

て、ニメスライドによる増殖抑制にアポトーシスの誘導が関与していることも明らかとした。尚、ニメスライドによる増殖抑制効果は、p53 遺伝子変異の有無に関わらず検出された。

ニメスライドと各種抗がん剤との併用効果を MTT 法を用いて検討したところ、抗がん剤の IC₅₀ 値を顕著に低減しえることが明らかとなった。例えば、ニメスライド 30 μ M の併用は、ACC-LC-91 株においてイリノテカンに対する IC₅₀ 値を 77% 低下させ、またアムルピシンに対する IC₅₀ 値を 60% 低下させた。更に、インボログラムによる検討によって、これらの効果は、相乗効果であることを明らかとした。

(2) ヒト肝がんにおける TGF- β シグナル伝達異常及びアポトーシス誘導能異常に関する検討:

7 株のヒト肝がん細胞株を用いて、TGF- β 刺激による転写活性化能について PAI-1 レポーター解析によって検討したところ、肺がんとは異なり反応性が保たれていた。一方、TGF- β 刺激によるアポトーシス誘導について検討したところ、7 株中 4 株が抵抗性を、3 株が感受性を示した。最もよくアポトーシスが誘導される細胞株 Hep3B を用いて、感受性亜株と抵抗性亜株を樹立し、解析を更に進めた。感受性亜株 #7 及び #8 では、TGF- β 処理 48 時間後には約 70% の細胞がアポトーシスを起こし細胞死に至るのに対し、アポトーシス誘導に抵抗性の亜株 #2 及び #11 では、約 10% しかアポトーシスが誘導されなかった。一方、TGF- β 刺激伝達解析で通常使用される PAI-1 レポーター及び、FAST-1 と Smad の結合配列を持つ FBE-SBE レポーターを用いて検討したところ、何れの亜株も正常な転写活性化を示し、TGF- β 刺激による転写活性化経路全般に亜株間で差異が有るのでは無いことが確認された。そこで、肝がん細胞において TGF- β により転写制御されアポトーシス誘導にかかわる遺伝子群の同定のため、TGF- β 刺激前後での mRNA を抽出し、アポトーシス関連遺伝子がスポットされた cDNA アレイ (クローンテック・アトラス・アポトーシスアレイ) を用いた発現プロファイルの比較解析を進めた。現在進行中の本実験結果は、アポトーシスを誘導する遺伝子群とアポトーシスを抑制する遺伝子群の発現調節に、TGF- β 刺激によるアポトーシス誘導の有無に関わる可能性を示唆している。

D. 考察

肺がんは依然として代表的な難治がんであり、この 10 年間にその治癒率に大きな改善は見られない。外科的治療を行えた一部の症例に治癒が望めるが、各種の抗がん剤及び放射線治療による内科的治療の成績は残念ながら未だ惨憺たる

ものであるといわざるを得ず、ブレークスルーが明らかに必要とされている。

我々は、ヒト肺がんにおいて COX-2 が過剰発現していることを始めて報告し、その浸潤・転移への関与の可能性や、外科切除後の予後との相関等を報告してきた。本研究においてはこれらの知見を元に、肺がんにおいて過剰発現している COX-2 を分子標的とした、COX-2 特異的阻害剤による新たな肺がん治療法の開発が可能であることを示唆する結果を得ることが出来た。p53 遺伝子変異の有無に関わらず COX-2 特異的阻害剤 (ニメスライド) によるアポトーシスの誘導が検出された点も、高頻度の p53 遺伝子異常を持つ肺がんの治療への応用上有利と考えられる。COX-2 特異的阻害剤は単独でもある程度の抗腫瘍効果を示したが、特に注目すべき点は副作用が軽微な COX-2 特異的阻害剤の併用によって、現在肺がん治療に用いられつつある各種抗がん剤の IC₅₀ 値を顕著に低減し得る点である。今後益々増加が予想される予備力の少ない高齢者肺がんに対しても、クオリティーオブライフを損なわずにより高い治療効果を得られる可能性も示唆される。現在更に、ヒト肺がん患者への応用を目指し、SCID マウス移植ヒト肺がん細胞株を用いて、in vivo における治療効果を確認しつつある。

