

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21770001

研究課題名（和文） モデル動物を用いた発癌における細胞増殖、細胞死制御の影響の分子生物学的解析

研究課題名（英文） Analysis of the effects of cell growth and cell death regulation on tumor development using tumor mice models

研究代表者

鈴木 亨 (SUZUKI TORU)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：50334280

研究成果の概要（和文）：

tob 遺伝子を欠損したマウスと癌遺伝子Rasを肝臓に発現するマウスを交配し、癌遺伝子Rasの発現に加えて *tob* 遺伝子の欠損が伴うと肝臓癌の発症時期は数ヶ月早くなり、また個体当たりの癌の数・大きさがそれぞれ有意に増加することを発見した。双方の遺伝子改変マウスで遺伝子発現を比較し、いくつかの発癌に関わる遺伝子の発現量に顕著な相違があることを見出した。10対以上のマウス検体の解析でほぼ同様の結果を得たので、肝臓癌発症の原因に繋がる遺伝子発現の変動であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Transgenic mice in which constitutively active Ras is specifically expressing in the liver (RasV12-liver mice) develop hepatocellular carcinoma (HCC). We found that the Ras-transgenic mice much more frequently develop HCC in the absence of Tob protein. Furthermore, the size of the tumors was obviously larger in the absence of Tob protein. These data suggest that Tob is responsible for suppressing HCC development and proliferation. We also examined the difference of gene expression between RasV12-liver mice and RasV12-liver mice lacking Tob. We observed the expression change in several genes involved in cell growth and death regulation. The expression change of those genes was similarly detected in more than ten mice samples, indicating that those genes are critically responsible for HCC development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：発癌モデルマウス、細胞死、Tob、DNA 損傷

1. 研究開始当初の背景

研究代表者が癌発症の分子機構を解析していく上で対象としている Tob タンパク質は、アミノ末端側に細胞増殖抑制活性に必要な約 100 アミノ酸からなる共通構造を持つタン

パク質ファミリーメンバーの 1 つである。これまでに Tob の細胞増殖抑制活性は増殖因子刺激を受けていない細胞を静止状態に維持する役割を持つこと、及びその細胞増殖抑制活性は増殖因子からのシグナル伝達による

リン酸化で調節されていることを見出し、リン酸化する酵素も同定した。無秩序に増殖し、静止状態を維持できないことが癌細胞の特徴の1つであることから、このTobの作用は癌の発症抑制と関わりが深いと考えられた。*tob* 遺伝子を欠損したマウスを作製し、そのマウスは野生型マウスに比べて腫瘍の自然発症率が実際に高いことも示してきた。さらに p53 遺伝子の欠損を組み合わせると、それぞれの遺伝子単独欠損より重篤になることも示唆してきた。しかし、Tob が実験動物レベルで癌を抑制する働きをもつことが示唆された一方、最終的に癌化にいたるまでに細胞がどのような経過を辿ったのか、発症した癌がどのような性質を有しているのかは全く明らかになっていなかった。同時に申請者らはこれまでの研究成果として、紫外線照射により DNA 損傷を受けた細胞が引き起こす細胞死の制御機構にも Tob タンパク質が関与することを見出ししていた。DNA 損傷応答の異常と癌化亢進の密接な関係は、多くの癌抑制遺伝子が DNA 損傷応答反応に関与していることから明らかである。秩序ある増殖を維持する機構と異常細胞を除去するための細胞死制御機構の破綻は、いずれも癌発症の主要な要因になると考えられる。Tob は細胞増殖抑制活性と細胞死抑制活性の両方を有していることが示されたので、2 つの機能が個体内でどのような変遷を経て最終的に癌発症にいたるのかを検討するのに非常に良い題材と考えた。

2. 研究の目的

Tob タンパク質を欠損した細胞がどのような経過を辿り発癌にいたるのか、発症した癌がどのような性質を有しているのかを動物モデルを用いて明らかにする。主に遺伝子発現の相違やタンパク質修飾・活性化状態に注目する。進行状況に応じていくつかの癌関連遺伝子を組み合わせた遺伝子改変マウスの作製や癌発症に至るまでの幾つかの週齢で標品を作製し、解析を行う。それらの結果を統合して、癌発症の分子機構・癌細胞の特質をより詳細に理解することを目的とした。並行して、癌発症の過程で DNA 損傷応答反応の活性化が観察されるとともに、*tob* 遺伝子も DNA 損傷応答に関与することを見だしていたので、Tob タンパク質を制御する分子機構解明も重要になると考えた。紫外線照射や抗癌剤処理を細胞に施した時に、*tob* 遺伝子が強く発現上昇することを検出しているため、その系を利用してレポーターアッセイを基盤に *tob* 遺伝子プロモーター上の必要領域の探索、関与する転写因子の同定を生化学的に行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *tob* 遺伝子欠損マウスと癌抑制遺伝子 p53 を欠損しているマウスや癌遺伝子である恒常活性化型変異 Ras を肝臓特異的に発現するトランスジェニックマウスを交配し、得られた個体で発症する癌の病態・悪性度等の相違を調べる。*tob* 遺伝子の量的変化の及ぼす影響について調べるため、必要に応じてヘテロ欠損体も用意し、発症した腫瘍について上記項目の比較をする。p53 遺伝子欠損マウスや恒常活性化型 Ras のトランスジェニックマウス自体が *tob* 遺伝子を欠失していない状態でも、加齢によってある頻度で癌を発症するので、*tob* 遺伝子の欠失が発症時期、癌の性質、大きさにどのような変化をもたらすのかを詳細に調べる。p53 遺伝子欠損を組み合わせたマウスでは高頻度に発症する部位の変化にも注目する。

