

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590928

研究課題名（和文） 細胞周期の脱制御による肺上皮細胞の分化の破綻と癌化機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms coordinating between cell cycle and differentiation in lung epithelial cells

研究代表者

藤本 哲広 (FUJIMOTO TETSUHIRO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：70359818

研究成果の概要（和文）：細胞癌化の特徴として、（1）生理的な制御機構が破綻し、異常に増殖能が亢進していること、（2）細胞分化が停止し、生理的な機能を喪失すること、が知られている。このような特徴を生み出す分子機構に関しては、細胞増殖の亢進につながる遺伝子の変異と細胞分化を抑制する遺伝子の変異が独立して蓄積することが定説とされてきた。我々はこの点に関して、癌化した細胞において発現レベルや活性が亢進している細胞周期制御分子が、蛋白質・蛋白質相互作用を介して細胞分化や分化に伴った増殖停止に関わる分子の転写制御を破綻させ、細胞癌化に寄与しているという仮説を立て、その検証を行ってきた。その結果、肺腺癌細胞において cyclin D1 が腫瘍抑制遺伝子である RUNX3 と複合体を形成し、RUNX3 による cyclin dependent kinase (cdk) 阻害分子 p21 の転写を抑制することにより癌細胞の増殖を亢進させていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Transcriptional function of cyclin D1, whose deregulation is frequently observed in human cancers, has been suggested to contribute to cancer formation. We show that cyclin D1 protein inhibits RUNX3 activity by directly binding to it and interfering with its interaction with p300 interaction in lung cancer cells. Cyclin D1 inhibits p300-dependent RUNX3 acetylation and negatively regulates cyclin-dependent kinase (cdk) inhibitor p21 expression. These transcriptional effects of cyclin D1 do not require cdk4/6 kinase activation. We propose that cyclin D1 provides a transcriptional switch that allows the tumor suppressor activity of RUNX3 to be repressed in cancer cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：呼吸器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：細胞周期、細胞癌化、cyclin D1、RUNX3、p21

## 1. 研究開始当初の背景

本研究の開始に先立ち、申請者は、血液細胞をモデルとして細胞周期制御機構と細胞

分化制御の相関を研究してきた。哺乳類では細胞周期のG1期を制御する分子として cyclin-dependent kinase (cdk) 4/6 の二種の

サイクリン依存性キナーゼが知られており、**cdk4** と **cdk6** は同一の機能を有すると考えられてきた。興味深いことに、**cdk4** の発現は広範な組織に共通に観察されるが、**cdk6** の発現は主として血液細胞に特異的である。そこで、**cdk6** が血液細胞において固有の機能を有する可能性を考え、特に細胞分化における機能を中心に解析を行った。その結果、①**cdk6** は転写制御因子 **RUNX1** と複合体を形成し、その DNA 結合能を阻害することによって **RUNX1** に依存した血液細胞分化をそがいすること、②**cdk6** はキナーゼ活性非依存性に **RUNX1** の DNA 結合を阻害し、同分子による細胞周期制御とは独立した機能であること、を明らかにすることができた。

これらの知見は、ある特定の組織・細胞で高いレベルで発現している細胞周期制御分子が、その細胞において何らかの固有の機能を有している可能性が高いことを示唆していると言え、その機能の一つとして転写制御を介した細胞分化の制御が位置づけられると考えられた。この視点から、特定の癌において **cyclin D1** を始めとする細胞周期制御因子が高発現している病理学的事実を見直すと、このような細胞周期制御因子が、単に細胞周期の制御を介して細胞増殖を異常に亢進させているとする従来の概念とは別個に、転写制御を介して細胞分化や細胞分化に伴った細胞増殖の停止機構を破綻させて細胞癌化をすすめている可能性が想起された。

以上のような研究背景に基づき、特に多くの固形腫瘍（癌）で、発現レベルが亢進していることが報告されている **cyclin D1** に注目して、実際に転写制御を介して細胞癌化に寄与しているのか検証すべく、本研究が立案された。

