

機関番号：20101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590746
 研究課題名（和文） リボソーム蛋白質の発現異常を標的とした消化器癌に対する診断・治療法の開発
 研究課題名（英文） Development of diagnostic and therapeutic strategies for gastrointestinal cancer: focus on tumor-associated ribosomal proteins
 研究代表者
 佐々木 泰史（YASUSHI SASAKI）
 札幌医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：70322328

研究成果の概要（和文）：特定のリボソーム蛋白質が、発癌過程において発現が変化していること、リボソーム以外の場所で翻訳とは独立した役割を持っていることなどが明らかになってきた。本研究では、消化器発癌組織において発現が変化するリボソーム蛋白質の同定とその機能解析を行った。その結果、L13 が癌組織で高頻度に高発現しており、治療抵抗性、予後不良と相関していることを明らかにした。さらに L13 蛋白質が p53 遺伝子の 3'非翻訳領域に結合することで p53 の翻訳を抑制し、癌の進行を促進することを見いだした。

研究成果の概要（英文）：We report here that L13 is activated in human gastrointestinal cancers. By using qRT-PCR, we analyzed expression of L13 in freshly resected cancer tissue of the stomach, colorectum, and liver. Upregulation of L13 mRNA expression was observed in 10 (28%) of 36 stomach, 19 (41%) of 46 colorectal, and 5 (20%) of 25 liver cancer tissue samples compared to adjacent normal tissue samples. We also found that increased expression of the L13 gene was correlated with clinical staging in stomach cancers. Importantly, we discovered that L13 expression was inversely related to p53 mutational status in primary gastric cancer, and siRNA-mediated L13 suppression resulted in robust induction of p53 protein. These findings suggest that L13 plays an essential role in the progression of some gastrointestinal malignancies by numbing the p53 pathway, thus allowing tumorigenic growth in the presence of wild-type p53.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：リボソーム蛋白質，消化器癌，p53，抗癌剤感受性，アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報をアミノ酸配列へと読み取る翻訳反応は、細胞内顆粒リボソームと多数の

生体高分子との相互作用によって遂行される。リボソームは 79 種類のリボソーム蛋白質と 4 種類の RNA 分子から構成される分

子量約 300 万の超高分子蛋白質-RNA 複合体である。蛋白質合成におけるリボソームの役割については、多くの生化学的研究知見が蓄積されているが、リボソームの医学的重要性に関する報告はほとんどなされていなかった。

最近になって、特定のリボソーム蛋白質が、発癌過程において発現が変化しているというデータや、リボソーム以外の場所で翻訳とは独立した役割、**extraribosomal function** を持っていることが明らかになってきた。申請者はこれまでにリボソーム蛋白質 L13 が DNA 損傷などのストレスによって活性化されること、DNA 損傷の際の細胞周期停止に拮抗する働きを持っていることを報告した。さらに L13 がヒト胃癌、大腸癌、肝癌症例において高率に発現上昇しており、その発現レベルが抗癌剤感受性と逆相関することを明らかにした。さらに消化器癌組織における全 79 種類のリボソーム蛋白質の遺伝子発現プロファイルを TaqMan Low Density Array により定量解析したところ、近接正常組織に比べ癌組織でその遺伝子発現が上昇または低下する癌関連リボソーム蛋白質を複数同定した。また、癌蛋白や癌抑制蛋白の機能調整するリボソーム蛋白質が多数同定されており (EMBO J. 23: 2402-12, 2004, Nat Cell Biol. 6: 665-72, 2004, Cell 123: 49-63, 2005 など)、特定のリボソーム蛋白質が発癌、あるいは癌抑制に直接関わっていることが示唆されている。しかしながら、真核生物において 79 種類あるリボソーム蛋白質の個々の機能は十分明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は癌の悪性度および化学療法効果に関与する候補分子としてのリボソーム蛋白質に着目し、消化器癌組織（主に下部消化管）における癌関連リボソーム蛋白質の遺伝子および蛋白発現プロファイルとその機能解析から、従来の評価法を補完する新しい診断・治療予測システムを開発しようとするも

のである。

3. 研究の方法

(1) 消化器癌症例における癌関連リボソーム蛋白質 9 種の蛋白発現を免疫組織染色により解析し、臨床病理学的因子、予後などとの相関の有無を検討する。

(2) 発現ベクターを用いた発現誘導系、および siRNA, shRNA 発現プラスミドベクターを用いた発現抑制系を構築して、機能解析を行う。特に細胞増殖、アポトーシス誘導能、細胞運動能、浸潤能への影響について詳細に検討する。

(3) (1), (2)の解析結果に基づき、癌の悪性度、および治療・予後予測マーカーになりうるリボソーム蛋白質について、その発現あるいは構造異常を指標とした消化器癌の抗癌剤感受性予測システムを確立する。