(2) 癌化の進行過程におけるそれぞれの因子の遺伝的相互作用を調べるために、腫瘍を高頻度に発症する組織、癌遺伝子の発現を誘導した組織の切片を作製する。その切片に対してアポトーシスの頻度、異常増殖する細胞の有無、細胞増殖関連遺伝子の発現変動、DNA 損傷応答の活性化の有無などの項目について調べるために各種抗体を用いた免疫組織染色や TUNEL 染色を行う。相違が生じている部位や癌の性状を特定するために HE 染色も行う。さらに、どのような経過を辿っていくのかを解明するために、出生後、経時的に組織検体を回収して切片を作製する。癌細胞そのものに加えて周辺細胞・環境の変化にも注目する。

(3) 各遺伝子改変マウスで生じた癌にどのような特徴があるかをより詳細に理解するために、遺伝子発現についてはマイクロアレイ解析、タンパク質レベルでの変化については等電点と分子サイズによる 2 次元電気泳動を行う。主に細胞増殖・細胞死・血管新生の制御に関わる遺伝子群の全体的な変動に注目することで生じた癌の特徴を理解する。同時に癌発症の原因となり得る変動があるかどうかとも検討する。解析用検体は各遺伝子改変マウスで生じた組織の癌部と非癌部それぞれから調製し、比較することにより、標的とする因子（発癌に影響した因子、遺伝子型の違いにより相違がもたらされる因子）の同定を的確に行う。

4) *tob* 遺伝子の発現が上昇する分子機構を明らかにする。研究代表者は既に紫外線による DNA 損傷では Tob の発現が損傷を受けた直後、急速に上昇することを見だしている。まずは紫外線以外の DNA 損傷を引き起こした場合にはどのような発現変動を示すかを確認する。その後、ヒト・マウスのゲノム DNA から *tob* 遺伝子のプロモーター領域と考えられる部分をクローニングし、レポーター遺伝子の上流に挿入後、レポーターアッセイによ

りプロモーター活性の上昇の有無を測定する系を利用する。適宜、プロモーター領域を断片化・短縮することによって必要最小限の配列を見いだして、転写因子の候補を導き出す。並行してTobの発現上昇を抑制する阻害剤の探索やRNAiを用いて、関与する分子を探索するという手法も進める。

4. 研究成果

(1) *tob*遺伝子欠損マウスと癌遺伝子である恒常活性化型Rasを肝臓特異的に発現するトランスジェニックマウスを交配し、得られた個体で発症する癌の形態・悪性度等の相違を調べた。肉眼所見と病理解析の結果から、Rasの発現に加えて*tob*遺伝子の欠損が伴うと発症時期は数ヶ月程度早くなり、また個体当たりの癌の数・大きさがそれぞれ有意に増加することが分かった(図1)。一方で生じた癌の悪性度はほぼ同等であった。従って肝臓癌のマウスモデルにおいて*tob*遺伝子が癌抑制遺伝子として関与することが示唆された。その中で特にTobタンパク質が関与しているのは、癌の発症頻度、癌細胞の増殖であることが推測された。

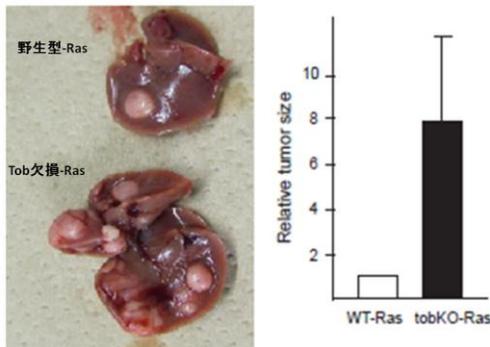


図1 Ras誘導性肝臓癌の*tob*遺伝子欠損による増強

(2) 同様に*tob*遺伝子の欠損とp53遺伝子の欠損を組み合わせた場合の評価も行った。その結果、p53遺伝子の単独欠損マウスが半年程度で癌を発症するのに対し、*tob*とp53の二重欠損マウスは3カ月程度で癌を発症することが分かった。その癌の多くは胸腺や脾臓におけるリンパ腫であったが、肝臓や腎臓、脾臓などには、p53や*tob*遺伝子単独欠損マウスでは全く生じない肉腫の発症を有意な頻度で検出した。また、p53遺伝子と*tob*遺伝子の組み合わせでは、遺伝子量変化も大きく影響することが観察された。具体的にはp53遺伝子欠損マウスや、p53遺伝子ヘテロ欠損マウスでは、*tob*遺伝子が野生型、ヘテロ欠損型、完全欠損型と*tob*の遺伝子量が減少するに従い、癌の発症頻度、癌による死亡率が上

