

転写因子による細胞癌化の制御

「遺伝と変化」領域 マーク ランフィアー

要旨と研究の狙い

細胞が癌化する場合、いくつかの生物機能が異常になっている。癌細胞においては、細胞増殖の抑制機構が機能しなくなり、通常では死ぬはずの状況下で細胞死が誘導されず、細胞老化することなく増え続ける。従って、細胞の癌化を研究することによって、細胞増殖、細胞死、細胞老化といった根本的な生物機能に洞察を加えることができる。Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1)は、当初、ウイルスやバクテリアに対する生体防御に重要な転写因子として研究されてきたが、最近、癌抑制機能の他、細胞周期・細胞死・DNA損傷に対する応答を制御する機能も持つことが明らかになった。本研究では、IRF-1による細胞増殖・細胞死の制御、細胞癌化の抑制、さらにこれらの機能に関与している標的遺伝子の同定を行った。加えて、別の癌抑制因子・転写因子であるp53との相互作用を解明し、共通の標的遺伝子の同定に成功した(図1)。

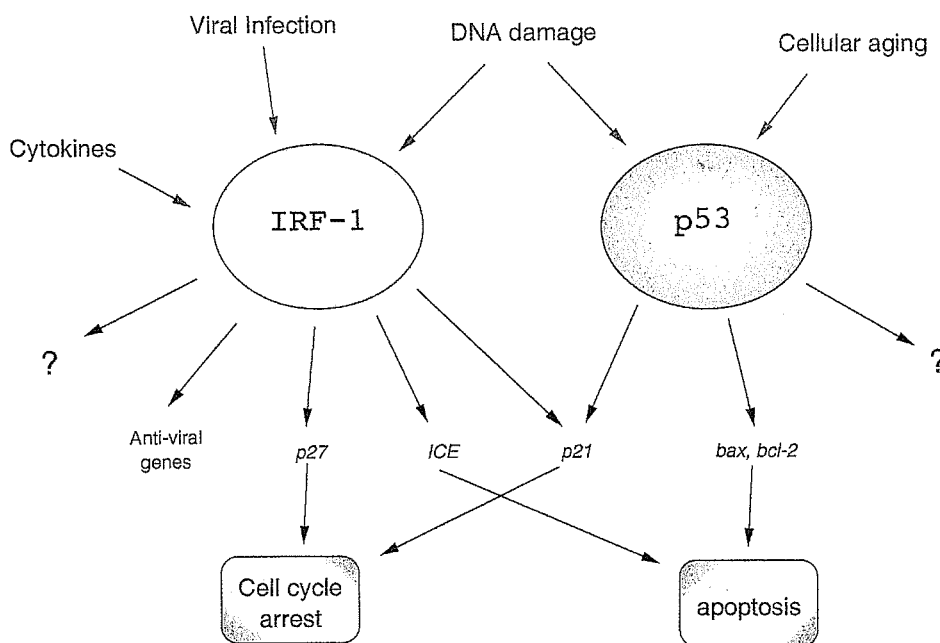
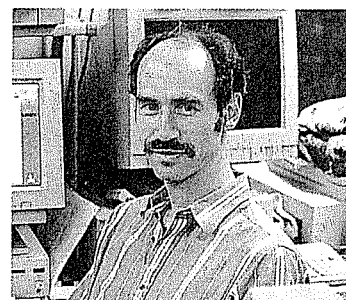


図 1

研究方法と成果

1) 細胞の癌化とIRF-1

初代胎仔線維芽細胞は発癌遺伝子の検出によく用いられている細胞系である。この細胞を癌化するには通常2個以上の発癌遺伝子を導入することが必要であるが、IRF-1及びp53欠損マウス由来の初代胎仔線維芽細胞では1個の発癌遺伝子の導入のみによって細胞が癌化されることが明らかになった。共同研究者の東京大学医学部の田中信之助教授はIRF-1及びp53欠損マウスから得た初代胎仔線維芽細胞に活性型c-H-rasの発現レトロウイルスを導入すると、細胞の飽和密度の上昇、足場依存性の消失、ヌードマウスでの腫瘍形成能を持つことを見出した。さらに、活性型c-H-rasを発現させた線維芽細胞では、DNA損傷によるアポトーシスの誘導にIRF-1及びp53が必須であることも明らかになった(図2)。以上の結果から、IRF-1はp53と似た機能を持つ癌抑制転写因子であり、アポトーシスの誘導にも関与していることがわかった。

