

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

Ras 依存性の細胞老化機構の解明

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松田 道行

平成15（2003）年 4月

目 次

I. 総括研究報告	1
Ras 依存性の細胞老化機構の解明	
II. 分担研究報告	
1. Ras 活性化状態の幼弱細胞と老化細胞での違いの可視化	4
松田道行	
2. 細胞老化における SYT-SSX 分子による	6
p21 ^{WAF1/CIP1} 発現誘導機構の解析	
田中伸哉	
III. 研究成果	8

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）

総括研究報告書

Ras依存性の細胞老化機構の解明

主任研究者 松田道行 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨 初代ヒト線維芽細胞に活性化型のRas癌遺伝子産物を発現させると細胞が老化することが知られている。最近、このRas依存性の老化はp38MAPキナーゼを会することが明らかにされた。そこで、p38MAPキナーゼの活性化を生細胞でモニターする系を作成し、細胞の老化状態を生きた細胞で観察する系を構築した。さらに、SWI/SNF型リモデリング因子の1つであるhBRMはRasによる細胞癌化時にはその発現が抑制されており、hBRM自身は細胞老化促進能を有することが示されているが、我々はヒト滑膜肉腫由来癌遺伝子SYT-SSX1がhBRMに結合することに着目し、SYT-SSX分子の癌化機構と細胞老化の関連を検討した。

分担研究者 田中伸哉 北海道大学医学部講師

A. 研究目的

本研究の目的は、老化の分子メカニズムを明らかにすることにより、老化に起因する多くの疾病に対する新規の治療標的分子を発見することにある。しかし、老化にかかわる細胞内情報伝達系に関する研究は始まったばかりである。手がかりとして有名な現象は、癌遺伝子産物であるG蛋白Rasの恒常的活性化型は、初代線維芽細胞においては癌化の誘導は行わずむしろ、細胞の老化を誘導するという現象である。最近、このRas依存性の老化がp38MAPキナーゼを介することが明らかにされた。そこで、本年度は、このp38MAPキナーゼの活性化状態を生きた細胞で観察する系の構築を行った。これまで細胞の老化は β ガラクトシダーゼの酵素活性を測定する等の生化学的手法により観察されてきた。生細胞を用いて細胞の老化の程度を測定することが可能になれば研究が飛躍的に進むのみならず、抗老化薬等の開発にも非常に役に立つと期待される。

一方、クロマチンリモデリング因子は様々な生命現象に関与することが知られているが、本研究では細胞老化におけるクロマチンリモデリング因子の役割を明らかにする。具体的にはSWI/SNF型クロマチンリモデリング因子であるhBRMの役割を検討する。特にRasで癌化した細胞ではhBRMの発現が低下することや、hBRMの関連遺伝子であるhBRMがLKBを介して細胞老化を制御することが報告されており、Rasによる細胞癌化にhBRMの細胞老化機構が関与する可能性がある。

B. 研究方法

プラスミド pRaichu-Rasについては既に報告した。pRaichu-Rasはアミノ末端から順に、YFP、スパーサー、Ras、スパーサー、RafのRas結合領域、スパーサー、CFPから成る。このRasからRafにいたる領域をp38と置換した。p38は、N末およびC末を削ったほか、さまざまな変異体をPCRにて準備した。これらのプローブをpPirmond、発現される蛋白をPirmondと命名した。pIRM21はpCAGGSに由来する発現ベクターであり、3'側のマルチクローニング部位にinternal ribosomal entry siteと蛍光蛋白dsFP593の翻訳領域が含まれている。このベクターにp38の活性化因子であるMKK6および不活化因子であるMKP7をサブクローニングした。MKK6については、セリンスレオニンキナーゼ活性を欠失したものも作成した。PCRの鋳型に用いるcDNAは西田栄介博士(京都大学)に供与いただいた。

分光光度計による解析: 293T細胞にプラスミドをリン酸カルシウム法にてトランスフェクトし、36時間後にTriton X-100を含む緩衝液で可溶化した。上清をFP750分光光度計(日本分光)にて解析した。シアン色蛍光蛋白(CFP)の励起には433 nmの光を用いた。あるいは、COS7細胞にプラスミドをトランスフェクトし、36時間後にOlympusIX71顕微鏡にて撮影した。同機には、平面画像分光装置SpectraPro150(Acton Research Co.)と、Spec-10:256E冷却CCDカメラ(Roper)が備え付けてあり、分光データはWinSpec32(Roper)にて解析した。

