

がん抑制遺伝子 *RB1CC1* の機能解明とがん克服への挑戦

茶野 徳宏

1. 研究のねらい

RB1CC1 (RB1-inducible Coiled-Coil 1) は全く新しいがん抑制遺伝子で、網膜芽細胞腫遺伝子 (RB1) の発現を調節することによって細胞のがん化を抑えている。しかし、RB1CC1 の働きの機序など不明な点は多く、本研究では、将来的な新規治療、創薬を見据え、RB1CC1 と介在する、もしくは標的となる分子を明らかにする。そして、ここより得る知見をがん克服への新たな切り口として応用する。これらを目的に据えて、研究を行った。

2. 研究成果

RB1CC1 と介在する分子を明らかにする目的で、共免疫沈降→蛋白質量分析、yeast two hybrid、これら方法を用いてまず解析を進めた。この結果、RB1CC1 結合分子として TSC1、GADD34、hSNF5、Smad7 等を同定した。

1) RB1CC1 による TSC-mTOR 経路への貢献と細胞サイズ調整

RB1CC1 は TSC1 と結合することによって、TSC1 の ubiquitin 化を促進し、この分解を促していることを明らかにした。TSC1 の分解は TSC1/2 complex の mTOR への抑制作用を解除し、mTOR-S6K 経路を活性化する。このことは、蛋白質合成レベルの維持、そして細胞サイズの維持をもたらしている。RB1CC1 のこの作用は、本来 RB1CC1 発現レベルの高い神経、筋の細胞、組織において、生理学的にも特に重要であることが明らかとなった。RB1CC1 の高発現は同時に RB1 経路の増強を促し、細胞増殖を抑制するが、元々 RB1CC1 発現レベルの高い神経、筋では RB1 経路、mTOR 経路、両者が強く維持されている。このことは、神経細胞及び筋細胞が細胞増殖をきたさず、より大きな細胞サイズであり続けることに積極的に関わっており、これら神経、筋組織における細胞、組織の構築維持に重要であることが明らかとなった(投稿中)。ヒト疾患との関連においては Alzheimer 病を代表とする神経変性疾患の病態に関与することもわかってきている。

RB1CC1-TSC 経路の解析をきっかけに、RB1CC1 結合分子の一つである GADD34 の新しい機能も明らかになった。発現誘導によってがん抑制作用のある分子として以前よりクローニングされていた GADD34 は、通常細胞においては各種ストレス時にも発現誘導されてくるが、この時 RB1CC1 同様、GADD34 も mTOR 経路に作用する。ストレス時、誘導発現された GADD34 は mTOR 経路に対して negative な働きを示し、一時的な蛋白質合成の抑止を促す。ストレス時における蛋白質合成の過剰亢進は細胞に apoptosis をもたらず、細胞はストレス時に GADD34 を誘導発現し、mTOR 経路をストレス回避時まで抑制することによって蛋白質合成を抑止し、apoptosis を回避していることが明らかとなった(投稿中)。Rapamycin を代表とする mTOR 経路の抑制剤は結節性硬化症を代表として、がん、糖尿病など各種疾患の治療に適用されてようとしてきている。GADD34 はこの経路に negative に作用し、蛋白質合成、細胞死をコントロールする新しい分子として、新規創薬の分子モデルとなりうる可能性も示唆された。

2) RB1CC1-hSNF5 complex による RB1 経路の増強と細胞増殖抑制

RB1CC1 は核内クロマチンリモデリングファクターの一つである hSNF5/INI1 とも複合体を形成することが明らかとなったが、RB1CC1-hSNF5 complex は p53 とも更に複合体を形成し、これを安定化させることによって、p21 発現亢進をきたすことが解ってきた。つまり、p53→p21→RB1 の経路において、p53 による p21 の転写過程に RB1CC1-hSNF5 complex が貢献し、これを安定化、持続させる。このことにより、RB1 経路は増強され、細胞増殖は抑制される。更に、RB1CC1-hSNF5 の強発現は p21 発現亢進による細胞老化を通して、がん化抑制に貢献していることも明らかとなってきた(投稿準備中)。

3) その他

RB1CC1 は TGF- β 経路の negative regulator である Smad7 とも結合するが、この結合は Smad7 の分解を促し、TGF- β シグナルを増強することが分かった。増強された TGF- β シグナルは、抗腫瘍活性を示すが、Smad7 分解の様式と合わせ、この詳細については現在更に解析中であり、今後の解明の待たれるところである。

3. 今後の展開

研究当初より課題としていた RB1CC1 発現異常モデル(過剰発現、発現消失、等)動物についての研究は今後の課題として残っている。特に knockout mouse については未だ完成しておらず、今後も作成、解析を続ける計画である。現在は conditional knockout マウスの作成を試みているが、これまでの研究結果が示す如く RB1CC1 消失が小型細胞で高増殖性の疾患、がん等をきたすのか？神経や筋の萎縮性疾患をきたすのか？これを明らかにしたい。RB1CC1 過剰発現モデルについては、CAG-loxP-neo-loxP-FlagRB1CC1 導入による transgenic mouse を作成し、現在4系統のマウスラインを樹立できている。現在この解析を主に MEF を使って進めているが、今後、本マウスの解析については異所性の RB1CC1 過剰発現が生体に起こす変化を中心に解析してゆく。一つはマウス骨格筋に起こる RB1CC1 の過剰発現が栄養飢餓ストレス耐性であるか否かを解析する。また、一つは本来 RB1CC1 発現の乏しい造血器系で過剰発現が起こったときの病態を解析する。