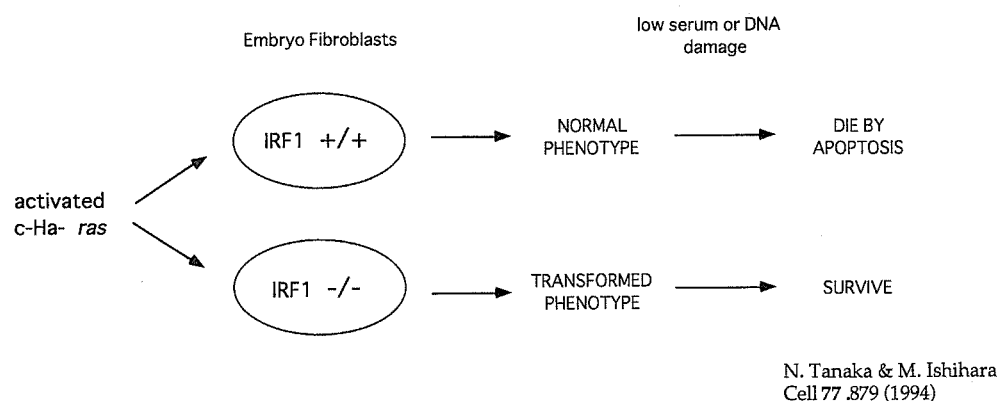


図2 IRF-1は細胞の癌化と細胞死を決定

2) 細胞増殖とIRF-1

IRF-1の機能を解析するため、培養細胞株でIRF-1の活性を人為的に調節できる系を確立した。IRF-1の活性を調節するため、IRF-1とエストロゲン受容体のキメラcDNAの発現ベクターを作製し(図5a)、このキメラcDNA(IRF-1/ER)をIL-3依存性の造血細胞(BAF-B03)に導入した。樹立した細胞株はエストロゲン非存在下ではIRF-1の活性がなく正常に増殖するが、培地にエストロゲンを入れるとIRF-1が活性化され、DNA合成及びG1期のcyclin-dependent kinase(cdk)活性がすみやかに減少し、24時間後には細胞がG1期に停止する(図3-a, b)。転