さて、本年度の研究によって肝がん細胞株は多くの肺がん細胞株と異なり、TGF- β 刺激伝達系に全般的な刺激伝達障害がみられるのではなく、TGF- β によるアポトーシス誘導に対する感受性が選択的に低下していることが明らかとなった。現在 cDNA アレイの解析によって、感受性の異なる亜株間で異なる制御を受けている遺伝子群の同定を進めつつあるが、これまでのところアポトーシス誘導とアポトーシス抑制の夫々に関わると考えられる遺伝子群に制御の差異を見出している。したがって、今後の研究の発展によって、アポトーシス誘導或いは抑制に関わる分子を分子標的とした肝がんに対する新たな治療への応用が開ける可能性が期待される。

E. 結論

我々は、肺がんにおいて COX-2 が過剰発現していることを始めて報告し、その浸潤・転移への関与の可能性や、外科切除後の予後との相関等を報告してきた。それらの知見を元に、COX-2 を肺がん治療の新たな分子標的として用いる可能性について、COX-2 特異的阻害剤を用いて検討を加えた本研究結果は、今後の臨床応用への展開に極めて期待を抱かせるものであるといえる。特に、各種抗がん剤との併用によって、相乗効果が得られることが明らかとなった点は、特記に値

する。

一方、肺がんと並ぶ難治がんである肝がんでは、肺がんと同様に TGF- β 刺激に対する反応性の異常を示すが、肺がんとは様相が異なり、アポトーシス誘導に関わる刺激伝達系に選択的な伝達異常が起こっている可能性が示唆された。このアポトーシス誘導経路の異常に関わる分子の更なる解析は、アポトーシス誘導の回復による新たな肝がん治療法の開発につながる可能性がある。現在、肺がんで高頻度に見られる全般的な TGF- β 不応性機構の解明を目指した検討も平行して進めつつあり、二つの代表的な難治がんの類似点と相違点を浮き彫りにし、それぞれに適した革新的治療法へと結び付けていきたいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Nomoto, S., Haruki, N., Tatematsu, Y., Konishi, H., Mitsudomi, T., Takahashi, T., and Takahashi, T. Frequent allelic imbalance suggests the involvement of a tumor suppressor gene at 1p36 in the pathogenesis of human lung cancers. **Genes, Chrom., Cancer** 28: 342-346, 2000.
- 2 Haruki, N., Yatabe, Y., Travis, W. D., Nomoto, S., Osada, H., Nakamura, S., Nakao, A., Fujii, Y., and Takahashi, T. Characterization of high-grade neuroendocrine tumors of the lung in relation to *menin* mutations. **Jpn. J. Cancer Res.** 91: 317-323, 2000.
- 3 Kozaki, K., Miyaishi, O., Tsukamoto, T., Tatematsu, Y., Hida, T., Takahashi, T., and Takahashi, T. *In vivo* selected human lung cancer cell line H460-LNM35 consistently exhibits lymphogenous metastasis via both subcutaneous and orthotopic propagation. **Cancer Res.** 69: 2535-2540, 2000.
- 4 Yanagisawa, K., Uchida, K., Nagatake, M., Masuda, A., Sugiyama, M., Saito, T., Yamaki, K., Takahashi, T., and Osada, H. Heterogeneities in the biological and biochemical functions of Smad2 and Smad4 mutants naturally occurring in human lung cancers. **Oncogene** 19: 2305-2311, 2000.
- 5 Yatabe, Y., Konishi, H., Mitsudomi, T., Nakamura, S., and Takahashi, T. Topographical distributions of allelic loss in individual non-small cell lung cancers. **Am. J. Pathol.** 157: 985-993, 2000.
- 6 Hida, T., Kozaki, K., Muramatsu, H., Masuda, A., Shimizu, S., Mitsudomi, T., Sugiura, T., Ogawa, M., and Takahashi, T. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. **Clin. Cancer Res.** 6: 2006-2011, 2000.
- 7 Haruki, N., Saito, H., Tatematsu, Y., Konishi, H., Harano, T., Masuda, A., Fujii, Y., and Takahashi, T. Histological type-selective, tumor-predominant expression of a novel *CHK1* isoform and infrequent *in vivo* somatic *CHK2* mutation in small cell lung cancer. **Cancer Res.** 60: 4689-92, 2000.
- 8 Shimizu, S., Yatabe, Y., Koshikawa, T., Haruki, N., Hatooka, S., Shinode, M., Suyama, M., Ogawa, M., Hamajima, N., Ueda, R., Takahashi, T., and Mitsudomi, T. High frequency of clonally related tumors in cases of multiple synchronous lung cancers as revealed by molecular diagnosis. **Clin. Cancer Res.** 6: 3994-3999, 2000.
- 9 Mitsudomi, T., Hamajima, N., Ogawa, M., and Takahashi, T. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. **Clin. Cancer Res.** 6: 4055-4063, 2000.
- 10 Hamajima, N., Saito, T., Matsuo, K., Kozaki, K., Takahashi, T., and Tajima, K. Polymerase chain reaction with confronting two-pair primers for polymorphism genotyping. **Jpn. J. Cancer Res.** 91: 865-868, 2000.
- 11 Masuda, A., Osada, H., Yatabe, Y., Kozaki, K., Tatematsu, Y., Takahashi, T., Hida, T., Takahashi, T., and Takahashi, T. Protective function of p27^{KIP1} against apoptosis in small cell lung cancer cells in unfavorable microenvironments. **Am. J. Pathol.** 158: 87-96, 2001.
- 12 Haruki, N., Saito, H., Harano, T., Nomoto, S., Takahashi, T., Osada, H., Fujii, Y., and Takahashi, T. Molecular analysis of the mitotic checkpoint genes *BUB1*, *BUBR1* and *BUB3* in human lung cancers. **Cancer Lett.** (in press).
- 13 Yoshida, K., Hamajima, N., Kozaki, K., Saito, H., Maeno, K., Sugiura, T., Ookuma, K., and Takahashi, T. Association between the dopamine D2 receptor A2/A2 genotype and smoking behavior in the Japanese. **Cancer Epidemiol., Biomark., & Prev.** (in press).
- 14 Dammann, R., Takahashi, T., and Pfeifer, G. P. The CpG island of the novel tumor suppressor gene *RASSF1A* is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas. **Oncogene** (in press).