## 2. 研究の目的

**Cyclin D1** の発現レベルが高い癌として、乳癌、肺の非小細胞癌（特に腺癌）が知られている。本研究では、肺腺癌をモデルとして、**cyclin D1** が細胞周期制御（**cdk4/6** と複合体を形成し、そのキナーゼ活性を活性化することで **Rb** 蛋白質のリン酸化を制御する）とは独立して、転写因子の機能を調節することで細胞分化、あるいは、細胞分化に伴う増殖停止機構を破綻させ、癌細胞の増殖を促進しているのかどうかを検証することを目的とした。特に、本研究の開始に先立ち、**cyclin D1** と相互作用しうる転写制御因子として **TTF-1** と **RUNX3** を同定していたが、両分子とも、肺腺癌において腫瘍抑制遺伝子として機能していると考えられていたことから、上述の目的を「**cyclin D1** が肺腺癌細胞において **TTF-1** や **RUNX3** の転写活性を負に制御し、その結果どのような分子の発現に異常をきたすことで、癌細胞の増殖を亢進させるの

か明らかにする」という課題に置き換え、研究を行った。

## 3. 研究の方法

所属研究室は極めて人員ならびに設備の両面において小規模であり、マウス遺伝学を駆使するような個体レベルでの解析は困難であることから、細胞株を使用した細胞レベルでの機能解析によって研究目的の遂行を目指した。

(1) ヒト胎児の腎臓由来の間葉系細胞株 293T に **cyclin D1** と **TTF-1**、**RUNX3** の欠失変異体を導入し、免疫沈降法によって解析を行い、**TTF-1** や **RUNX3** のどの機能ドメインが **cyclin D1** との相互作用に必要なのか検討を行った。

(2) (1) と同様の遺伝子導入実験を行い、導入後の 293T 細胞をもちいて **TTF-1** や **RUNX3** の蛋白質複合体形成における効果を免疫沈降法によって、また、DNA 結合に対する効果を DNA pull down 法によって解析した。

(3) 繊維芽細胞株 NIH3T3 を用いてレポーターアッセイ（ルシフェラーゼアッセイ）を行い、**cyclin D1** の **TTF-1** や **RUNX3** の転写活性に対する効果を検討した。

(4) 肺腺癌細胞株 A549 (**Rb** や **p53** の欠失・変異を有さない)、Calu6 (**Rb** の欠失、**p53** の機能抑制性変異を有する) に **cyclin D1** を強制発現させ、癌細胞の細胞増殖にたいする効果を検討した。

(5) (4) と同様の遺伝子導入実験を行い、内在性の **RUNX3** の、その標的分子の promoter/enhancer 領域への結合、ならびに転写複合体の形成に対する効果をクロマチン免疫沈降法によって検討した。

## 4. 研究成果

(1) **cyclin D1** による、転写制御因子 **TTF-1** の転写活性における抑制性制御

転写制御因子 **TTF-1** は肺の器官形成に必須の分子であり、最近の研究によって、**TGF-β** による上皮間葉転換（EMT）を阻害することによって腫瘍抑制遺伝子として機能していることが明らかにされつつある。DNA 結合モチーフとしてホメオボックスを有し、その C 末端側にコアクチベーター（**p300**）の結合領域が存在している。

これまでの解析によって、われわれは① **cyclin D1** がコアクチベーターとの結合領域を介して **TTF-1** と複合体を形成すること、② この複合体形成によって **TTF-1** と **p300** の邂逅が阻害されること、③ **TTF-1** と **p300** の複合体形成の阻害は、**cdk4/6** の活性化を必要としないこと、④ **cyclin D1** はレポーターアッセイでは、**TTF-1** による転写活性化を阻害し、この作用も、**cdk4/6** の活性化を必要としないことを明らかにしている。これらの知見は、

後述する転写制御因子 RUNX3 に対する cyclin D1 の作用と共通する特徴があり、(少なくとも肺腺癌細胞における) cyclin D1 の転写制御における共通の作動原理の存在を想起させるものである。

TTF-1 を肺腺癌細胞株に強制発現させることで、細胞分化に関わる分子の発現誘導、増殖抑制が観察されるが、現在 TTF-1 のこれらの機能に対する cyclin D1 の効果を検討中である。また、昨年報告された TTF-1 による EMT の抑制作用に対する cyclin D1 の効果も検討を予定しており、近い将来、TTF-1 の転写制御を介した肺腺癌の癌化に関わる新規の分子機構を報告できると考えている。