Pirmondを用いたイメージング PirmondプローブをCOS7細胞に発現させ、24時間後に撮影を開始した。CoolSNAP HQ CCDカメラを備えたオリンパスIX70倒立型顕微鏡で観察し、CFPの蛍光画像および、CFPから黄色蛍光蛋白(YFP)への蛍光共鳴エネルギー移動

(FRET)により観察されるYFPの蛍光画像を取得し、この2枚の画像の蛍光強度比を図ることで、p38の活性を測定した。細胞をアニソマイシンで刺激し、活性変化を解析した。

SYT-SSXのもつ細胞老化機構を哺乳類の培養細胞を用いた系およびマウス個体で検討 次の実験を行った。

1. SYT-SSXによる細胞老化誘導能の検討:SYT-SSXがマウス初代培養線維芽細胞(MEF)に対して細胞老化誘導能を有するか否かを検討する。2. SYT-SSXによるp21WAF1/CIP1発現誘導の検討:ラット線維芽細胞株3Y1、ヒト胎児性腎細胞293T、ヒト腺癌細胞SW13、HCT116にSYT-SSX発現ベクターをトランスフェクトし、p21WAF1/CIP1の発現を誘導するか否かを検討する。3. p21WAF1/CIP1プロモーター領域に対する転写活性能の検討:p21WAF1/CIP1プロモーターでドライブされるルシフェラーゼベクター-pGL3b-4542-LucをSYT-SSX発現ベクターとともに293T細胞にトランスフェクトしてルシフェラーゼ活性を測定する。4. SYT-SSXによるp21WAF1/CIP1誘導のp53依存性の検討: p53ノックアウトヒト大腸癌細胞p53(-/-)HCT116を用いて、SYT-SSXを一過性に発現させることでp21WAF1/CIP1が誘導されるか否かを検討した。5. 3Y1細胞にSYT-SSXおよびLKB1をトランスフェクトしてSA- β -Galアッセイを行う。6. 老化モデルマウスの作成:SYT-SSXは癌遺伝子であるが個体レベルでは発癌作用のみが認められるのか、または、p21WAF1/CIP1の発現とともに老化が促進されるのかをトランスジェニックマウスを作成して検討する。7. 滑膜肉腫治療法の検討:SYT-SSXとhBRMの結合をhBRMの結合領域のみからなる50アミノ酸hBRM156-205AAを発現させることによって阻害することでSYT-SSXによる癌化を抑制することを、ヒト滑膜肉腫由来の細胞株を用いて検討する。

C. 研究結果

Pirmondの開発: Pirmondのプロープはすでに作成したRaichu-RasプロープのRasとその標的分子領域とを削除し、そこへp38を挿入することにより作成した。全長を挿入したものでは、活性変化が認められなかったため、様々な長さの欠失変異体を作成し、活性の変化が認められるものを作成した。その結果、MKK6の存在下では、FRET効率が減少し、MKP7存在下ではFRET効率が增加するプロープを作成することができた。

プロープのリン酸化とFRET効率の相関: Pirmondが使えるためにはFRET効率とプロープの活性化を示すリン酸化とが相関しなければならぬ。これを確認するために、COS7細胞にプロープと、MKK6活性化型およびMKP7とを発現させ、リン酸化状態をイムノブロットングで解析し、さらにFRET効率を平行して解析した。その結果、プロープのリン酸化が増加するにつれ、FRET効率が減少するのが確認できた。

Pirmondを用いたイメージング: 次に、これらのプロープが実際に生きた細胞で使えるかを調べた。COS7細胞にプロープを発現させ、血清飢餓状態に置いた後に、p38を活性化させることが知られているアニソマイシンにて刺激した。その結果、p38の活性は、刺激後速やかに上昇し、アニソマイシンを入れている限り持続することがわかった。しかもp38の活性はまず細胞質で上昇し、ついで核内が高くなることがわかった。アニソマイシンを除去すると速やかにp38の活性が低下することが観察された。これらイメージングのデータは、生化学的に抗リン酸化p38抗体を用いて解析した結果と矛盾しなかった。p38のリン酸化部位を欠失した変異体では、このような活性変化は捉えられなかったため、Pirmondがp38のリン酸化を捕らえることのできるプロープであることが確認された。