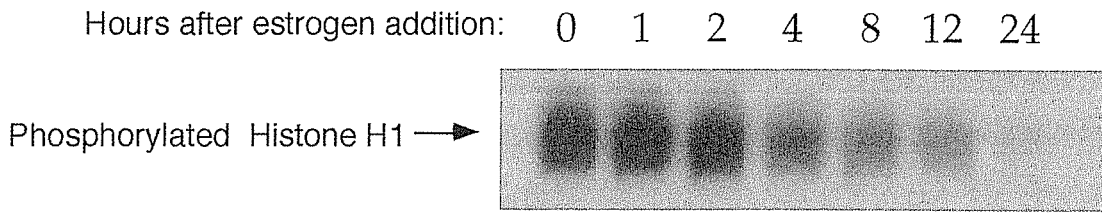


図3-a サイクリンE抗体による免疫沈降したキナーゼ活性

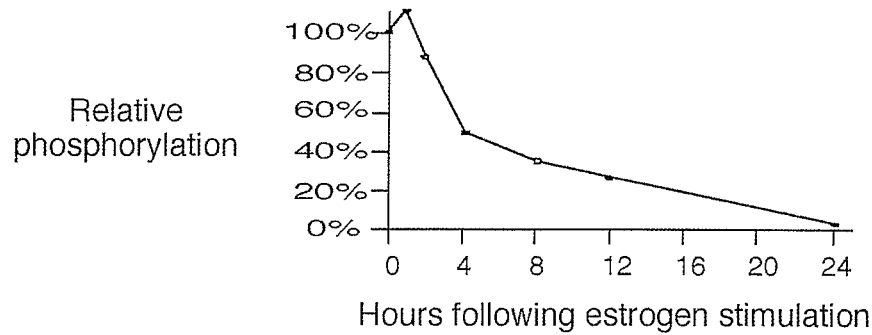


図3-b IRF-1高発現による細胞周期G1キナーゼ活性の急速な抑制

写活性化因子であるIRF-1と同一のDNA配列を認識する転写抑制因子IRF-2をIRF-1と一緒に過剰発現させると、細胞増殖は正常に戻る。この結果から、IRF-1による細胞増殖の抑制は単なる蛋白質過剰発現による毒性的効果ではなく、IRF-1（及びIRF-2）の標的遺伝子の活性化による効果と思われる。IRF-1の活性化によってCdk2活性が減少するにも関わらず、Western法で検出したcyclin及びcdkの発現が変わらないことから、このcdk活性の抑制には抑制因子が働いていると考えられた。そこで、既知のcdk抑制因子を調べた結果、cdk抑制因子であるp27/kip1の発現が初期から上昇することが明らかになった（図4）。

以上をまとめると、本研究によりIRF-1は標的遺伝子を誘導することによって細胞周期を抑制する機能をもつことが判明した。そしてその標的遺伝子の候補の一つとしてp27/Kip1が同定された。

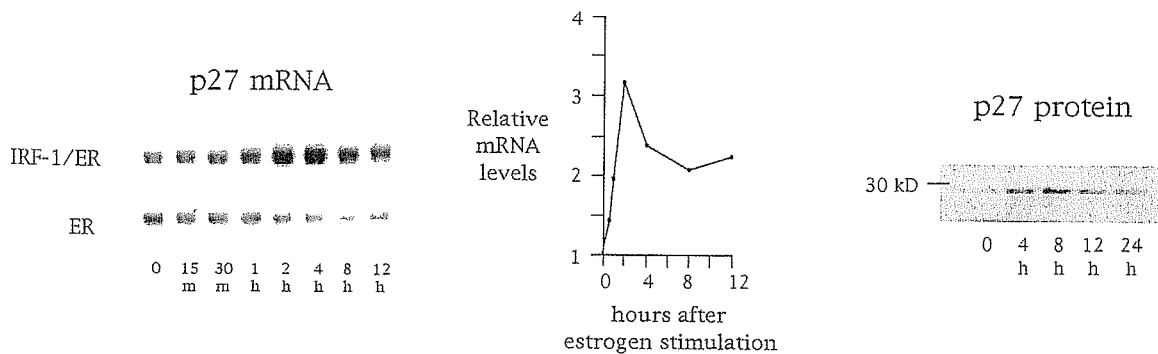


図4 IRF-1高発現によるp27の誘導

3) アポトーシスとIRF-1

上記の細胞株はエストロゲンの存在下で3日間培養をすると自発的に細胞死を引き起こす。細胞形態の変化やDNAの断片化パターンから、この細胞死はアポトーシスであると思われる。この細胞株はエストロゲン非存在下で放射線によるDNA損傷を誘導すると24時間後にアポトーシスが検出できるようになるが、エストロゲン存在下でDNA損傷を誘導すれば6時間後には細胞の3割程度が既に死んでいることを見出した(図5d)。この結果から、IRF-1の過剰発現はDNA損傷によるアポトーシスの誘導を促進することがわかった。