F. 知的所有権の取得状況
なし

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

がん細胞の増殖・浸潤にかかわる細胞骨格の研究

分担研究者 稲垣 昌樹 愛知県がんセンター研究所 発がん制御研究部部長

研究要旨：本分担研究は、主要な細胞骨格蛋白質のひとつである中間径フィラメント蛋白質が、がんの浸潤・転移において果たす役割を解明することを目的とする。本年度は、単層上皮に特異的に発現しているケラチン18と結合する蛋白質としてMrj及びTNF receptor type1-associated death domain protein (TRADD)を見出した。MrjはDnaJ/Hsp40ファミリーに属するco-chaperoneとしてケラチン8/18フィラメント構築を制御していることを明らかにし、Mrjが細胞運動時のケラチン8/18フィラメント構築のダイナミックなモデリングに関与している可能性を認めた。また、上皮細胞において、TRADDがケラチン細胞骨格と結合しているためにTNFによるアポトーシス誘導が減弱していることを認め、TRADDを介するケラチン8/18細胞骨格とTNFシグナリングとのクロストークがある可能性を見出した。

A. 研究目的

細胞接着装置及び細胞骨格は、細胞の極性、形態、運動などを制御する中心的機構であり、これらよりのシグナルが細胞増殖、分化、アポトーシスなどに深く関与していることが示されてきている。がん細胞の浸潤・転移には、原発巣よりの離脱、血管内への遊走、転移部位への接着等の様々な局面において、細胞接着装置及び細胞骨格が、それに適した再構成を行うことが必須である。中間径フィラメントは、アクチンフィラメントや微小管などの他の細胞骨格に比べて安定な線維構造を形成すると考えられていたが、私共のグループを中心とした研究により、リン酸化によって中間径フィラメントの細胞内構築がダイナミックに制御されていることが明らかになってきた。以前より、がんにおいてその悪性化・転移能