SYT-SSXのもつ細胞老化機構を哺乳類の培養細胞を用いた系およびマウス個体で検討 1. SYT-SSX1によるp21WAF1/CIP1発現誘導: SYT-SSX発現ベクターをヒト大腸癌細胞HCT116及びhBRMを欠損するSW13細胞株にトランスフェクション法にて導入すると、p21WAF1/CIP1の発現が増加することがウェスタンブロット法にて明らかとなった。SYT-SSX1とhBRMの共発現によりp21WAF1/CIP1の発現量は更に亢進した。2. SYT-SSX1によるp53非依存性かつSp1依存性p21WAF1/CIP1プロモーターの活性化: SYT-SSXによるp21WAF1/CIP1誘導にはp53の関与は検出できなかった。さらに、p53欠損HCT116細胞株を用いてp21の誘導におけるp53依存性を確認したところ、Luc活性に変化はなくSYT-SSX1によるp21WAF1/CIP1誘導はp53非依存性であることが示唆された。3. SYT-SSXの安定発現によるSW13細胞の増殖抑制:SYT-SSXはp21WAF1/CIP1の発現を誘導することが示されたが、細胞増殖能に対する影響を調べるためSW13細胞を用いてSYT-SSXの安定発現株を作成したところ細胞増殖能の低下を認めた。4. SYT-SSX1トランスジェニックマウスの作成:CMVプロモーターにより発現が制御されるSYT-SSXトランスジェニックマウスの作成を試みたが、出産マウス300匹以上に遺伝子導入は認めなかった。

D. 考察

細胞の老化は現在、細胞増殖の停止という現象により捉えられているが、その本態はいぜんとして不明である。最近の研究により、癌遺伝子Rasの活性化が老化を誘導するのは、ストレスを感知するp38の活性化を引き起こすからだとわかっている。そこで本年度は、昨年度イメージングした老化におけるRasの活性化に続き、p38の活性変化をイメージングすることにした。まず、すでに作成したRaichu-Rasプロープを改良してp38の活性変化を捉えるプロープを作成した。このプロープは、これまでのプロープが、2分子間の相互作用を指標として情報伝達系の活性化を捕らえていたのに対し、一つ

の分子の構造変化を捉えているという点で原理的に大きく異なる。一つの蛋白の活性が変化するとき、どの程度の構造変化がおきるかはケースバイケースであり、FRET効率の変化として検出できるプローブができるかどうかは予測できない。実際、p38と平行して解析を進めていたERKについては、FRET効率の変化が認められるものは作成できていない。p38も、アミノ末端側およびカルボキシル末端側を欠失することにより初めて、FRET効率の変化を誘導できるプローブが作成できた。このことは正常のp38と同じ制御機構からは逸脱する危険性もはらんでおり、今後、様々なp38の活性化する場面で、プローブが正しくp38の活性を反映できるか検討を続ける必要がある。今年度はp38のプローブを作成し、株化した細胞でのp38活性化のイメージングまでの行ったが、老化細胞でのイメージングはまだうまくいっていない。これは、老化細胞へのプローブ導入効率の低さや、プローブのシグナルノイズ比の低さなどが原因である。来年度は、この問題を解決し、Rasからp38へ至る老化シグナルのイメージングを完成させたい。

SYT-SSXを介する老化については、マウスの初代培養繊維芽細胞を用いてSYT-SSX、hBRMと細胞癌化・老化との関連を明らかにしていくと同時に個体のレベルで明らかにしていきたいと考えている。現在SYT-SSXトランスジェニックマウスの作成中であり、SYT-SSXの恒常的な高発現が胎生致死である可能性が示唆されており、SYT-SSX誘導可トランスジェニックマウスがこの問題を解決するものと考えて実験を進めている。また、野生型のSYTおよびSSXを用いて細胞老化との関連を調べることで、まだ生理的機能の不明なこれらの蛋白の役割を明らかにしていく予定である。本研究成果の治療への応用についてはRasの変異が高頻度に認められるヒト膀胱癌細胞の増殖をhBRMが抑制するかを検討する。hBRMは細胞老化を促進するが、既存の抗癌剤に比較すると、はるかに副作用が少ないことが予想され、大量のレトロウイルスなどによる遺伝子治療を行うことが可能であると考えられる。また、滑膜肉腫に関しては3Y1細胞とSW13細胞におけるSYT-SSXに対する反応性の違い(癌化と老化)のメカニズムを明らかにすることで、細胞増殖を抑制する新しい治療法開発の基盤となることが期待される。

