Kitajima, T. Miki, C. Takahashi. RECK regulates p53-p21-dependent cellular senescence in mouse embryonic fibroblasts. 日本分子生物学会年会ポスター発表(2009) 12月12日パシフィコ横浜 (神奈川県)

3. C. Takahashi, Y. Takegami, T. Miki, S. Kitajima and A. Shamma The genetic interaction of Rb and ras unveiled by the study of compound knockout mice. 日本生化学会大会シンポジウム (2009) 10月22日神戸国際会議場 (兵庫県)

4. A. Shamma and C. Takahashi. Critical role of cellular senescence mediated by N-Ras isoprenylation in suppressing Rb-deficient C-cell carcinogenesis 日本癌学会総会口頭発表(2009) 10月2日神戸国際会議場 (兵庫)

5. C. Takahashi and A. Shamma The genetic interaction of Rb and ras in the multi-step carcinogenesis model 癌学会総会シンポジウム (2009) 10月1日パシフィコ横浜 (神奈川県)

6. 北嶋俊輔、三木高雄、高橋智聡 RECKによるp21CIP1依存的な細胞増殖・細胞老化の制御 日本病態プロテアーゼ学会ポスター発表(2009) 8月21日千里ライフサイエンスセンター (大阪)

7. C. Takahashi and A. Shamma The function and mechanism of pRb-N-Ras pathway in metastatic conversion of neuroendocrine thyroid tumor. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology (KSBMB) シンポジウム (2009) 5月13日 COEX (Korea)

8. 高橋智聡、三木貴雄、村口輝行、竹上雄治郎、北嶋俊輔 RECKによる膜結合型メタロプロテアーゼ群の制御 日本分子生物学会・生化学会合同年会 BMB2008 シンポジウム (2008) 12月10日神戸国際会議場 (兵庫県)

9. T. Muraguchi, Y. Takegami, T. Miki, S. Kitajima and C. Takahashi. RECK regulates Notch signaling during cortical development by directly interacting with ADAM10. 細胞生物学会ミニシンポジウム (2008) 6月29日パシフィコ横浜 (神奈川県)

[図書] (計2件)

1. C. Takahashi, T. Muraguchi, Y. Takegami, and T. Miki. Regulation of Notch signaling and its polarity mediated by ectodomain shedding of DSL ligands. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* (in Japanese) Oct; 54(13): 1742-1746, 2009.

2. C. Takahashi, Y. Takegami, and A. Shamma. The genetic and biochemical interactions of Rb and ras. *Seikagaku* (in Japanese) Oct; 81(10): 873-883, 2009.

[その他]

ホームページ等

<http://web.me.com/takahashichiaki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 智聡 (TAKAHASHI CHIAKI)  
金沢大学・がん研究所・教授  
研究者番号：50283619

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

シャムマ アワド (SHAMMA AWAD)  
金沢大学・がん研究所・助教  
研究者番号：50402839