アポトーシス関連遺伝子をRNAブロット法で検討した結果、アポトーシスを促進する分子

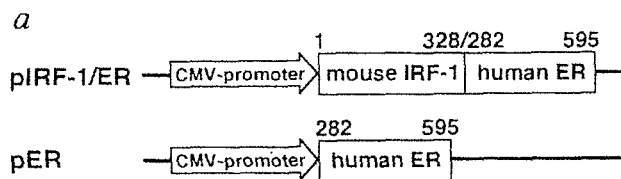


図5-a エストロゲン受容体・IRF-1のキメラ作製

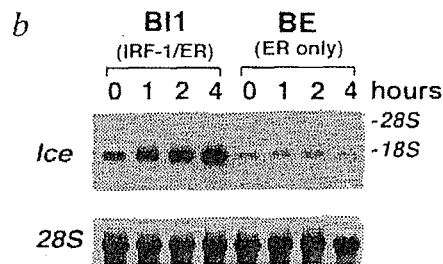


図5-b IRF-1高発現によるICE(Caspase-1)遺伝子の誘導

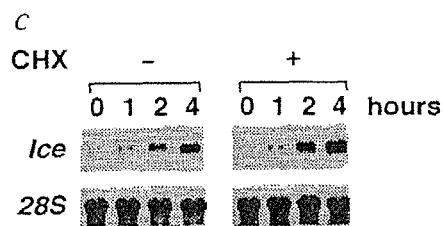


図5-c 蛋白質阻害剤存在化でのICE(Caspase-1)遺伝子の誘導

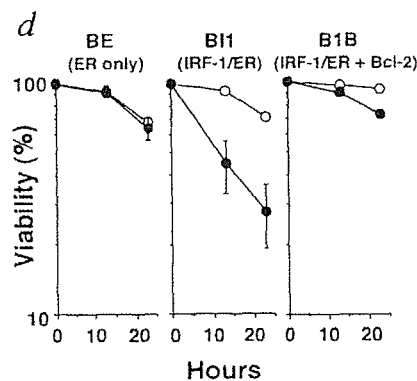


図5-d IRF-1は放射線照射による細胞死を促進

であるInterleukin-1 β -converting Enzyme (ICE/Caspase-1)のmRNA発現がIRF-1によって誘導されることが判明した (図5b)。ICE遺伝子は蛋白質翻訳の阻害剤であるCyclohexamideの存在下でもIRF-1によって誘導されること (図5c)、ICEのプロモーター領域にはIRF-1結合部位が存在することから、ICEはIRF-1の標的遺伝子であると考えている。

4) リンパ球のアポトーシスとIRF-1

リンパ球細胞はDNA損傷によってアポトーシスを引き起こすが、胸線の未熟T細胞ではこのアポトーシスが癌抑制因子p53に依存することがすでに知られている。IRF-1欠損マウス由来の胸腺T細胞では放射線によるアポトーシスは正常であるが、脾臓由来の成熟T細胞をマイトジェンで刺激すると、放射線によるアポトーシスに対して野生型マウス由来のT細胞に比べ強い抵抗性を示すことを見出した。このアポトーシス抵抗性はアドリアマイシンなどの抗癌剤を用いた実験でも確認された。一方でp53欠損マウス由来の成熟T細胞ではほぼ正常にアポトーシスが誘導された (図6)。従って未熟T細胞と成熟T細胞はそれぞれp53依存性、IRF-1依存性のアポトーシス経路が存在することが判明した。