E. 健康危険情報

なし。

F. 結論

Rasによる老化の情報を伝播するp38の活性化をモニターするプローブPirmondを作成し、ストレス依存性のp38活性化を生細胞でイメージングした。SYT-SSX1

による細胞老化機構を解析した。

G. 研究発表

1. 論文発表

R. E. Itoh, K. Kurokawa, Y. Ohba, H. Yoshizaki, N. Mochizuki, and M. Matsuda. Activation of Rac and Cdc42 video-imaged by FRET-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol. Cell. Biol.* 22:6582-6591, 2002.

Tsuda, M., Makino, Y., Kimura, T., Minami, A., Sawa, H., Nagashima, K., Matsuda, M., and Tanaka, S. SYT-SSX induced p21 by p53-independent and Sp1-dependent mechanism (in preparation)

Nishihara, H., Tanaka, S., Tsuda, M., Oikawa, S., Maeda, M., Shimizu, M., Shimoyama, H., Tanigami, A., Sawa, H., and Nagashima, K. Molecular and immunohistochemical analysis of adaptor protein Crk in human cancers. *Cancer Letter*, 180, 55-61, 2002

Okamoto, T., Tanaka, S., Stan, A.C., Koike, T., Kase, M., Makita, Z., Sawa, H., and Nagashima, K. Advanced glycation end products induce angiogenesis in vivo. *Microvascular Res.*, 63, 186-195, 2002

Tsuda, M., Tanaka, S., Sawa, H., Hanafusa, H., and Nagashima, K. Signalling adaptor protein v-Crk activates Rho and regulates cell motility in 3Y1 rat fibroblast cell line. *Cell Growth Differ*, 13, 131-139, 2002

Nishihara, H., Maeda, M., Oda, A., Tsuda, M., Sawa, H., Nagashima, K., and Tanaka, S. DOCK2 associates with CrkL and regulates Rac1 in hematopoietic cells. *Blood*, 100, 3968-3974, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

研究要旨 初代ヒト線維芽細胞に活性化型のRas癌遺伝子産物を発現させると細胞が老化することが知られている。最近、このRas依存性の老化はp38MAPキナーゼを会することが明らかにされた。そこで、p38MAPキナーゼの活性化を生細胞でモニターする系を作成し、細胞の老化状態を生きた細胞で観察する系を構築した。

A. 研究目的

本研究の目的は、老化の分子メカニズムを明らかにすることにより、老化に起因する多くの疾病に対する新規の治療標的分子を発見することにある。しかし、老化にかかわる細胞内情報伝達系に関する研究は始まったばかりである。手がかりとして有名な現象は、癌遺伝子産物であるG蛋白Rasの恒常的活性化型は、初代線維芽細胞においては癌化の誘導は行わずむしろ、細胞の老化を誘導するという現象である。最近、このRas依存性の老化がp38MAPキナーゼを介することが明らかにされた。そこで、本年度は、このp38MAPキナーゼの活性化状態を生きた細胞で観察する系の構築を行った。これまで細胞の老化はβガラクトシダーゼの酵素活性を測定する等の生化学的手法により観察されてきた。生細胞を用いて細胞の老化の程度を測定することが可能になれば研究が飛躍的に進むのみならず、抗老化薬等の開発にも非常に役に立つと期待される。

B. 研究方法

プラスミド pRaichu-Rasについては既に報告した。pRaichu-Rasはアミノ末端から順に、YFP、スパーサー、Ras、スパーサー、RafのRas結合領域、スパーサー、CFPから成る。このRasからRafにいたる領域をp38と置換した。p38は、N末およびC末を削ったほか、さまざまな変異体をPCRにて準備した。これらのプローブをpPirmond、発現される蛋白をPirmondと命名した。pIRM21はpCAGGSに由来する発現ベクターであり、3'側のマルチクロニング部位にinternal ribosomal entry siteと蛍光蛋白dsFP593の翻訳領域が含まれている。このベクターにp38の活性化因子であるMKK6および不活化因子であるMKP7をサブクロニングした。MKK6については、セリンスレオニンキナーゼ活性を欠失したものも作成した。PCRの鋳型に用いるcDNAは西田栄介博士(京都大学)に供与いただいた。