## (2) cyclin D1 による、転写制御因子 RUNX3 の転写活性における抑制性制御

転写制御因子 RUNX3 は、これまで消化管上皮(胃・大腸)において腫瘍抑制遺伝子として機能していることが報告されてきたが、最近の研究によって、肺腺癌においても同様に腫瘍抑制遺伝子として機能していることが明らかにされている。これまでの報告から、腫瘍抑制の主たる分子機構として、cdk 阻害分子 p21 の発現を誘導することにより cdk のキナーゼ活性を阻害する経路の存在が明らかにされている。

そこで、RUNX3 による p21 の発現誘導に関する cyclin D1 の機能に集中して解析を行った結果、以下の新規の知見を得ることができた。

①肺腺癌細胞株における cyclin D1 の発現レベルと p21 の発現レベルには負の相関関係が観察される。

②cyclin D1 は、レポーターアッセイにおいて RUNX3 による p21 promoter の転写活性化を阻害し、この阻害効果は cyclin D1 による cdk4/6 のキナーゼ活性の活性化を必要としない。

③cyclin D1 は、RUNX3 の DNA 結合ドメインである RUNT ドメインと、その C 末端側にある転写活性化ドメイン(コアクチベーター p300 との結合領域である)を介して cyclin D1-RUNX3 複合体を形成しうる。

④cyclin D1-RUNX3 複合体形成は RUNX3 の DNA 結合を阻害しない。

⑤cyclin D1-RUNX3 複合体形成はコアクチベーター p300 による RUNX3 のアセチル化を阻害し、この機能が RUNX3 の転写活性の抑制に必要とされる。

⑥cyclin D1 の発現レベルが低い肺腺癌細胞株に cyclin D1 を強制発現させると、p21 遺伝子の転写調節領域における内在性の RUNX3 の結合に変化はみられないが、結合している内在性 p300 の結合は減弱する。

⑦cyclin D1 の発現レベルが低い肺腺癌細胞株に cyclin D1 を強制発現させると、内在性

の p21 の発現レベルが減少する。

⑧肺腺癌細胞株に RUNX3 を強制発現させることにより、p21 の発現レベルが上昇し、増殖が抑制されるが、この状態の細胞株に cyclin D1 を重複して強制発現させると p21 の発現レベルが減少し、RUNX3 による増殖抑制効果が解除される。

これらの知見は、肺腺癌細胞における cyclin D1 の発現レベルの亢進が、単に cdk4/6 の活性化を介して細胞周期回転を亢進させているわけではなく、いくつかの転写制御因子を標的として、それらの分子の転写活性を変化させることで細胞癌化に寄与していることを強く示唆している。われわれの発見とはほぼ同時期に Piotr Sicinski 博士のグループがマウス遺伝学的手法を駆使して、マウスの胎児発生における cyclin D1 の主たる機能が cdk4/6 の活性化を介した細胞周期制御ではなく、転写制御であることを明快に示した。

今後、cyclin D1 のみならず、組織特異的に高発現している細胞周期制御分子の機能解析を通じて細胞増殖・分化・癌化の接点となる新たな分子機構を見出し、特に癌の治療における新規の分子標的の創出につながる可能性が期待され、その点で本研究は意義深いものであったと考えている。

## 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 2 件)

①Yoshida R, Fujimoto T, Kudoh S, Nagata M, Nakayama H, Shinohara M, Ito T  
Nucleostemin affects the proliferation but not differentiation of oral squamous cell carcinoma cells  
Cancer Science、査読あり、Vol.102、No. 7、pp.1418-1423、2011 年

②Iwatani K\*, Fujimoto T\*, Ito T (\* equally contributed authors)  
Cyclin D1 blocks the anti-proliferative function of RUNX3 by interfering with RUNX3-p300 interaction  
Biochemical and Biophysical Research Communications、査読あり、Vol.400、No. 3、pp.426-431、2010 年

[学会発表] (計 1 件)

① 藤本哲広 細胞周期制御因子 cyclin D1 による転写制御因子 RUNX3 との相互作用を介した肺腺癌細胞の増殖制御機構  
第 98 回日本病理学会(国立京都国際会館)、2009 年 5 月 2 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 哲広 (FUJIMOTO TETSUHIRO)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号：70359818

(2) 研究分担者

伊藤 隆明 (ITO TAKAAKI)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：70168392