IRF-1を過剰発現するとアポトーシスを促進するICE遺伝子が誘導されることを3) で示したが、脾臓由来T細胞のmRNA

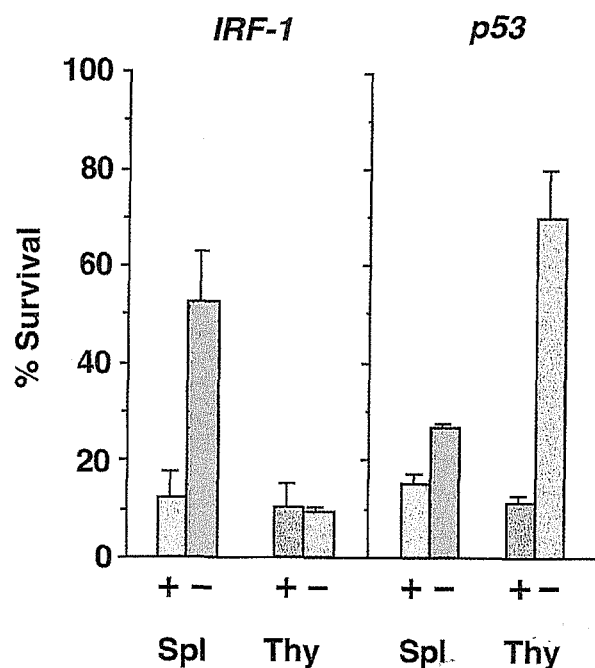


図6 野生型、p53欠損、IRF-1欠損脾臓細胞(Spl)及胸腺T細胞(Thy)における放射線照射による細胞周期停止

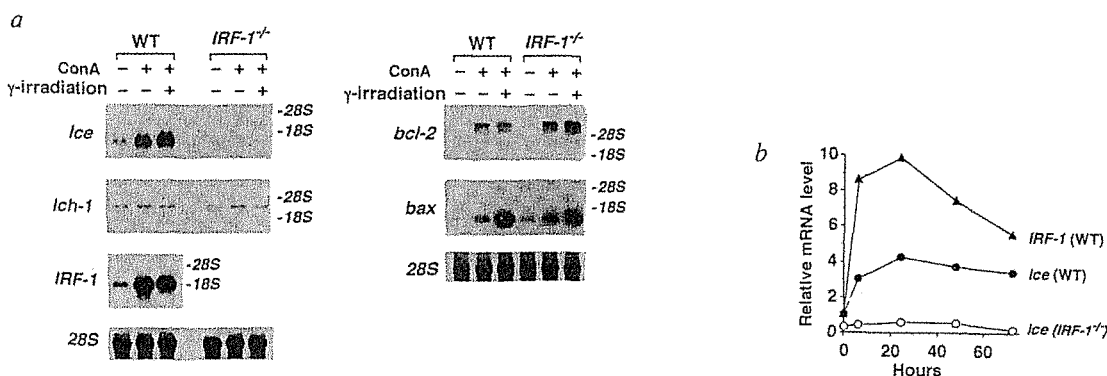


図7 マイトジェン刺激した脾臓細胞におけるIRF-1とICE(Caspase-1)の誘導

をブロット法で検討した結果、マイトジェン刺激によってIRF-1とICE遺伝子が共に誘導されることを見出した (図7b)。これに対して、IRF-1欠損マウス由来の脾臓細胞をでは、ICEの発現と誘導が見られなかった (図7a)。この実験により、ICEがIRF-1の標的遺伝子であることが確認ができた。

5) DNA損傷の応答とIRF-1

放射線またはアドリアマイシンのような抗癌剤によってDNA損傷が起こると、細胞周期はG1期で停止し、この細胞周期停止はp53が必須であることがすでに知られている。このような応答はDNA合成が始まる前にDNA修復を行い、突然変異が固定しないようにするためであると思われる。IRF-1欠損マウス由来の初代胎仔線維芽細胞を調べた結果、p53欠損細胞の場合と同様、DNA損傷による細胞周期停止が起らないことが明らかになった (図8)。