(4) p53 の翻訳と安定性を制御するリボソーム蛋白質群の作用機構の解析を行なう。

我々および他の研究者の成果から、発癌や癌の進展に関連するリボソーム蛋白質としてリストアップしているものは以下の通りである。

癌組織で発現が上昇 : L13, L15, L35

癌組織で発現が低下 : L14, L23, S11

p53 の機能調節に関わる : L5, L11, L13, L23, L26

4. 研究成果

(1) 消化器癌組織における癌関連リボソーム蛋白質の発現と機能解析

十分なインフォームドコンセントを得た上で提供いただいた、胃癌、大腸癌組織、隣接正常組織から全RNAを抽出し、癌関連リボソーム蛋白質 9 種の遺伝子発現をqRT-PCRで定量解析した。その結果、胃癌の 4.2%、大腸癌の 4.5%でL11の発現上昇が、胃癌の 3.5%、大腸癌の 4.0%でL13の発現上昇が観察された。さらにL15, L35, L14, L23, S11, L22, L23, L26, S19, S27についても胃癌症例におけるその遺伝子発現を定量解析したところ、S11,

L23, L26, S27が癌組織において有意に発現低下していることを見いだした。いずれもその発現低下が悪性度、予後不良と関連していた。さらにこれまで癌における分析が行われていなかったL22に詳細に解析したところ、癌細胞の運動能、浸潤能を抑制する機能を有していることが明らかになった。

(2) p53の機能を調節するリボソーム蛋白質の解析

我々が同定したp53を負に制御するリボソーム蛋白質L13について解析を行った。種々の分子生物学的手法により、L13蛋白がp53遺伝子の3'非翻訳領域に結合することでp53の翻訳を抑制することを見いだした。また、p53の安定性を促進するリボソーム蛋白質L5, L11, L23, p53の翻訳を促進するL26とL13との相互作用は認められなかった。したがって、リボソームの大サブユニットを構成する蛋白の中で、L13は単独でp53に対する抑制作用を有していると考えられた。さらに、L13の免疫染色ではp53変異のない胃癌症例でL13が有意に高発現していることが明らかになった。乳癌症例のマイクロアレイ解析でもp53経路に異常のない症例で有意に発現上昇していることも見だし、L13がp53の機能を抑制することで発がんを促進することが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

- 1 Tanaka H, Arimura Y, Yabana T, Goto A, Hosokawa M, Nagaishi K, Yamashita K, Yamamoto H, Sasaki Y, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Myogenic lineage differentiated mesenchymal stem cells enhance recovery from dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat. **J Gastroenterol.** 46:143-152, 2011. 査読有
- 2 Yokota I, Sasaki Y, Kashima L, Idogawa M, Tokino T. Identification and characterization of early growth response 2, a zinc-finger transcription factor, as a p53-regulated proapoptotic gene. **Int J Oncol.** 37:1407-16, 2010. (Corresponding author) 査読有
- 3 Suzuki H, Igarashi S, Nojima M, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M, Akashi H, Watanabe Y, Yamamoto H, Sasaki Y, Itoh F, Imai K, Sugai T, Shen L, Issa JP, Shinomura Y, Tokino T, Toyota M. IGFBP7 is a p53 responsive gene specifically silenced in colorectal cancer with CpG island methylator phenotype. **Carcinogenesis** 31:342-49, 2010. 査読有
- 4 Yamashita M, Toyota M, Suzuki H, Nojima M, Yamamoto E, Kamimae S, Watanabe Y, Kai M, Akashi H, Maruyama R, Sasaki Y, Yamano H, Sugai T, Shinomura Y, Imai K, Tokino T, Itoh F. DNA methylation of interferon regulatory factors in gastric cancer and noncancerous gastric mucosae. **Cancer Sci.** 101:1708-16, 2010. 査読有
- 5 Fujikane T, Sasaki Y, Ohmura T, Hirata K, Tokino T (計14名, 11番目) Genomic screening for genes upregulated by demethylation revealed novel targets of epigenetic silencing in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 122:699-710, 2010. 査読有
- 6 Sasaki Y, Negishi H, Koyama R, Anbo N, Ohori K, Idogawa M, Mita H, Toyota M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. p53 Family Members Regulate the Expression of the Apolipoprotein D Gene. **J Biol Chem.** 284:872-883, 2009. 査読有
- 7 Idogawa M, Sasaki Y, Suzuki H, Mita H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. A single recombinant adenovirus expressing p53 and p21-targeting artificial microRNAs efficiently induces apoptosis in human cancer cells. **Clin Cancer Res.** 15:3725-32, 2009. 査読有
- 8 Kashima L, Toyota M, Mita H, Suzuki H, Idogawa M, Ogi K, Sasaki Y, Tokino T. CHFR, a potential tumor suppressor, downregulates interleukin-8 through the