獲得に伴い中間径フィラメントの発現パターンに変化が認められることが知られ、がん浸潤・転移と中間径フィラメントとの関連性を示唆する数多くの報告がなされているが、その分子機序は全く不明である。本分担研究で私共は、肝細胞や腸上皮などの単層上皮細胞で特異的に発現している中間径フィラメントであるケラチン8/18と結合する蛋白質の同定を行い、それらの分子の解析を通して、がん浸潤・転移において中間径フィラメントが果たす役割の解明を試みる。

B. 研究方法

単層上皮に特異的に発現しているケラチン8/18と結合する蛋白質を酵母two-hybrid法を用いて同定・クローニングする。bait側プラスミド(pYTH)にケラチン

8 または 18 の全長 cDNA を組み込み、GAL4 DNA 結合領域との融合蛋白質を発現させるベクターを作製、これを 酵母 Y190 strain に導入してトリプトファンで選択する。得られたクローンに prey 側ヒト肝臓 cDNA ライブラリーを導入し、ロイシン、ヒスチジンでコロニーを選択する。さらに得られたコロニーに対して、ベータガラクトシダーゼアッセイを行い結合を確認する。陽性クローンのプラスミドを大腸菌に移して調製し、cDNA インサートの DNA 塩基配列を決定する。ホモロジー解析等を行い、既知蛋白質との関連を検索し、あるいは新規蛋白質としてケラチン 8 あるいは 18 との結合を検討していく。

C. 研究結果

ケラチン 8/18 と結合する蛋白質をヒト肝臓 cDNA ライブラリーを用いて酵母 two-hybrid 法で探索した。ケラチン 18 結合クローンのうち 2 クローンは、DnaJ/Heat shock protein 40 (Hsp40) family に属する Mrj 蛋白質の C 末端側をコードし、1 クローンは、TNF receptor 1-associated death domain protein (TRADD) の C 末端側をコードしていた。

Mrj によるケラチン 8/18 フィラメント構築制御機構の解析：Mrj は 242 アミノ酸からなる蛋白質（分子量約 28kDa）で、その N 末端側に J domain と呼ばれるドメインを持つが、DnaJ/Heat shock protein 40 (Hsp40) family 蛋白質は、この J domain を介して Heat shock protein 70 (Hsp70) と結合する。Mrj は、調べた中間径フィラメントの中で、ケラチン 18 のみに特異的に結合した。Mrj は、J domain を含む N 末端側で Hsp70 と結合し、その C 末端側でケラチン 18 と結合した。内在性の Mrj を検討していくために、

抗 Mrj 抗体を作製した。この抗体を用いて免疫沈降を行い、Mrj とケラチン 18 が、細胞内で結合していることを確認した。また、免疫蛍光染色にて、Mrj がケラチン 8/18 フィラメント上に局在していることを認めた。HeLa 細胞に抗 Mrj 抗体をマイクロインジェクションすると、ケラチン 8/18 フィラメントの崩壊が認められた。これらの結果より、Mrj は、co-chaperone として、ケラチン 8/18 フィラメント構築の制御に関与していることが示唆された。Wound healing assay において、Mrj は細胞の leading edge に濃縮している所見が得られ、細胞が運動する際のケラチン 8/18 フィラメントのダイナミックなモデリングに Mrj が関わっている可能性を認めた。

TRADD を介するケラチン 8/18 細胞骨格と TNF シグナリングとのクロストーク：TNF receptor 1-associated death domain protein (TRADD) は、TNF が TNF receptor 1 に結合すると、TNF receptor 1 の細胞内ドメインにリクルートされ、さらに TRADD に他の分子が結合し、TNF のシグナルを伝えていく分子である。TRADD は、その C 末端側に death domain と呼ばれるドメインをもつが、その death domain の C 末端側でケラチン 18 およびケラチン 14 (Type 1 ケラチン) に特異的に結合する。内在性の TRADD を検討するために、抗 TRADD 抗体を作製した。この抗体を用いて免疫沈降を行い、細胞内でケラチン 18 と TRADD が結合していることを確認した。また、免疫蛍光染色にて、上皮細胞において、TRADD がケラチン 8/18 フィラメント上に局在していることを認めた。ケラチン 18 と TRADD の結合の生理学的意義を検討するために、ケラチンやビメンチンなどの中間径フィラメントを発現していない SW13 細胞にケラチン 8/18 やケラ

