

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790204

研究課題名（和文） P I C T 1 遺伝子の機能解析研究～核小体における細胞・個体の運命決定機構～

研究課題名（英文） Regulation of p53 pathway and Tumor Growth by Novel Nucleolar Protein PICT1

研究代表者

河原 康一 (KAWAHARA KOHICHI)

九州大学・生体防御医学研究所・ゲノム腫瘍学分野

研究者番号：00400482

研究成果の概要（和文）：

癌抑制経路で機能する MDM2-p53 経路は種々の細胞障害性ストレスによって活性化される。DNA 障害などのストレス応答では ATM-Chk2 や ATR-Chk1 のカスケードが活性化され、発がん遺伝子の発現やウイルス感染等は p19ARF の発現を誘導し、さらに核小体ストレス応答においては、RPL5、RPL11、RPL23、RPS7 等のリボソーム蛋白質によるカスケードが活性化され、これらはいずれも p53-MDM2 経路の活性を引き起こす。これらのうちリボソーム蛋白質は、通常核小体に局在するが、核小体ストレスを受けると速やかに核小体から遊離し、核質に存在する MDM2 と結合し機能を阻害することで p53 蛋白質を安定化させる。しかしながら、p53 経路を制御するリボソーム蛋白質が個体での発がん制御に関わるのか、リボソーム蛋白質を核小体にとどめる機構についてはこれまでに不明であった。我々は PICT1 がリボソーム蛋白質の核小体局在を調節することで、核小体ストレス応答における MDM2-p53 経路を制御することを明らかとした。さらに、PICT1 の発現はヒト大腸がんの進展と相関を認め、PICT1 が独立した予後予測因子であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

The tumor-suppressive MDM2-p53 intracellular signaling pathway is activated by cellular stress. Such stress includes DNA damage, which triggers the ATM-Chk2 and ATR-Chk1 cascades; infection or oncogene activation, which induce the p19ARF pathway; and nucleolar stress, which initiates a cascade mediated by ribosomal proteins (RPs), particularly RPL5, RPL11, RPL23, and RPS7. These RPs are usually located in the nucleolus but are rapidly released into the nucleoplasm upon nucleolar stress, activating the MDM2-p53 pathway. However, it is unknown whether there are direct connections between p53-activating RP genes and cancer development in vivo, and which mechanism these RPs employ to translocate from the nucleolus to the nucleoplasm in response to stress. Using in vivo and in vitro experiments involving both human and murine tissues, we show that novel gene, Pict1, is a key regulator that acts through RP to control MDM2-p53 responses to nucleolar stress. In addition, Pict1 expression correlates with human colon cancer progression in human.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学

キーワード：細胞増殖、細胞死

1. 研究開始当初の背景

PICT1は癌抑制遺伝子PTEN結合分子として単離されており、*in vitro*でPTENを安定化させ、細胞増殖を抑制することから、新規癌抑制遺伝子であると考えられていた。しかしながら、PICT1の遺伝子座を含むゲノム領域を欠損したグリオーマ患者では著しく予後が良好であることも報告されていたため、生体内でPICT1が癌抑制に働くのか、癌促進に作用するのかが不明であった。

2. 研究の目的

本研究ではPICT1欠損マウスやPICT1欠損ES細胞を作製し、PICT1の生理機能を明らかにする。なかでも、(1) PICT1はがん抑制遺伝子として働くのか(2) PICT1の作用がどの程度PTENに依存性であるか(3) PICT1が作用するPTEN以外の標的分子、(4) ヒトにおいてPICT1の関わる疾患、を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

まず我々はPICT1の生理機能を明らかにするため、PICT1欠損マウスを作製し、その表現形を解析した。次にPICT1欠損ES細胞を樹立し、PTENやその下流分子の発現、p53を含むその他の癌関連分子の発現変化、さらには細胞増殖、細胞死への作用を検討した。PICT1の欠損はp53発現増加による細胞増殖を抑制することから、次にPICT1欠損マウスでの皮膚化学発がんの発症率を比較し、PICT1の発がんにおける役割を解析した。さらにヒト大腸がん患者からのRNAを抽出し、PICT1遺伝子発現と予後との相関を解析した。

