

複合変異マウスをもちいたがん化・転移シグナルの解明からヒトがん治療への応用へ

1. 本研究の背景と目的

Rb癌抑制遺伝子を欠損した細胞では、Ras活性の亢進が観察される。このことのがん化における意義を探索するため、RbとN-ras遺伝子の複合変異マウスの腫瘍表現型解析を行った。Rbヘテロ型欠損マウスは、脳下垂体中葉細胞と甲状腺C（カルシトニン産生）細胞において、正常アレルの体性欠損により、それぞれ、下垂体腺癌（悪性）、C細胞腺腫（良性）を生じる。まず、野生型N-ras遺伝子を欠損すると、Rb欠損下垂体腺がんの分化が亢進し、その浸潤性を著明に抑制することがわかった。このことは、ras遺伝子に活性化型の突然変異を持たない腫瘍でも、Ras活性の阻害剤が、治療効果をもたらす可能性があることを強く示唆した。Rbパスイウェイに異常を持つ腫瘍の割合は大変高いので、この発見の臨床的意義は高いと考えた。一方、野生型N-ras遺伝子を欠損すると、Rb欠損C細胞アデノーマが悪性転換し、高率に肝転移することがわかった。RbN-rasをともにヘテロ型にしたマウスでは、Rbの正常アレル欠損に続いて、N-ras遺伝子座のLOHが観察され、特定の遺伝学的背景においては、N-rasが、がん抑制遺伝子様の挙動を示すことがわかった（高橋ら*Nature Genetics* 38: 118-123 2006）。本研究では、Rbを欠損したC細胞が、アデノーマ（良性）でとどまること、更に、N-rasの追加欠損が、悪性転換を誘導することのメカニズムを徹底的に追及することにより、RbとRasの遺伝学的関係ががんの悪性化の過程においていかなる役割を担うかを明らかにすることを目的とした。

2. 方法

Rbヘテロ型、RbヘテロN-rasホモ型マウスに生じるC細胞腫において、DNA複製・DNA損傷応答・細胞老化マーカー発現を比較した。Rbヘテロ型に加え、ATM, Ink4a, Arf, Suv39h1のいずれかをホモ型欠損するマウスを作製、C細胞腫の形態を観察した。ついで、Rb失活N-rasホモ型C細胞腫瘍株を樹立、野生型・がん原性N-rasを導入後、細胞の動態を観察した。この細胞において野生型N-rasのみが細胞老化を誘導する機序を探索した。また、初期培養線維芽細胞におけるRb-N-ras経路の役割を探索した。更に、Rbが野生型N-Rasの活性を転写制御依存的に調節する機構を探索するために、Rb失活N-rasホモ型C細胞腫瘍株においてRbを短時間再構成、マイクロアレイ解析によって、Rbの新規標的遺伝子を探索した。新規標的遺伝子のなかから、RbによるRas活性の制御に関与するものを同定、この生物学的意義の検証を行った。最後に、散発性ヒト甲状腺髄様がん13例におけるRb・N-Ras発現を検討した。

3. 研究成果

1. Rb欠損、RbN-ras二重欠損C細胞プライマリー腫瘍の比較観察

N-ras野生型Rb欠損C細胞アデノーマでは、 γ H2AX、ATMの1981番セリンリン酸化、p53の15番セリンリン酸化等のDNA損傷応答マーカーと、p16Ink4a、p19ARF、HP-1 γ の発現、ヒストンH2の9番リジントリメチル化、SA- β -gal活性陽性など、広汎なセネセンスマーカーの発現を観察した。

明らかにした画期的発見となった。さらに、ChIP 法、ルシフェラーゼアッセイ法を用いて、新規ターゲット遺伝子群のプロモーター領域構造の詳細な解析を行った。

6. 散発性ヒト甲状腺髄様がんの解析

我々の RbN-ras 二重欠損マウスに生じる腫瘍は、ヒトでは、甲状腺髄様がんに対応する。家族性のものは ret 遺伝子の突然変異が大半を占めるので、ピッツバーグ大学との共同研究により、ret 遺伝子の寄与の少ない散発性のヒト甲状腺