チン 18 の N 末端 (TRADD 結合部位) を強制発現させ、TNF によるアポトーシス誘導への影響を観察すると、コントロールベクターに比してケラチン 8/18 やケラチン 18 の N 末端 (TRADD 結合部位) をトランスフェクションしたものでは、TNF によるアポトーシス誘導が有意に減弱していた。これらのことより、上皮細胞では、ケラチンは、TRADD との結合を介して、TNF-TNF receptor 1 によるアポトーシス誘導を減弱させていることが示唆された。

D. 考察

Mrj によるケラチン 8/18 フィラメント構築制御機構の解析：中間径フィラメントの構築は、これまで私共が解析を押し進めてきたリン酸化・脱リン酸化によって general に制御されているが、新しく見出された Mrj-Hsp70 による制御は、ケラチン 8/18 に特異的な制御システムである。ケラチン 8/18 が特異的に発現している肝細胞や腸上皮由来のがん細胞の浸潤・転移を解析していく際には、この Mrj-Hsp70 によるケラチン 8/18 特異的制御機構について詳細に検討していく必要があると考えられる。私共は、細胞が運動する際に、ケラチン 8/18 フィラメントがダイナミックに再構築され、それに Mrj が関与している可能性を認めているが、この分子機構をさらに解析していくことにより、肝細胞がんなどの浸潤・転移の新しいメカニズムを明らかできる可能性があると考えられた。肝細胞がんやアルコール性肝障害などの肝臓疾患では、病理組織学的にマロリー体と呼ばれるケラチン 8/18 を含む細胞内凝集物を認めることが知られている。最近、細胞内の不溶物形成とシャペロンとの関係が注目されていることから、Mrj-Hsp/c70 シャペロンとケラチン

8/18 の不溶化との関係は非常に興味深いものと考えられる。また、以前から熱ショックにより中間径フィラメントの collapse が引き起こされることが知られているが、細胞が種々のストレスを受けた際のケラチン 8/18 フィラメント構築変化に Mrj-Hsp70 シャペロンがどのような役割を演じているかについても今後検討していく必要がある。TRADD を介するケラチン 8/18 細胞骨格と TNF シグナリングとのクロストーク：ケラチン 18 結合蛋白質として同定した TRADD は、TNF receptor 1 (TNFR1) に TNF が結合すると TNFR1 の細胞内ドメインと結合し、さらに、FADD、TRAF2、RIP をリクルートすることによってシグナルを伝達する分子である。本研究で私共は、ケラチン 8/18 を発現している単層上皮系の細胞では、ケラチン 18 と TRADD が結合しているために TRADD が TNFR1 にリクルートされるのを阻害し、TNF によるアポトーシスが減弱していることを見出した。Type1 ケラチン特異的に結合する TRADD を介して、ケラチンフィラメントが TNF-TNF receptor 1 の細胞内シグナル経路に影響を与える可能性があることは、上皮系のがん細胞における細胞骨格と細胞内シグナル伝達経路の関係を解析していく新しい糸口となりうると考えられる。また私共は、ケラチン 8/18 フィラメントが足場となり、これに結合した TRADD が、FADD や TRAF2 をリクルートすることにより、シグナルをケラチン 8/18 フィラメント上から直接発信しているのではないかという仮説も現在検討しており、細胞形態・細胞接着状態の情報がケラチンフィラメントをセンサーとして TRADD の下流へ伝達される可能性について解析を進めていく予定である。