4. 研究成果

PICT1を欠損するES細胞やPICT1欠損マウスを作製し、PICT1の機能解析について、以下の結果を得た。

(1) PICT1欠損による胎生致死:

PICT1欠損マウスは胎生3.5日までに致死となった(図1)。そこで胎生2.5日胚を*in vitro*で胚培養したところ、コンパクション以降の障害があることが判明した。このように、PICT1は初期発生に必須の分子であることを明らかとした。

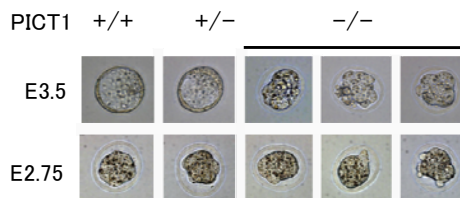


図1. PICT1欠損による胎生致死

(2) PICT1欠損ES細胞におけるp53の増加と細胞周期停止・細胞死亢進:

Doxycyclin添加依存性にPICT1を欠損できるES細胞を樹立し、PICT1欠損ES細胞は細胞周期停止・細胞死亢進を呈して、5日以上生育させることは不可能であった(図2)。生化学的にはPICT1を欠損させると、PTEN蛋白質やその下流の活性化Akt蛋白質量に大きな差は認めないものの、p53やその下流のp21の発現が顕著に亢進し(図3)、増加したp53をsiRNAで抑制すると細胞周期停止・細胞死亢進はほぼ完全に回復した(図4)。これらのことからPICT1はp53の発現を制御し、PICT1欠損による細胞周期停止・細胞死亢進はp53に著しく依存性であることを見出した。

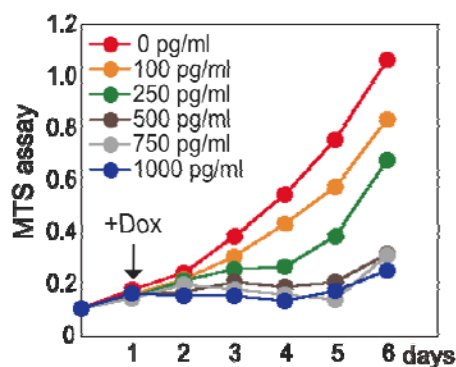


図2. Dox添加によるPICT1抑制時のES細胞の細胞増殖抑制

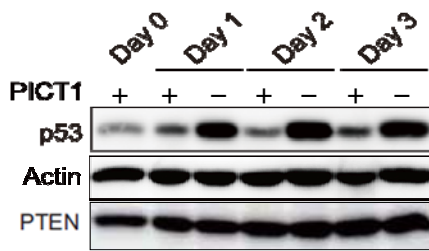


図3. p53経路の活性化

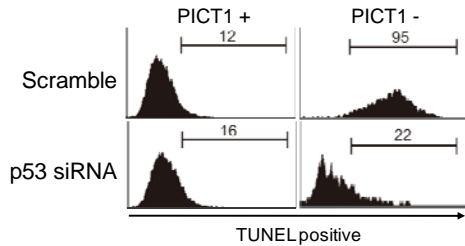


図4. p53依存性の細胞死の亢進

(3) PICT1 欠損 ES 細胞における p53 増加のメカニズムの検討

マス解析、免疫沈降法、免疫染色法等により PICT1 は核小体で RPL11 と結合すること、PICT1 が欠損すると RPL11 が核小体から核質に局在を変え (図 5)、核質に豊富にある MDM2 と相互作用し、MDM2 による p53 ユビキチン化能が阻害されることで p53 が安定化することを見出した (図 6)。