昇した(図2)。

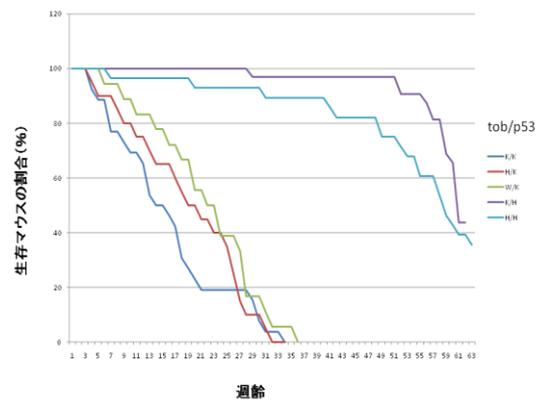


図2 遺伝子改変マウスの生存曲線

(3) 遺伝子改変マウスで生じた癌にどのような特徴があるかを詳細に理解するために、遺伝子発現マイクロアレイ解析を行った。本研究ではRas遺伝子と*tob*遺伝子欠損を組み合わせたマウス検体を利用した。統計学的評価の結果、細胞増殖や細胞死の制御に関わる遺伝子群として、*IGF-1*や*BTG2*など8種類の遺伝子に顕著な発現変動があることを見出した。定量的PCRとノザン解析を行うことで、実際に発現量に差があることを確認した(図3)。さらに10対以上の検体からRNAサンプルを抽出し、いずれの例においても当該遺伝子が同様の発現変動を示すことも確認できた。しかし、これらの遺伝子変動は癌の有無との相関は非常に強いが、*tob*遺伝子の有無とは関連がないものであった。そこで、*tob*遺伝子の欠損が発癌促進に及ぼした影響を理解するためのマイクロアレイ解析を再度実行した。現在、データ解析により候補遺伝子を絞り込んでいる。この解析をさらに進めることにより癌発症や癌細胞の増殖を大きく促進することに関与する遺伝子発現変動をつきとめることができるので、今後も解析を行う予定である。

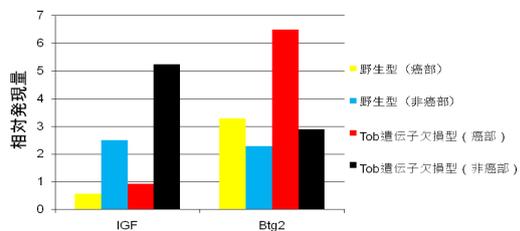


図3 定量PCRによる肝臓の各部位での遺伝子発現量の比較

(4) DNA損傷後、細胞死を抑制するために*tob*遺伝子の発現が上昇してくる分子機構の

解明に取り組んだ。*tob* 遺伝子の 5' 上流領域をクローニングしてレポーター解析を行うことで、DNA 損傷時に *tob* 遺伝子を誘導するために転写因子が結合する最小単位の同定を試みた。比較的短い DNA 領域内に絞ることができ、いくつかの候補因子が得られた。しかし、その候補因子はいずれも *tob* の発現誘導に影響しないことが RNAi による評価から判明した。そこで、並行して進めていた、もう一方の解析に重点を置き、*tob* 遺伝子の発現誘導を強く抑制する低分子化合物を発見したので、その後の解析に利用した。まずは、その化合物の標的分子が不明であったので、その標的分子を同定するために、タンパク質の 2 次元電気泳動解析を行い、いくつかの候補分子を得ることができた。RNAi でそれらの分子の発現を抑制した時に、Tob タンパク質の上昇が起こらなかったため、少なくとも化合物 A の抑制するシグナル伝達上にある分子であることが確認できた。また、その化合物の効果は発現誘導された Tob タンパク質を分解へと導くものであることが分かった。以降の生化学的解析を進めていき、不要な細胞死を防ぐために細胞死を抑制する効果を持つ Tob をタンパク質は DNA 損傷時に上昇してくるが、その際、分解誘導機構から防御するための因子群が作用していることを新たに発見した。

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 1 件)

Watanabe M., Suzuki T., Kim M., Abe Y., Yoshida Y., Sugano S., Yamamoto T.
Coronin7 forms a novel E3 ubiquitin ligase complex to promote the degradation of the anti-proliferative protein Tob, FEBS letters、査読有り、585巻、2011年、65-70

[学会発表] (計 2 件)

- ① ▪鈴木亨、Decision of DNA damage-induced apoptosis by regulating the Tob protein level、第 33 回 日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド
- ② ▪鈴木亨、DNA 損傷時の Tob 発現誘導の分子機構第 69 回 日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 24 日、大阪 (大阪国際会議場)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 亨 (SUZUKI TORU)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：50334280

(2) 研究分担者

なし ()