E. 結論

単層上皮で特異的に発現している中間径フィラメント蛋白質ケラチン 18 と結合する蛋白質として Mrj および TRADD を見出した。Mrj は、DnaJ/Hsp40 ファミリーに属する co-chaperone としてケラチン 8/18 フィラメント構築の制御に関与していることを明らかにし、Mrj が細胞運動時のケラチン 8/18 フィラメント構築のダイナミックなモデリングに関与している可能性を認めた。今後、肝細胞や腸上皮由来のがん細胞の浸潤・転移を詳細に検討していく際には、Mrj-Hsp70 によるケラチン 8/18 特異的制御機構についても解析していく必要があると考えられた。また、上皮細胞において、TRADD がケラチン細胞骨格と結合しているために TNF によるアポトーシス誘導が減弱していることを認め、TRADD を介するケラチン 8/18 細胞骨格と TNF シグナリングとのクロストークがある可能性を見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inagaki, N., Nishizawa, M., Minakata, Y., Yamamoto, H., Takeuchi, Y., Miyamoto, E., Kaibuchi, K. and Inagaki, M.: Activation of Ca²⁺/ calmodulin-dependent protein kinase II within post-synaptic dendritic spines of cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 275:27165-27171, 2000.
- 2) Hirota, T., Morisaki, T., Nishiyama, Y., Marumoto, T., Tada, K., Hara, T., Masuko, N., Inagaki, M., Hatakeyama, K. and Saya, H.: Zyxin, a regulator of actin filament assembly, plays a role in cell division by interacting with LATS1/h-warts tumor suppressor on mitotic apparatus. *J. Cell Biol.* 149:1073-1086, 2000.
- 3) Goto, H., Kosako, H. and Inagaki, M.: Regulation of Intermediate Filament Organization during Cytokinesis: Possible Roles of Rho-associated Kinase *Microsc. Res. Tech.*, 49:173-182, 2000.
- 4) Izawa, I., Nishizawa, M., Ohtakara, K., Ohtsuka, K., Inada, H. and Inagaki, M.: Identification of Mrj, a DnaJ/Heat shock protein 40 family protein, as a keratin 8/18 filament-regulatory protein. *J. Biol. Chem.*, 275: 34521-34527, 2000.
- 5) Togashi, H., Nagata, K., Takagishi, M., Saitoh, N. and Inagaki, M.: Functions of a Rho-specific guanine nucleotide-exchange factor, in neurite retraction: Possible involvement of proline-rich motif of KIAA0380 in the localization. *J. Biol. Chem.*, 275: 29570-29578, 2000.
- 6) Ohtakara, K., Inada, H., Goto, H., Taki, W., Manser, E., Lim, L., Izawa, I. and Inagaki, M.: p21-activated kinase PAK phosphorylates desmin at the different sites from those for Rho-associated kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 272: 712-716, 2000.
- 7) Nakamura, Y., Hashimoto, R., Amano, M., Nagata, K., Matsumoto, N., Goto, H., Fukusho, E., Mori, H., Kashiwagi, Y., Kudo, T., Inagaki, M. and Takeda, M.:

- Localized phosphorylation of vimentin by Rho-kinase in neuroblastoma N2a cells. *Genes Cells*, 5: 823-837, 2000.
- 8) Kosako, H., Yoshida, T., Matsumura, F., Ishizaki, T., Narumiya, S. and Inagaki, M.: Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow. *Oncogene*, 19: 6059-6064, 2000.
- 9) Tsuiki, H., Nitta, M., Tada, M., Inagaki, M., Ushio, Y. and Saya, H.: Mechanism of hyperploid cell formation induced by microtubule inhibiting drug in glioma cell lines. *Oncogene*, in press.
- 10) Yasui, Y., Goto, H., Matsui, S., Manser, E., Lim, L., Nagata, K. and Inagaki, M.: Protein kinases required for segregation of vimentin filaments in mitotic process. *Oncogene*, in press.
- 11) Zhong, S., Zhange, Y., Jansen, C., Goto, H., Inagaki, M. and Dong, Z.: MAP kinases mediate UVB-induced phosphorylation of histone H3 at Serine 28. *J. Biol.Chem.*, in press.
- 12) Gohara, R., Tang, D., Inada, H., Inagaki, M., Takasaki, Y. and Ando, S.: Phosphorylation of vimentin head domain inhibits interaction with the carboxyl-terminal end of alpha-helical rod domain studied by surface plasmon resonance measurements. *FEBS Lett.* 489:182-186, 2001.