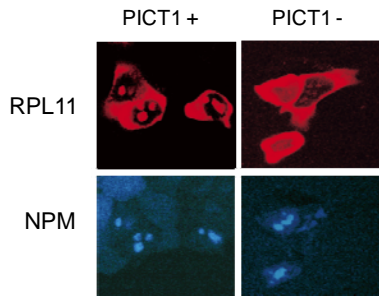


図5. RPL11の核小体からの遊離

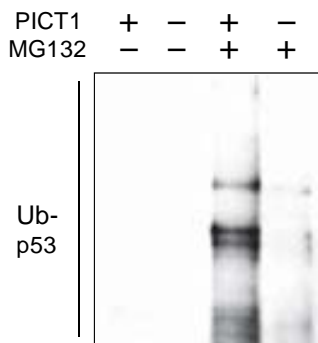


図6. PICT1欠損によるMDM2機能阻害

(4) PICT1 による腫瘍制御の解析:

PICT1 ヘテロ欠損マウスは、野生型マウスと比較して有意に皮膚化学発がんを抑制した。正常な p53 を発現する各種癌細胞に PICT1 発現を抑制すると p53 増加による細胞増殖抑制をみた。さらに、PICT1 発現低値のヒト大腸がんは生存期間の延長を認め (図 7)、この効果は p53 変異の有無に依存性であることを見出した。このことから、PICT1 はヒト大腸がんの予後予測因子となることを明らかとした。

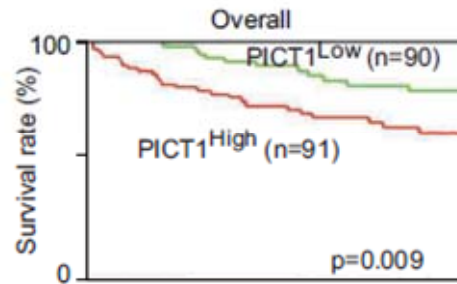


図7. PICT1低発現大腸がん患者は生存期間が延長

これまで PICT1 は PTEN を制御する癌抑制遺伝子であると予想されていたが、以上の研究成果から、PICT1 がリボソーム蛋白質を核小体に留め p53-MDM2 経路を制御すること、PICT1 ががん促進性に作用することを見出した。このことから PICT1 の制御機構や、PICT1 と RPL11 との結合領域を解析することによって、新規がん治療法の開発につながる可能性が考えられた。

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)

Masato Sasaki*, Kohichi Kawahara*, Miki Nishio, Koshi Mimori, Ryunosuke Kogo, Koichi Hamada, Bunsho Itoh, Jia Wang, Yukako Komatsu, Yong Ryoul Yang, Hiroki Hikasa, Yasuo Horie, Takayuki Yamashita, Takehiko Kamijo, Yanping Zhang, Yan Zhu, Carol Prives, Toru Nakano, Tak Wah Mak, Takehiko Sasaki, Tomohiko Maehama, Masaki Mori and Akira Suzuki (*:These two authors contributed equally to this work as first authors), Regulation of the MDM2-P53 Pathway and Tumor Growth by PICT1/GLTSCR2 via Nucleolar RPL11, *Nature Medicine*, in press.

[学会発表] (計 13 件)

①河原康一、西尾美希、三森功士、古後龍之介、濱田浩一、佐々木雅人、前濱朝彦、森 正

樹、鈴木 聡、新規遺伝子 PICT1 (GLTSCR2) による p53 経路や腫瘍進展の制御～核小体を起点とする p53 制御機構～、「がん研究支援班」個体レベル研究のワークショップ、大津、2011年2月

②西尾美希、濱田浩一、王 嘉、伊東文祥、河原康一、佐々木雅人、鈴木 聡、MATS (Mob1) による個体発生と腫瘍発症制御、「がん研究支援班」個体レベル研究のワークショップ、大津、2011年2月