細胞および抗体 COS7細胞は福井博士(東京大学)に

供与いただいた。COS7細胞は10%血清を含むDMEM培地で培養した。p38、リン酸化p38に対する抗体はセルシグナリング社より購入した。

分光光度計による解析: 293T細胞にプラスミドをリン酸カルシウム法にてトランスフェクトし、36時間後にTriton X-100を含む緩衝液で可溶化した。上清をFP750分光光度計(日本分光)にて解析した。シアン色蛍光蛋白(CFP)の励起には433 nmの光を用いた。

顕微鏡測光装置を用いた分光解析 COS7細胞にプラスミドをトランスフェクトし、36時間後にOlympusIX71顕微鏡にて撮影した。同機には、平面画像分光装置SpectraPro150(Acton Research Co.)と、Spec-10:256E冷却CCDカメラ(Roper)が備え付けてあり、分光データはWinSpec32(Roper)にて解析した。フィルターセットは励起フィルターMX0420(朝日分光)、445DRLPダイクロイックミラー(Omega)を用いた。

Pirmondを用いたイメージング PirmondプローブをCOS7細胞に発現させ、24時間後に撮影を開始した。CoolSNAP HQ CCDカメラを備えたオリンパスIX70倒立型顕微鏡で観察し、CFPの蛍光画像および、CFPから黄色蛍光蛋白(YFP)への蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)により観察されるYFPの蛍光画像を取得し、この2枚の画像の蛍光強度比を図ることで、p38の活性を測定した。細胞をアニソマイシンで刺激し、活性変化を解析した。

C. 研究結果

Pirmondの開発: Pirmondのプローブはすでに作成したRaichu-RasプローブのRasとその標的分子領域とを削除し、そこへp38を挿入することにより作成した。全長を挿入したものでは、活性変化が認められなかったもので、様々な長さの欠失変異体を作成し、活性の変化が認められるものを作成した。その結果、MKK6の存在下では、FRET効率が減少し、MKP7存在下ではFRET効

率が増加するプローブを作成することができた。

プローブのリン酸化とFRET効率の相関: Pirmondが使えるためにはFRET効率とプローブの活性化を示すリン酸化とが相関しなければならない。これを確認するために、COS7細胞にプローブと、MKK6活性化型およびMKP7とを発現させ、リン酸化状態をイムノプロットで解析し、さらにFRET効率を平行して解析した。その結果、プローブのリン酸化が増加するにつれ、FRET効率が減少するのが確認できた。

Pirmondを用いたイメージング: 次に、これらのプローブが実際に生きた細胞で使えるかを調べた。COS7細胞にプローブを発現させ、血清飢餓状態に置いた後に、p38を活性化させることが知られているアノマイシンにて刺激した。その結果、p38の活性は、刺激後速やかに上昇し、アノマイシンを入れている限り持続することがわかった。しかもp38の活性はまず細胞質で上昇し、ついで核内が高くなることがわかった。アノマイシンを除去すると速やかにp38の活性が低下することが観察された。これらイメージングのデータは、生化学的に抗リン酸化p38抗体を用いて解析した結果と矛盾しなかった。p38のリン酸化部位を欠失した変異体では、このような活性変化は捉えられなかったので、Pirmondがp38のリン酸化を捕らえることのできるプローブであることが確認された。