- inhibition of NF-kappaB. **Oncogene**. 28:2643-53, 2009. 査読有
- 9 Yabana T, Arimura Y, Sasaki Y, Isobe M, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y (計14名, 10番目) Enhancing epithelial engraftment of rat mesenchymal stem cells restores epithelial barrier integrity. **J Pathol**. 218:350-59, 2009. 査読有
- 10 Nojima M, Sasaki Y, Imai K, Tokino T, Ishida T, Toyota M, Shinomura Y (計16名, 7番目) Genomic screening for genes silenced by DNA methylation revealed an association between RASD1 inactivation and dexamethasone resistance in multiple myeloma. **Clin Cancer Res**. 15:4356-64, 2009. 査読有
- 11 Mita H, Toyota M, Aoki F, Akashi H, Maruyama R, Sasaki Y, Suzuki H, Idogawa M, Kashima L, Yanagihara K, Fujita M, Hosokawa M, Kusano M, Tatsumi H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. A novel method, digital genome scanning detects KRAS gene amplification in gastric cancers: involvement of overexpressed wild-type KRAS in downstream signaling and cancer cell growth. **BMC Cancer**. 9:198, 2009. 査読有
- 12 Sasaki Y, Oshima Y, Koyama R, Maruyama R, Akashi H, Mita H, Toyota M, Shinomura Y, Imai K, Tokino T. Identification of flotillin-2, a major protein on lipid rafts, as a novel target of the p53 family members. **Mol Cancer Res**. 6:395-406, 2008. 査読有
- 13 Sasaki Y, Negishi H, Idogawa M, Suzuki H, Mita H, Toyota M, Shinomura Y, Imai K, Tokino T. Histone deacetylase inhibitor FK228 enhances adenovirus-mediated p53 family gene therapy in cancer models. **Mol Cancer Ther**. 7:779-87, 2008. 査読有
- 14 Maruyama R, Toyota M, Sasaki Y, Imai K, Shinomura Y (計18名, 10番目) Cytoplasmic RASSF2A is a pro-apoptotic mediator whose expression is epigenetically silenced in gastric cancer. **Carcinogenesis** 29:1312-18, 2008 査読有
- 15 Yamamoto E, Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Hayashi N, Mori M, Imai K, Tokino T, Shinomura Y (計17名, 12番目) LINE-1 hypomethylation is associated with increased CpG island methylation in Helicobacter pylori-related enlarged-fold gastritis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 17:2555-64, 2008. 査読有
- 16 Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. **Cancer Res**. 68:4123-32, 2008. 査読有
- [学会発表] (計7件)
- 1 佐々木泰史, 根岸秀明, 横田育子, 鹿島理沙, 井戸川雅史, 鈴木拓, 豊田実, 今井浩三, 篠村恭久, 時野隆至. p53により発現抑制される分泌性増殖因子HDGFの同定. 第69回日本癌学会学術総会 2010/9/23, 大阪
- 2 Sasaki Y, Negishi H, Koyama R, Kusano M, Suzuki H, Fujita M, Toyota M, Tokino T. Negative regulation of hepatoma-derived growth factor by p53. 38th Congress of the International Society of Oncology and BioMarkers. 2010/9/4, Munchen, Germany.
- 3 Sasaki Y, Yokota I, Kashima L, Idogawa M, Suzuki H, Toyota M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. hCLCA2, a p53 inducible transmembrane protein regulates cancer cell migration and adhesion. 8th AACR-JCA Joint International Conference. 2010/2/8, Waikoloa, Hawaii.
- 4 佐々木泰史, 安保直樹, 鹿島理沙, 井戸川雅史, 鈴木拓, 豊田実, 今井浩三, 篠村恭久, 時野隆至. p53ファミリーの標的遺伝子CLCA2の同定と機能解析. 第68回日本癌学会学術総会 2009/10/2, 横浜.
- 5 佐々木泰史, 井戸川雅史, 鈴木拓, 豊田実, 今井浩三, 篠村恭久. p53により発現抑制

される分泌性増殖因子 HDGF の同定 -胃
癌組織における発現解析. 第 95 回日本消
化器病学会総会. 2009/5/8, 札幌.

- 6 Sasaki Y, Negishi H, Koyama R, Anbo N,
Yokota I, Ohori K, Idogawa M, Mita H,
Toyota M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T.
p53 family members regulate the expression
of the apolipoprotein D gene. American
Association of Cancer Research (AACR)
Annual meeting. 2009/4/20, Denver, USA.
- 7 佐々木泰史, 安保直樹, 根岸秀明, 井戸川
雅史, 見田裕章, 豊田実, 今井浩三, 篠村
恭久, 時野隆至. p53 ファミリー (p73,
p63) の標的遺伝子 apolipoprotein D の同定.
第 67 回日本癌学会学術総会. 2008/10/29.
名古屋.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: Apoptosis inducer

発明者: 井戸川雅史, 佐々木泰史, 時野隆至

権利者: 井戸川雅史, 佐々木泰史, 時野隆至

種類: 特許権

番号: PCT/JP2009/001701

出願年月日: 2009 年 4 月 13 日

国内外の別: 国内・米国

[その他]

[http://web.sapmed.ac.jp/canmol/index.ht
ml](http://web.sapmed.ac.jp/canmol/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 泰史 (YASUSHI SASAKI)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 70322328

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし