

性は失われることが明らかとなり、MALT リンパ腫発症における API2-MALT1 の役割の一端が明らかになった。

2) MLL ならびに BCL6 遺伝子の標的遺伝子の探索について：

RDA 法や cDNA microarray 法で見出した標的遺伝子が、真の標的遺伝子であるか否かについて、検討を進める必要がある。そのためには、発現の time course や標的遺伝子 promoter 領域をクローニングし、一過性発現系などを用いて、詳細に検討を進める必要がある。

E. 結論

1) 粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫に関与する遺伝子異常 API2-MALT1 について詳細に解析を進め、RT-PCR 法を確立し、MALT リンパ腫の約 20~30%に遺伝子異常が認められること、また、発生臓器により、遺伝子異常の関与が異なることを示した。さらに、genomic DNA を用いた Long and accurate(LA)-PCR 法も確立した。

2) 粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫に認められる t(11;18)転座に関与する API2-MALT1 キメラは複数存在する転座切断点のため、複数の遺伝子産物を形成する。それらを一度の実験で検出することができる multiplex RT-PCR 法を確立することができた。その検出感度は 100 コピーであった。

3) 1 コピーを検出することができるリアルタイム PCR 法を確立し、患者腫瘍検体中にある API2-MALT1 キメラ遺伝子産物を検討したところ 40 コピーから 10,000 コピーと幅広いコピー数を示すことが明らかとなった。ヘテロな細胞集団からなると考えられている MALT リンパ腫が、分子レベルにおいてもその腫瘍細胞と反応性の細胞が混在した病型を形作っていることが示唆された。

4) MALT1 は BCL10 と結合し、NF- κ B を活性化することを明らかにした。また、API2-MALT1

キメラ蛋白は単独で NF- κ B を活性化することが明らかとなり、MALT リンパ腫発症における API2-MALT1 の役割の一端が明らかになった。

5) MLL の標的遺伝子として PI-3kinase の subtype と EST を見出した。また、BCL6 の標的として CXCR4 を見出した。これらの標的遺伝子が直接的作用によるのかについて、標的遺伝子のプロモーター領域をクローニングして解析を進める必要がある。

F. 健康危機情報

本研究は愛知県がんセンターDNA 組換え実験委員会および倫理委員会の許可の元になされた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Motegi, M., Yonezumi, M., Suzuki, H., Suzuki, R., Hosokawa, Y., Hosaka, S., Kodera, Y., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: API2-MALT1 chimeric transcripts involved in mucosa-associated lymphoid tissue type lymphoma predict heterogenous products. *Am. J. Pathol.*, 156: 807-812, 2000.
2. Nakamura, T., Nakamura, S., Yonezumi, M., Suzuki, T., Matsuura, A., Yatabe, Y., Yokoi, T., Ohashi, K., Seto, M.: Helicobacter pylori and the t(11;18)(q21;q21) translocation in gastric low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Jpn J Cancer Res.*, 91: 301-309, 2000.
3. Yatabe, Y., Suzuki, R., Tobinai, K., Matsuno, Y., Ichinohasama, R., Okamoto, M., Yamaguchi, M., Tamaru, J., Uike, N., Hashimoto, Y., Morishima, Y., Suchi, T., Seto, M., Nakamura, S.: Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood*, 95: 2253-2261, 2000.

4. Hosokawa, Y., Maeda, Y., Ishinohasama, R., Miura, I., Taniwaki, M., Seto, M.: The Ikaros gene, a central regulator of lymphoid differentiation, fuses to the BCL6 gene as a result of t(3;7)(q27;p12) translocation in a patient with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 95: 2719-2721, 2000.
5. Takahashi, H., Maeda, Y., Seto, M., Hosokawa, Y.: Nucleotide insertions and deletions within the homopolymeric runs of adenines and thymidines of BCL10 cDNAs in normal peripheral blood leukocytes. *Blood*, 95: 2728-2729, 2000.
6. Suzuki, R., Kagami, Y., Takeuchi, K., Kami, M., Okamoto, M., Ichinohasama, R., Mori, N., Kojima, M., Yoshino, T., Yamabe, H., Shiota, M., Mori, S., Ogura, M., Hamajima, N., Seto, M., Suchi, T., Morishima, Y., Nakamura, S.: Prognostic significance of CD56 expression for ALK-positive and ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma of T/null cell phenotype. *Blood*, 96: 2993-3000, 2000.
7. Nakamura, T., Nakamura, S., Yonezumi, M., Seto, M., Yokoi, T.: The t(11; 18)(q21; q21) translocation in H. pylori-negative low-grade gastric MALT lymphoma. *Am. J. Gastroenterol.*, 95: 3314-3315, 2000.
8. Chung, DC., Brown, SB., Graeme-Cook, F., Seto, M., Warsaw, AL., Jensen, RT., Arnold, A.: Overexpression of cyclin D1 occurs frequently in human pancreatic endocrine tumors. *J. Clin Endocrinol Metab.*, 85: 4373-4378, 2000.
9. Motegi, M., Yonezumi, M., Suzuki, H., Suzuki, R., Hosokawa, Y., Hosaka, S., Koderu, Y., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: API2-MALT1 chimeric transcripts involved in mucosa-associated lymphoid tissue type lymphoma predict heterogeneous products. *Am J. Pathol*, 156: 807-812 2000.
10. Yatabe, Y., Suzuki, R., Tobinai, K., Matsuno, Y., Ichinohasama, R., Okamoto, M., Yamaguchi, M., Tamaru, J., Uike, N., Hashimoto, Y., Morishima, Y., Suchi, T., Seto, M., Nakamura, S.: Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood*, 95: 2253-2261 2000.
11. Hosokawa, Y., Maeda, Y., Seto, M.: Low frequency of expression of dominant-negative Ikaros isoforms in human leukemia and lymphoma cell lines. *Leuk Res.*, 24: 263-264, 2000.
12. Toyoda, H., Nakamura, T., Shinoda, M., Suzuki, T., Hatooka, S., Kobayashi, S., Ohashi, K., Seto, M., Shiku, H., Nakamura, S.: Cyclin D1 expression is useful as a prognostic indicator for advanced esophageal carcinomas, but not for superficial tumors. *Dig. Dis. Sci.*, 45: 864-869, 2000.
13. Kagami, Y., Jung, J., Choi, YS., Osumi, K., Nakamura, S., Morishima, Y., Seto, M.: Establishment of a follicular lymphoma cell line (FLK-1) dependent on follicular dendritic cell-like cell line HK. *Leukemia*, 15: 148-56, 2001.
14. Inagaki, H., Okabe, M., Seto, M., Nakamura, S., Ueda, R., Eimoto, T.: API2-MALT1 fusion transcripts involved in mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: multiplex RT-PCR detection using formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *Am. J. Pathol.*, 158:699-706. 2001.
15. Sugiyama, T., Saka, K., Nakamura, S., Yonezumi, S., Seto, M.: API2-MALT1 chimeric transcript is a predictive marker for the responsiveness of H. pylori eradication treatment in low-grade gastric MALT lymphoma. *Gastroenterology*, 120: 1884-1889, 2001.
16. Lucas, PC., Yonezumi, M., Inohara, N., McAllister-Lucas, LM., Abazeed, ME., Chen, FF., Yamaoka, S., Seto, M., Nunez, G.: Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal

- translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF-kappa B signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, 276: 19012-19019, 2001.
17. Suzuki, R., Takemura, K., Tsutsumi, M., Nakamura, S., Hamajima, N., Seto, M.: Detection of cyclin D1 overexpression by real-time reverse-transcriptase-mediated quantitative polymerase chain reaction for the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Am. J. Pathol.*, 159: 425-429, 2001.
 18. Eguchi, M., Eguchi, M., Seto, M., Morishita, K., Suzuki, K., Ueda, R., Ueda, K., Kamada, N., Greaves, M.: GPHN, a novel partner gene fused to MLL in a leukemia with t(11;14)(q23;q24) Genes, *Chromosomes Cancer*, 32: 212-221, 2001.
 19. Suzuki, R., Seto, M., Nakamura, S., Nakagawa, A., Hara, K., Takeuchi, K.: Sarcomatoid variant of anaplastic large cell lymphoma with cytoplasmic ALK and alpha-smooth muscle actin expression: a mimic of inflammatory myofibroblastic tumor. *Am. J. Pathol.*, 159: 383-384, 2001.
 20. Tamura, A., Miura, I., Iida, S., Yokota, S., Horiike, S., Nishida, K., Fuji, H., Nakamura, S., Seto, M., Ueda, R., Taniwaki, M.: Interphase detection of immunoglobulin heavy chain gene translocations with specific oncogene loci in 173 patients with B-cell lymphoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 129: 1-9, 2001.
 21. Yatabe, Y., Suzuki, R., Matsuno, Y., Tobinai, K., Ichinohazama, R., Tamaru, J., Mizoguchi, Y., Hashimoto, Y., Yamaguchi, M., Kojima, M., Uike, N., Okamoto, M., Isoda, K., Ichimura, K., Morishima, Y., Seto, M., Suchil, T. Nakamura, S.: Original Article. Morphological spectrum of cyclin D1 -positive mantle cell lymphoma: Study of 168 cases. *Pathol. Int.*, 51: 747-761, 2001.
 22. Yonezumi, M., Suzuki, R., Suzuki, H., Yoshino, T., Oshima, K., Hosokawa, Y., Asaka, M., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Detection of AP12-MALT1 chimaeric gene in extranodal and nodal marginal zone B-cell lymphoma by reverse transcription polymerase chain reaction (PCR) and genomic long and accurate PCR analyses. *Br. J. Haematol.*, 115: 588-594, 2001.

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

固形腫瘍の発生と増悪に関わる分子病態の解析

分担研究者 高橋 隆 愛知県がんセンター研究所・分子腫瘍学部長

研究要旨 本研究では、(1) ヒト肺がんにおいて高頻度の過剰発現を明らかとした cyclooxygenase-2 (COX-2) に対する特異的阻害剤が、単独投与或いは抗がん剤との併用投与によって SCID マウス移植ヒト肺癌細胞株の増殖を有意に抑制することを明らかとした。また、*in vivo* における COX-2 特異的阻害剤による増殖阻害には、腫瘍細胞への直接的増殖抑制に加えて腫瘍血管の抑制も関与している可能性が示唆された。

(2) 肝がん細胞株における TGF- β 刺激によるアポトーシス誘導機構の検討を進めた。TGF- β によるアポトーシス誘導は、TGF- β 刺激により TNF ファミリー遺伝子群の転写誘導がおこり、TNF ファミリー受容体による Caspase-8 の切断活性化によって引き起こされていることが示唆された。今後、この知見に基づき、TGF- β 刺激によるアポトーシス誘導に不応性を示す肝がんの、不応性機構を検討し肝がん治療に応用を目指したい。

A. 研究目的

難治性固形がんの代表たる肺がんの分子病態を明らかにすべく、種々のがん遺伝子、がん抑制遺伝子の異常の関与について検討を加えてきた。本年度の研究の目的は、(1) COX-2 を分子標的とした特異的阻害剤による肺がん治療の可能性について検討を加えることと、(2) 肺癌と並ぶ代表的難治がんである肝がんにおける TGF- β 刺激伝達異常及びアポトーシス誘導能異常を検討し、肝がんの発症への関わり及び肝がん治療への応用の可能性を検討することにある。

B. 研究方法

(1) ヒト肺がん治療における分子標的としての COX-2 に関する検討：

COX-2 特異的阻害剤 (tiracoxib) の単独或いは抗がん剤との併用投与による肺癌増殖阻害について、COX-2 を発現しているヒト肺癌細胞株 ACC-LC-319 をマウスの背部に 1×10^7 個皮下移植し検討した。移植とともに tiracoxib を混餌飼料として投与 (100mg/kg/day) 開始し、2週間後に 5mg/kg の docetaxel、amrubicin 或いは vinorelbine を一回尾静脈より静注した。さらに2週間 tiracoxib の投与を続けた後、マウスを屠殺し腫瘍重量を計測した。また、腫瘍血管抑制効果に関しては、血管内皮を抗 CD31 抗体による免

疫染色で検出することによって検討した。

(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：アポトーシス誘導機構を詳細に検討するため、TGF- β によるアポトーシス誘導に感受性を示す肝がん細胞株 Hep3B の感受性亜株を TGF- β (2.5 ng/ml) で刺激し、2, 5, 12, 24, 48, 72 時間と経時的に以下のように解析した。1) FACS にて DNA 量を解析し細胞周期の変化とアポトーシスの割合を検討した。2) RNA を採取し、リアルタイム RT-PCR にて遺伝子発現の変化を検討した。3) 又同時に細胞ライセートも調整し、細胞内のアポトーシス誘導に関わる主たる経路を同定するため、カスパー活性化について検討した。

C. 結果と考察

(1) ヒト肺がん治療における分子標的としての COX-2 に関する検討：

COX-2 特異的阻害剤による *in vivo* におけるヒト肺癌増殖阻害について、COX-2 を発現しているヒト肺癌細胞株 ACC-LC-319 株を SCID マウスに移植し検討した結果、100mg/kg/day の COX-2 特異的阻害剤 (JTE-522) の単独投与によって、消化管出血や有意な体重減少等の副作用を伴わずに、腫瘍重量は非投与群に対し 36% の減少をみた ($P < 0.005$)。さらに、docetaxel に tiracoxib を併用することによって、抗がん剤単独治療時に比して 65% ($P < 0.0001$) の有意な腫瘍重量の減少が観察され、また vinorelbine に JTE-522 を併用することによって 55% ($P < 0.05$) の減少が得られた。一方、amrubicin との併用においては、有意な効果増強は得られなかった。

(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：

TGF- β 処理後のアポトーシス誘導を詳細に経時的に検討したところ、1) 細胞周期は TGF- β 処理後 12~48 時間には G1/G2 停止を示すが、72 時間

後には著明なアポトーシスが誘導された。2) 昨年度の cDNA array 解析で予測された TNF ファミリー遺伝子群の転写誘導は TGF- β 処理後 12 時間でおこり、その後持続した。3) TNF ファミリー受容体により直接的に活性化されると考えられる Caspase-8 の切断は、24 時間から軽度に見られるが、48 時間で著明に増加し、72 時間後に検出されたアポトーシスを引き起こしていると考えられた。一方ミトコンドリアの障害・チロクローム C の遊離により誘導されると考えられている Caspase-9 の切断活性化はみられなかった。TGF- β によるアポトーシス誘導は、TGF- β 刺激により TNF ファミリー遺伝子群の転写誘導がおこり、TNF ファミリー受容体による Caspase-8 の切断活性化によって引き起こされていることが示唆された。しかし、TNF ファミリー誘導からアポトーシス誘導まで比較的経過が長く、アポトーシス阻害機構の関与も考える必要があると思われた。

D. 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期待を抱かせるものといえる。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、肺がんで高頻度に見られる全般的な TGF- β 不応性に、TGF- β II型リセプターのクロマチン構造異常による不活性化が大きく寄与していることを示唆するデータを既に得ているが、肺がんと並ぶ難治がんである肝がんでは、さらに下流の刺激伝達系にアポトーシス誘導に関連した選択的な伝達異常が起こっている可能性を示唆する結果が、本研究を通じて得られた。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ので、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。

E. 健康危険情報
なし

F. 研究発表

- 1 Kozaki K, Koshikawa K, Tatematsu Y, Miyaishi O, Saito H, Hida T, Osada H, and Takahashi T. Multi-faceted analyses of a highly metastatic human lung cancer cell line NCI-H460-LNM35 suggest mimicry of inflammatory cells in metastasis. *Oncogene* 20: 4228-4234, 2001.
- 2 Haruki N, Harano T, Masuda A, Kiyono T, Tatematsu Y, Shimizu S, Mitsudomi T, Konishi H, Osada H, Fujii Y, and Takahashi T. Persistent increase in chromosome instability in lung cancer: possible indirect involvement of p53 inactivation. *Am. J. Pathol.* 159: 1345-1352, 2001.
- 3 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.
- 4 Osada H, Tatematsu Y, Masuda A, Saito T, Sugiyama M, Yanagisawa K, and Takahashi T. Heterogeneous TGF- β unresponsiveness and loss of TGF β RII expression caused by histone deacetylation in lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 61: 8331-8339, 2001.
- 5 Matsuoka S, Nakagawa T, Masuda A, Haruki N, Elledge SJ, and Takahashi T. Reduced expression and impaired kinase activity of a Chk2 mutant identified in human lung cancer. *Cancer Res.* 61: 5362-5365, 2001.
- 6 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.* 10: 403-405, 2001.
- 7 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.* 162: 201-205, 2001.
- 8 Dammann R, Takahashi T and Pfeifer GP. The CpG island of the novel tumor suppressor gene RASSF1A is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas. *Oncogene* 20: 3563-3567, 2001.
- 9 Konishi H, Nakagawa T, Harano T, Mizuno K, Saito H, Masuda A, Matsuda H, Osada H, and Takahashi T. Identification of frequent G2 checkpoint impairment and a homozygous deletion of 14-3-3 ϵ at 17p13.3 in small cell lung cancers. *Cancer Res.* 62: 271-276, 2002.
- 10 Osada H, Tatematsu Y, Yatabe Y, Nakagawa T, Konishi H, Tezel E, and Takahashi T. Frequent and histological type-specific inactivation of 14-3-3 σ in human lung cancers. *Oncogene* (in press).
- 11 Koshikawa K, Osada H, Kozaki K, Konishi H, Masuda A, Tatematsu Y, Nakao A, and Takahashi T. Significant up-regulation of a novel gene, CLCP1, in a highly metastatic lung cancer subline as well as in lung cancers in vivo.

Oncogene (in press).

- 12 Yatabe Y, Mitsudomi T, and Takahashi T. TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. Am. J. Surg. Pathol. (in press).
- 13 Mizuno K, Osada H., Konishi H, Tatematsu Y, Fujii Y, and Takahashi T. Aberrant hypermethylation of the CHFR prophase checkpoint gene in human lung cancers. Oncogene (in press).

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し、さらに細胞骨格系の極性を制御する分子機構とがんの浸潤・転移との関連を解析することを目的とする。これまでに私共は、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) を見出している。本年度は、上皮細胞では、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明らかにし、さらに、これが Caspase-8 の活性化より上流のレベルでの阻害によることを認めた。また、細胞極性の制御に関与している分子である ERBIN が p120 catenin 類似蛋白質である p0071 と結合し、細胞間接着の制御に関与してい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。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。また、上皮細胞の極性形成に重要な役割を果たしていることが最近報告された LAP (leucine-rich repeats and PDZ) ファミリー蛋白質に注目し、このファミリーに属する蛋白質である ERBIN と結合する蛋白質の探索を行い、細胞骨格系の極性を制御する分子機構とがんの浸潤・転移との関連を解析する。

B. 研究方法

1) これまでに私共が同定しているケラチン 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検討する。また、この系において、活性型

Caspase-8 を特異的に認識する抗体を用いて Caspase-8 の活性化状態を観察する。

2) 細胞の極性形成に関与する ERBIN と結合する分子を酵母 two-hybrid 法を用いて同定・クローニングする。bait 側プラスミド (pGBD) に ERBIN の 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。得られたクローンと prey 側ヒト脳 cDNA ライブラリーを導入した酵母を接合させ、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 ERBIN との結合を検討していく。

C. 研究成果

1) 単層上皮で発現しているケラチン 8/18 と結合する蛋白質の同定とその機能解析：私共はこれまでに、酵母 two-hybrid 法を用いて、ケラチン 18 と結合する蛋白質として DnaJ/Heat shock protein 40 (Hsp40) family に属する Mrj 蛋白質及び TNF receptor 1-associated death domain protein (TRADD) を同定している。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、私共は、TRADD 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 I ケラチン) に特異的に結合することを認めている。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。また、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、活性型 Caspase-8 の出現が低下していた。これらのことから、上皮細胞では、ケラチンが TRADD との結合しているために、TRADD が TNF receptor 1 にリクルートされるのが阻害され、その結果 Caspase-8 の活性化が低下することによって、アポトーシス誘導を減弱させていることが示唆された。

2) 細胞の極性形成に関与する ERBIN と結合する蛋白質の同定とその機能解析：ERBIN は、ErbB2 レセプターを basolateral membrane に局在化させる蛋白質として同定された分子である。私共は、ERBIN の PDZ ドメインを含む C 末端を bait とする two-hybrid screening を行い、ERBIN と結合する蛋白質として p120 catenin サブファミリーに属する armadillo 蛋白質である p0071 を同定した。MDCK 細胞において ERBIN はアドヘレンス・ジャンクションおよびデスモソームに存在し、p0071 と共局在した。私共はこれまでに、ERBIN とよく似たドメイン構造をもつ LAP 蛋白質である Densin-180 の PDZ ドメインと結合する蛋白質として p120 catenin サブファミリーに属する δ -catenin を同定している。Densin-180 は、 δ -catenin 及び N-cadherin と複合体を形成しており、海馬神経細胞初代培養の神経シナプスで δ -catenin 及び N-cadherin と共局在することを認めた。これらのことより、LAP (leucine-rich repeats and PDZ) ファミリー蛋白質 ERBIN およ

びDensin-180は、p120 catenin サブファミリーに属するp0071および δ -cateninと結合することにより、細胞間接着の制御の関与している可能性が示唆された。

D. 考察

1) 単層上皮で発現しているケラチン 8/18 と結合する蛋白質の同定とその機能解析：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。これらの結果は、細胞骨格蛋白質ケラチン 8/18 がアポトーシスのシグナルに影響をもつことを示唆し、がん細胞における細胞骨格蛋白質の働きを考える上での新しい観点となると考えられる。

2) 細胞の極性形成に関与する ERBIN と結合する蛋白質の同定とその機能解析：ERBIN は、最近その存在が明らかとなった LAP (leucine-rich repeat and PDZ) 蛋白質ファミリーに属する。LAP 蛋白質のひとつであるショウジョウバエの Scribble は、Lgl 及び Dlg と同一のシグナル経路上で上皮細胞の細胞極性形成に重要な役割を果たしており、がん抑制機能をもつとされる。本研究において私共は、ERBIN が p120 catenin サブファミリーに属する p0071 と結合して、細胞間接着部位に存在していることを見出した。これらの結果は LAP 蛋白質が armadillo 蛋白質との相互作用を介して細胞極性を制御している可能性を示唆する。ERBIN がヒトのがんにおいてがん抑制遺伝子として働いているかについて今後検討して

いきたいと考えている。

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 TRADD を見出し、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明らかにし、さらに、これが Caspase-8 の活性化より上流のレベルでの阻害によることを認めた。また、細胞極性の制御に関与している分子である ERBIN が p120 catenin 類似蛋白質である p0071 と結合し、細胞間接着の制御に関与してい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. 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* 20: 420-429, 2001
2. 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* 20: 2868-2876, 2001
3. 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.* 276: 12932-12937, 2001
4. 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
5. Inada, H., Izawa, I., Nishizawa, M., Fujita, E., Kiyono, T., Takahashi, T., Momoi, T., and Inagaki, M.: Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD. *J. Cell Biol.* 155:415-425, 2001
 6. Nagata, K., Izawa, I., and Inagaki, M.: A decade of site-and phosphorylation state-specific antibodies: recent advances in studies of spatiotemporal protein phosphorylation. *Genes Cells* 6:653-664, 2001
 7. Zhong, S., Jansen, C., She, QB., Goto, H., Inagaki, M., Bode, AM., Ma, WY. and Dong, Z.: Ultraviolet B-induced phosphorylation of histon H3 at serine 28 is mediated by MSK1. *J. Biol.Chem.* 276:33213-33219, 2001
 8. Lu, J., Landerholm, T.E., Wei, J.S., Dong, X.-R., Wu, S.-P., Liu, X., Nagata, K., Inagaki, M., and Majesky, M.W.: Coronary smooth muscle differentiation from proepicardial cells requires Rho-a-mediated actin reorganiation and p160 Rho-kinase activity. *Dev. Biol.* 240:404-418, 2001
 9. Goto, H., Yasui, Y., Nigg, E.A., and Inagaki, M.: Aurora-B phosphorylates histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells* 7:11-17, 2002
 10. Goto, H., Tanabe K., Manser, E., Lim, L., Yasui, Y., and Inagaki, M.: Phosphorylation and reorganization of vimentin by p21-activated kinase (PAK). *Genes Cells* 7:91-97, 2002
 11. Izawa, I., Nishizawa, M., Ohtakara, K., and Inagaki, M.: Densin-180 interacts with δ -catenin/neural plakophilin-related armadillo-repeat protein at synapses. *J. Biol. Chem.* 277: 5345-5350, 2002
 12. Izawa, I., Nishizawa, M., Tomono, Y., Ohtakara, K., Takahashi, T., and Inagaki, M.: ERBIN associates with p0071, an armadillo protein, at cell-cell junctions of epithelial cells. *Genes Cells*, in press.