髄様がん 18 例のマイクロサテライトマーカー解析を行った。その結果、18 例中 10 例で、Rb と N-ras に重複して LOH が起きたことを示唆するデータを得た。更に、我々は、東京女子医科大学内分泌外科との共同研究により、国内の、散発性ヒト甲状腺髄様がんおよび、その前がん病変とみられる甲状腺 C 細胞腺腫 13 例の免疫組織学的精査を行い、Rb 蛋白質と N-Ras 蛋白質の発現を調

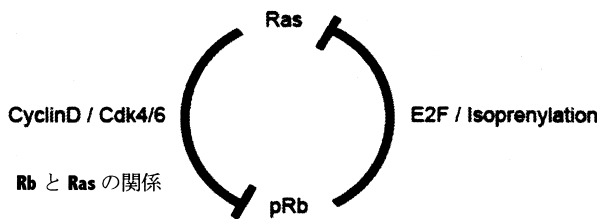


図3 Rb と Ras の関係

蛋白質イソプレニル化に関連する酵素群の転写制御を行う (図2)。よって、Rb が失活すると、Ras の成熟が促進され、活性化が更新する機会が増える。同様の機構により、Rb は様々な CAAX 蛋白質の活性制御にも関与する可能性が高い。Ras 突然変異がなくても、Rb 経路の失活した腫瘍をファルネシル阻害剤等の治療標的とすることの論理的基盤となる。また、Rb と Ras の相互拮抗関係は、細胞周期など、細胞の基本的な動態の制御機構に深く関わる可能性があり、本研究の生物学的な重要性を際だたせている。

5. 発表論文

1. Shamma, A., Takegami, Y., Miki, T., Kitajima, S., Noda, M., Obara, T., Okamoto, T. & Takahashi, C.

Rb regulates DNA damage response and cellular senescence through E2F-dependent suppression of N-Ras Isoprenylation. *Cancer Cell*, 15: 255-269 (2009).

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

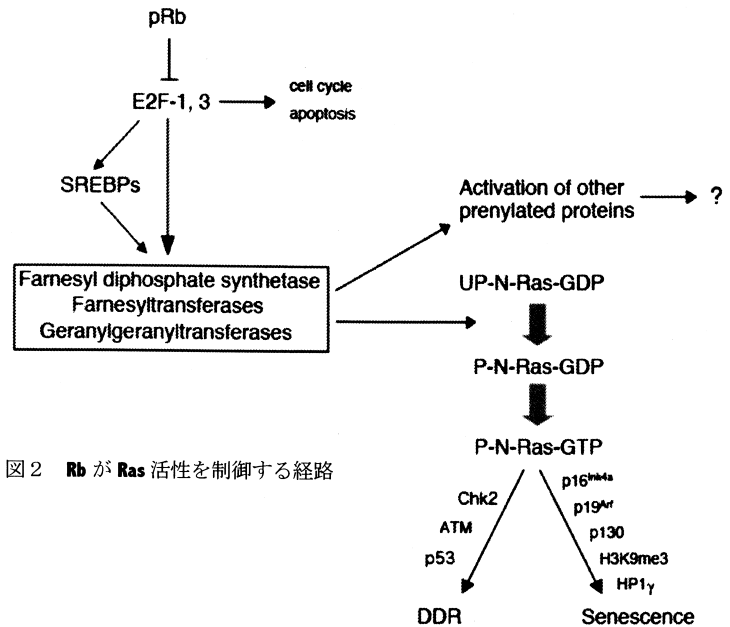


図2 Rb が Ras 活性を制御する経路

査した。Rb 発現の認められない症例 6 例全例において、N-Ras 発現が消失していた。

4. 考察

Rb は E2F あるいは SREBP を介して、