③河原康一、西尾美希、佐々木雅人、古後龍之介、三森功士、佐々木雄彦、前濱朝彦、森正樹、鈴木聡、Identification of a novel gene PICT1/GLTSCR2 which regulates MDM2-p53 pathway and tumor growth
BMB 学術集会、神戸、2010年12月

④伊東文祥、岸本宏之、西尾美希、河原康一、佐々木雄彦、鈴木 聡、PI3Kgamma governs the onset of T cell lymphomas by PTEN deficiency、日本血液学会学術集会、横浜、2010年9月

⑤河原康一、佐々木雅人、西尾美希、古後龍之介、三森功士、濱田浩一、伊東文祥、佐々木雄彦、前濱朝彦、森 正樹、鈴木 聡、Identification of a novel gene PICT1/GLTSCR2 which regulates MDM2-p53 pathway and tumor growth、第69回日本癌学会学術集会、大阪、2010年9月

⑥西尾美希、濱田浩一、佐々木雅人、伊東文祥、王 嘉、小西弘晃、河原康一、佐々木雄彦、鈴木 聡、The role of the tumor suppressor gene MATS1 (Mob1) in the Hippo signaling pathway、第69回日本癌学会学術集会、大阪、2010年9月

⑦Miki Nishio, Kohichi Kawahara, Masato Sasaki, Koichi Hamada, Shoko Kurod, Miyuki Natui, Yasuo Horie, Takehiko Sasaki, Tomohiko Maehama, Akira Suzuki, PICT1 is a Critical Nucleolar Latch of RPL11 to Regulate MDM2/HDM2-p53 Pathway. 1st Japanese Society of Hematology (JSH) international symposium & European Society of Hematology (ESJ) joint symposium、秋田、2010年7月

⑧鈴木 聡、濱田浩一、西尾美希、王 嘉、伊東文祥、河原康一、佐々木雅人、佐々木雄彦、Mats 欠損による個体発生と腫瘍発症制御 Mats による個体発生と腫瘍発症の制御
日本細胞生物学会学術集会、大阪、2010年5月

⑨河原康一、佐々木雅人、西尾美希、濱田浩一、佐々木雄彦、前濱朝彦、鈴木聡、PICT1 遺伝子の機能解析～核小体を起点とした p53 遺伝子の制御～、宮崎サイエンスキャンプ、宮崎、2010年02月

⑩濱田浩一、西尾美希、河原康一、小西弘晃、

王嘉、鈴木聡、癌抑制遺伝子 Mats の役割、日本生化学会、神戸、2009年10月

⑪西尾美希、河原康一、佐々木雅人、前濱朝彦、佐々木雄彦、鈴木聡、PTEN 結合分子 PICT1 の細胞分化における機能解析、日本血液学会学術集会、2009年10月

⑫河原康一、佐々木雅人、西尾美希、濱田浩一、前濱朝彦、佐々木雄彦、鈴木聡、PTEN 結合分子 PICT1 の機能解析、日本癌学会、横浜、2009年10月

⑬Akira Suzuki, Masato Sasaki, Kohichi Kawahara, Miki Nishio, Koichi Hamada, Shigehisa Yanagi, Tae Narita-Inoue, Motomu Manabe, Tomohiko Maehama, Takehiko Sasaki, Function of the tumor suppressor gene PTEN and its binding protein PICT1, GCOE International Symposium、2009年5月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: Suppression of onset and development of cancer by suppressing PICT1, and PICT1 as prognostic marker of cancer patients.
発明者: 佐々木 雅人、河原 康一、古後龍之介、三森 功士、森 正樹、鈴木 聡

権利者: 九州大学

種類: 米国プロビジョナル出願

番号: 61/368880

出願年月日: 2010年7月29

国内外の別: 米国(国際)

○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

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/hassei/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河原 康一 (KAWAHARA KOHICHI)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号: 00400482

(2) 研究分担者：該当なし

(3) 連携研究者：該当なし