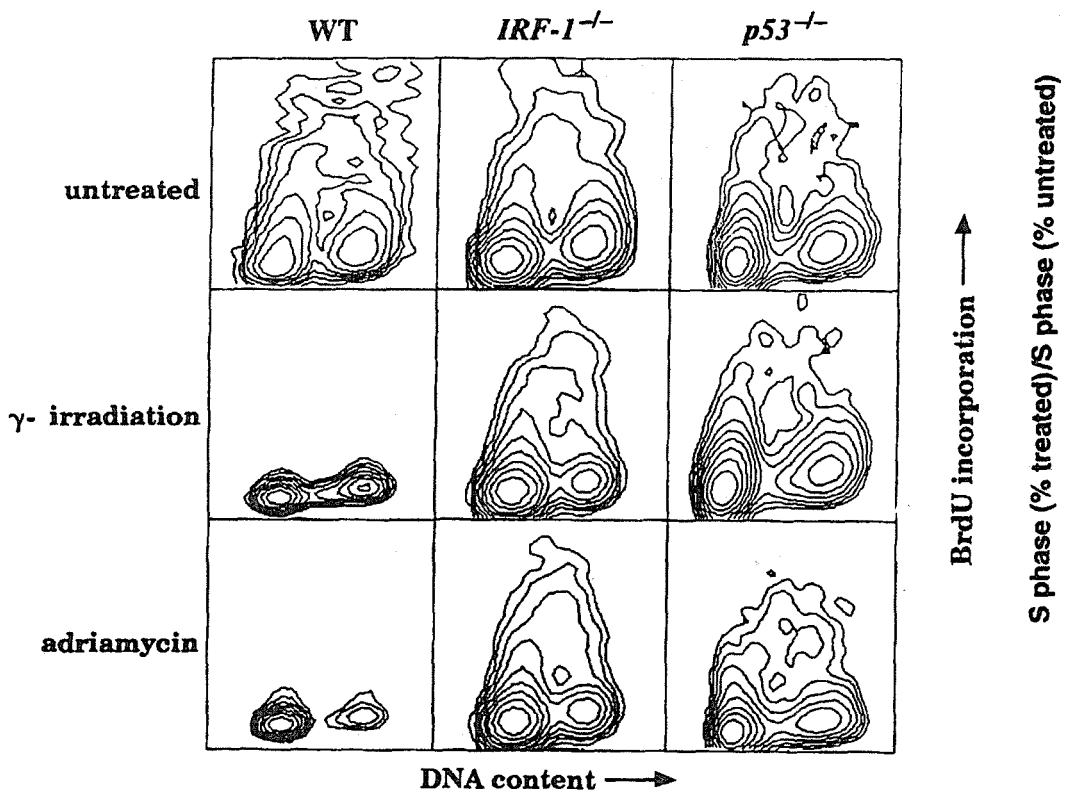


図8 野生型、p53欠損、IRF-1欠損マウスの初代胎仔線維芽細胞における放射線照射による細胞周期停止

DNA損傷が起こるとp53の蛋白質が安定化され、p53の標的遺伝子であるp21/Cip1が誘導されることが報告されている。p21/Cip1はCyclinおよびcdk kinaseに結合し細胞周期の進行を抑制するように働く。IRF-1欠損胎仔線維芽細胞においてもp53欠損細胞と同様に、放射線照射に

よるp21の誘導は認められなかった(図9a,b)。また、野生型細胞の場合、放射線を照射すればIRF-1蛋白質がp53と同様に安定化される(図9c)。遺伝子導入実験の結果、p21のプロモーターがIRF-1およびp53によって直接または間接的に活性化されることも見出した。この実験から、この二つの癌抑制転写因子の相互作用によってDNA損傷の応答または細胞周期の進行が制御されることがわかった。

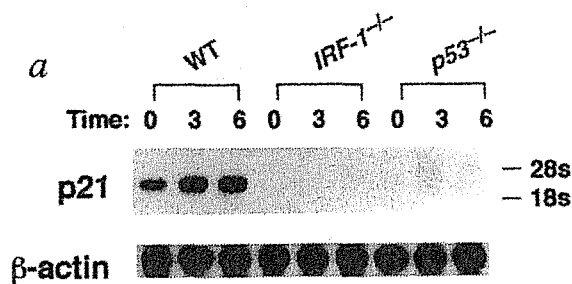


図9-a, b 野生型、p53欠損、IRF-1欠損マウスの初代胎仔線維芽細胞における放射線照射によるp21の誘導

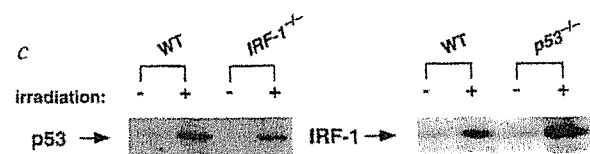
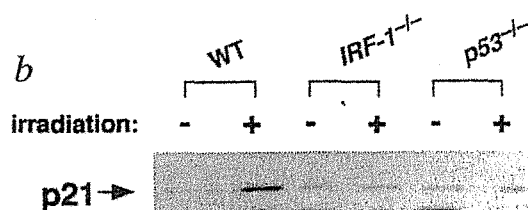


図9-c 放射線照射によるIRF-1及びp53蛋白質の上昇

今後の展望

DNA損傷あるいはc-Ha-rasの活性化によってp53が安定化され、p53の細胞内量が上昇するためp21などの標的遺伝子の発現は上昇する。その結果、細胞周期が停止したり、場合によっては細胞が早期に老化する。IRF-1もDNA損傷によって安定化され、下流にあるp21の発現を誘導する。この事実は、p53とIRF-1の安定化を引き起こす共通したシグナル伝達経路が存在することを示唆する。このシグナル伝達経路を追求したいと考えている。特に、c-Ha-rasのような発癌遺伝子の活性がなんらかの機構で細胞に認識され、それに応じて細胞は癌化を防ぐためp53及びIRF-1を活性化することが興味深い。発癌遺伝子の活性化の認識メカニズム、または発癌抑制の応答経路が明らかにすれば、基礎研究にも臨床研究にも役に立つと考えている。

