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へ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へテロ型、Rbへテロ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へテロ型に加え、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、 $HP-1\gamma$ の発現、ヒストン H2 の 9 番リジントリメチル化、 $SA-\beta$ -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。

一方、N-ras ホモ型 Rb 欠損 C 細胞腺がんでは、これらのマーカーの発現は著しく減弱していた。Rb を欠損したことにより、DNA 損傷とセネセンスが誘導され、細胞が完全に癌化することの障壁となっていること、また、その障壁の機能が N-ras に依存する事が示唆された。

Rb+/-;Ink4a-/-(9.2)

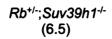






図1 複合変異マウスの (細胞腫

2. Rb とセネセンス、DNA 損傷応答関連遺伝子の複合 変異マウスの作製と観察

このことを遺伝学的に検証するため、Rb ヘテロ型に加え、p16Ink4a, p19ARF, ATM, Suv39h1 遺伝子をそれぞれ欠損したマウスを作製、その腫瘍表現型を長期間観察した。これらの遺伝子型のマウスに生じた Rb 欠損 C 細胞腫は、ほぼ全例が腺がんの組織型を示した(図1)。p16Ink4a, p19ARF, ATM, Suv39h1 単独欠

損マウスが、C細胞由来の腫瘍を発生することは無かった。

3. RbN-ras 二重欠損 C 細胞への野性型 N-ras の導入

N-ras ホモ型 Rb 欠損 C 細胞腺がんは、容易に株化することができた。この細胞に野生型 N-ras を導入し、ヌードマウスの皮下に移植したところ、N-ras 非導入株と比較して、良性の形質に近い組織型を示した。野生型 N-ras 導入後、この細胞株では、プライマリー腫瘍で観察されたのとまったく同様の DNA 損傷応答と、セネセンスマーカーの発現が観察された。コメットアッセイでは、実際に DNA 損傷を観察した。また、野生型 N-ras を導入した N-ras ホモ型 Rb 欠損 C 細胞腺がんでは、ヒストンメチル化酵素である Suv39hl が、Rb の類縁蛋白質である pl30 と複合体を形成することにより、ヒストン H3 のメチル化を促進することが示された。この複合体は、野生型 N-ras の代わりに、活性化型 N-ras を導入した場合には、形成されなかった。野生型 N-Ras の特異的機能を明らかにした。

4. RbN-ras 二重欠損繊維芽細胞の挙動観察

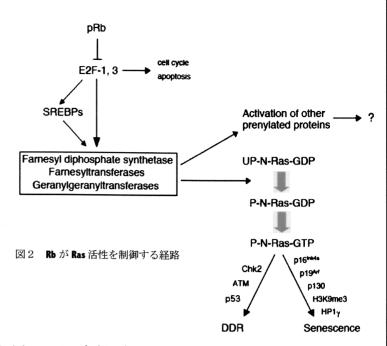
C細胞において観察された Rb と ras のセネセンス誘導における遺伝学関係が、他種の細胞でも成立するかどうかを問うた。野生型、Rb-/-、N-ras-/-マウス繊維芽細胞(以下 MEF)は、低細胞濃度でディッシュ上に播かれると、quiescence をおこし、コロニーを形成しない。とことろが、Rb-/-N-ras-/-細胞は、同条件で quiescence に陥らず、コロニーを形成した。この細胞は、3T3 プロトコール培養法においても、senescence に陥らないことが示された。次に、Rb-/-p16Ink4a-/-MEF を作製し解析したところ、Rb-/-N-ras-/-MEF とまったく同じ挙動を示すことがわかった。Rb と ras のセネセンス誘導における遺伝学関係は、一般化可能であること、そして、その関係は、p16 に依存する可能性が高いことが示唆された。

5. Rb 導入 RbN-ras 二重欠損 C 細胞のマイクロアレイ解析

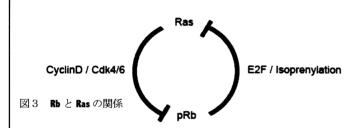
次に、Rb 欠損時に、どのようにして Ras は活性化されるのかを探求した。この作業には、株化された N-ras ホモ型 Rb 欠損 C 細胞腺がんが大いに役立った。この細胞では、恐らく N-ras を欠くために、Rb 蛋白質を再構成しても、いわゆる acute cell cycle arrest が起こらない。よって、細胞周期関連の遺伝子発現の変動が起こる前に RNA を抽出することにより、Rb と Ras を機能的にリンクする重要な候補遺伝子を見いだすことに成功した。これらは、従来の ChIP 解析法なのでは見つからなかった non canonical E2F ターゲット群であることも明らかになった。Rb 蛋白質の未知のターゲットと機能を

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 髄様がんに相当する。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



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、

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).