RB1CC1 は種々の分子のユビキチン化、分解の過程を促進もしくは抑制する。この複雑な修飾作用はどこに起因するのかを明らかにしたい。C 末側での coiled-coil ドメインによる各分子との結合と N 末側での 26S proteasome への結合を証明し、RB1CC1 がプロテアゾームへの分子リクルート作用を介し機能する実証を試みたい。

また、RB1CC1 が細胞質-核間を如何に移行し、TSC-mTOR 経路(主に細胞質機能)、RB1 経路(主に核内機能)に寄与するのか、その移行システムを明らかにし、このことで各作用を自由に分離操作できる RB1CC1 分子モデル、変異モデルを構築したい。このことは将来、がん、神経、筋変性疾患など種々の病態の分子医療、創薬にも繋がると期待している。

4. 研究成果リスト

論文

1. Watanabe R, Chano T, Inoue H, Isono T, Koiwai O, Okabe H. Rb1cc1 is critical for myoblast differentiation through Rb1 regulation. *Virchows Arch.* 2005; 447(3): 643-8

2. Tsuchiya T, Osanai T, Ogose A, Tamura G, Chano T, Kaneko Y, Ishikawa A, Orui H, Wada T, Ikeda T, Namba M, Takigawa M, Kawashima H, Hotta T, Tsuchiya A, Ogino T, Motoyama T. Methylation status of EXT1 and EXT2 promoters and two mutations of EXT2 in chondrosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005; 158(2): 148–55.
3. Bamba N, Chano T, Taga T, Ohta S, Takeuchi Y, Okabe H. Expression and regulation of RB1CC1 in developing murine and human tissues. *Int J Mol Med.* 2004; 14(4): 583–7.
4. Mori K, Kizawa H, Ushiyama T, Chano T, Inoue H, Tsuchiya N, Okabe H, Matsusue Y, Ikegawa S. Association of CYP17 with HLA-B27-negative seronegative spondyloarthritis in Japanese males. *Am J Med Genet A.* 2004; 130(2): 169–71.
5. Mori K, Chano T, Matsumoto K, Ishizawa M, Matsusue Y, Okabe H. Type-selective muscular degeneration promotes infiltrative growth of intramuscular lipoma. *BMC Musculoskelet Disord.* 2004; 5:20. Review.
6. Mori K, Chano T, Yamamoto K, Matsusue Y, Okabe H. Expression of macrophage inflammatory protein-1alpha in Schwann cell tumors. *Neuropathology* 2004; 24(2): 131–5.
7. Chano T, Mori K, Scotlandi K, Benini S, Lapucci C, Manara MC, Serra M, Picci P, Okabe H, Baldini N. Differentially expressed genes in multidrug resistant variants of U-2 OS human osteosarcoma cells. *Oncol Rep.* 2004; 11(6): 1257–63.
8. Serra M, Reverter-Branchat G, Maurici D, Benini S, Shen JN, Chano T, Hattinger CM, Manara MC, Pasello M, Scotlandi K, Picci P. Analysis of dihydrofolate reductase and reduced folate carrier gene status in relation to methotrexate resistance in osteosarcoma cells. *Ann Oncol.* 2004; 15(1): 151–60.
9. Teramoto K, Chano T, Ozaki Y, et al. Expression of *RB1CC1*, a novel tumor suppressor gene, is inversely correlated with the Ki-67 proliferation index in primary breast cancers. *Cancer Therapy* 1: 103–107. 2003.
10. Kontani K, Chano T, Ozaki Y, Tezuka N, Sawai S, Fujino S, Saeki Y, Okabe H. RB1CC1 suppresses cell cycle progression through RB1 expression in human neoplastic cells. *Int J Mol Med.* 2003; 12(5): 767–9.
11. Ushiyama T, Chano T, Inoue K, Matsusue Y. Cytokine production in the infrapatellar fat pad: another source of cytokines in knee synovial fluids. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62(2): 108–12.
12. Mori K, Chano T, Ikeda T, Ikegawa S, Matsusue Y, Okabe H, Saeki Y. Decrease in serum nucleotide pyrophosphatase activity in ankylosing spondylitis. *Rheumatology.* 2003; 42(1): 62–5.

13. Ozaki Y, Kontani K, Hanaoka J, Chano T, Teramoto K, Tezuka N, Sawai S, Fujino S, Yoshiki T, Okabe H, Ohkubo I. Expression and immunogenicity of a tumor-associated antigen, 90K/Mac-2 binding protein, in lung carcinoma. *Cancer*. 2002; 95(9): 1954-62.

口頭発表

1. Tokuhiro Chano: RB1CC1 is involved in the TSC-mTOR pathway, and regulates the cell cycle and size. The Gordon Research Conference on Cancer Models and Mechanisms (Boston 2005)
2. 茶野徳宏、磯野高敬、井上寛一、岡部英俊: RB1CC1とhSNF5の介在がもたらすRB1経路への影響と抗腫瘍効果。日本癌学会(第64回;札幌 2005)
3. 茶野徳宏、佐治雅史、南佳ほり、井上寛一、岡部英俊: RB1CC1: RB1, mTOR両経路への貢献と細胞増殖、サイズの調整、そして、その生理的意義。日本分子生物学会(第28回;福岡 2005)

出願特許

- ・ 特願P2003-132095 「細胞・組織の機能評価方法」