発表論文・総説・口頭発表リスト

1. M. Lamphier, N. Tanaka, M. Ishihara, T. Tamura, and T. Taniguchi. Antioncogenic function of the transcription factor IRF-1. Presentation at the American Association for Cancer Research conference "Tumor Suppressor Genes". Victoria, Canada. Sept., 1997
2. M. Lamphier, T. Tamura, N. Tanaka and T. Taniguchi. IRF-1 induces cell cycle arrest and expression of p27/kip1 in a hematopoietic cell line. In preparation.
3. Z. Liu, Y. Miyazaki, M. Lamphier, and T. Taniguchi. Bcl-2 stabilizes Cyclin D3 mRNA and promotes hematopoietic cell proliferation. In preparation.
4. T. Taniguchi, M. Lamphier, and N. Tanaka. IRF-1; a transcription factor linking the interferon response and oncogenesis. BBA Cancer, in press.
5. N. Tanaka, M. Ishihara, M. Lamphier, H. Nozawa, T. Matsuyama, T. Mak, T. Tokino, M. Oren & T. Taniguchi. Cooperation of two anti-oncogenic factors, IRF-1 and p53, in radiation-induced cell cycle arrest and p21 gene transcription. Nature **382**, 816 - 819 (1996)
6. M. Lamphier, N. Tanaka, M. Ishihara, T. Tamura, H. Nozawa, and T. Taniguchi. Control of Cell Proliferation and Apoptosis by Interferon Regulatory Factor -1. Presentation at the American Society for Biochemistry and Molecular Biology conference "Integration of Growth Factor Signaling Pathways". Lake Tahoe, USA. November, 1996
7. T. Taniguchi, H. Harada & M. Lamphier. Regulation of the interferon system and cell growth by the IRF transcription factors. J. Cancer Clin Oncol. **121**, 516 - 520. (1995)
8. M. Lamphier, T. Tamura, N. Tanaka, M. Ishihara, T. Taniguchi. Control of Cell Proliferation and Apoptosis by Interferon Regulatory Factor-1 , Presentation at the European Society for Molecular Biology conference "Oncogenes and Growth Control". Heidelberg, Germany. April, 1996
9. T. Tamura, M. Ishihara, M. Lamphier , S. Aizawa, T. Mak, T. Taniguchi. An IRF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes. Nature , **376**, 596 - 599 (1995).
10. M. Lamphier, T. Tamura, N. Tanaka, M. Ishihara, T. Taniguchi. Regulation of cell growth and apoptosis by the anti-oncogenic transcription factor IRF-1. Presentation at the American Association for Cancer Research conference "Cancer; from basic to clinical applications". Baltimore, USA. November, 1995
11. M. Lamphier, T. Tamura, N. Tanaka, M. Ishihara, T. Taniguchi. Regulation of cell growth and

- apoptosis by the transcription factor IRF-1. Presentation at the Institute for Molecular Biology Conference "Tumor Suppressor Genes". Vienna, Austria. May, 1995
12. H. Harada, T. Kondo, S. Ogawa, M. Kitagawa, T. Tamura, N. Tanaka, H. Hirai, M. Lamphier & T. Taniguchi. Exon skipping of IRF-1 mRNA in human myelodysplasia/leukemia suggests a novel mechanism for tumor suppressor inactivation. *Oncogene* **9**, 3313 - 3320 (1994).
 13. M. S. Lamphier & T. Taniguchi. The transcription factors IRF-1 and IRF-2 link the interferon response and cell growth control. *The Immunologist*, **2**, 167 - 171 (1994).
 14. N. Tanaka, M. Ishihara, M. Kitagawa, H. Harada, T. Kimura, T. Matsuyama, M. Lamphier, S. Aizawa, T. Mak & T. Taniguchi. Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1. *Cell* **77**, 1-20. (1994).
 15. H. Yamamoto, M. Lamphier, T. Fujita, T. Taniguchi & H. Harada. The oncogenic transcription factor IRF-2 possess a transcriptional repression and latent activation domain. *Oncogene*, **9**, 1423 - 1428 (1994)