D. 考察

細胞の老化は現在、細胞増殖の停止という現象により捉えられているが、その本態はいぜんとして不明である。最近の研究により、癌遺伝子Rasの活性化が老化を誘導するのは、ストレスを感知するp38の活性化を引き起こすからだとなっている。そこで本年度は、昨年度イメージングした老化におけるRasの活性化に続き、p38の活性変化をイメージングすることにした。まず、すでに作成したRaichu-Rasプローブを改良してp38の活性変化を捉えるプローブを作成した。このプローブは、これまでのプローブが、2分子間の相互作用を指標として情報伝達系の活性化を捕らえていたのに対し、一つの分子の構造変化を捉えているという点で原理的に大きく異なる。一つの蛋白の活性が変化するとき、どの程度の構造変化がおきるかはケースバイケースであり、FRET効率の変化として検出できるプローブができるかどうかは予測できない。実際、p38と平行して解析を進めていたERKについては、FRET効率の変化が認められるものは作成できていない。p38も、アミノ末端側およびカルボキシル末端側を欠失することにより初めて、FRET効率の変化を誘導できるプローブが作成できた。このことは正常のp38と同じ制御機構からは逸脱する危険性もはらんでおり、今後、様々なp38の活性化する場面で、プローブが正しくp38の活性を反映できるか検討

を続ける必要がある。

今年度はp38のプローブを作成し、株化した細胞でのp38活性化のイメージングまでの行ったが、老化細胞でのイメージングはまだうまくいっていない。これは、老化細胞へのプローブ導入効率の低さや、プローブのシグナルノイズ比の低さなどが原因である。来年度は、この問題を解決し、Rasからp38へ至る老化シグナルのイメージングを完成させたい。

E. 健康危険情報

なし。

F. 結論

Ras依存性に活性化されるp38のイメージングを行うためのプローブを開発した。

G. 研究発表

1. 論文発表

R. E. Itoh, K. Kurokawa, Y. Ohba, H. Yoshizaki, N. Mochizuki, and M. Matsuda. Activation of Rac and Cdc42 video-imaged by FRET-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol. Cell. Biol.* 22:6582-6591, 2002.

2. 学会発表

高谷昭行、吉崎尚良、黒川量雄、大場雄介、松田道行: FRETを利用したRalA活性化のモニター分子。第25回日本分子生物学会年会 横浜 平成14, 12月 11-14

伊藤玲奈、黒川量雄、吉崎尚良、大場雄介、松田道行: RacとCdc42の活性化モニター分子 第25回日本分子生物学会年会 横浜 平成14, 12月 11-14

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)

分担研究報告書

細胞老化における SYT-SSX 分子による p21^{WAF1/CIP1} 発現誘導機構の解析

分担研究者 田中 伸哉 北海道大学医学部分子細胞病理学

研究要旨:クロマチンリモデリング因子はクロマチン構造を変換し、転写を制御する分子であるが、近年生体の様々な現象に関与することが明らかとなってきた。SWI/SNF 型リモデリング因子の1つである hBRM は Ras による細胞癌化時にはその発現が抑制されており、hBRM 自身は細胞老化促進能を有することが示されている。我々はヒト滑膜肉腫由来癌遺伝子 SYT-SSX1 が hBRM に結合することに着目し、SYT-SSX 分子の癌化機構と細胞老化の関連を検討した。その結果、ヒト腺癌細胞 SW13 においては SYT-SSX が p21^{WAF1/CIP1} の発現を転写因子 Sp1 依存性かつ p53 非依存性に増加させ細胞増殖能を抑制することが明らかとなった。

A. 研究目的

クロマチンリモデリング因子は様々な生命現象に関与することが知られているが、本研究では細胞老化におけるクロマチンリモデリング因子の役割を明らかにする。具体的には SWI/SNF 型クロマチンリモデリング因子である hBRM の役割を検討する。特に Ras で癌化した細胞では hBRM の発現が低下することが報告されており、また、hBRM の関連遺伝子である hBRG が細胞老化を制御することが報告されており、Ras による細胞癌化に hBRM の細胞老化機構が関与する可能性がある。

我々はこれまでの研究によって hBRM に結合する分子として、ヒト滑膜肉腫由来キメラ癌遺伝子産物である SYT-SSX を報告してきた。SYT-SSX の発癌機構に、細胞老化機構の関与が示唆される。したがって本年度の研究では主として SYT-SSX による細胞老化機構を解析する。最終的には細胞老化のメカニズムを利用することで、現在特異的な治療法のないヒト滑膜肉腫に対する新しい治療法の開発を試みる。

B. 研究方法

SYT-SSX のもつ細胞老化機構を哺乳類の培養細胞を用いた系およびマウス個体で検討する。また、ヒト

滑膜肉腫細胞株の増殖を用いた実験により遺伝子治療法開発に発展可能な増殖能抑制を試みる。具体的には以下の項目について解析を行う。

1. SYT-SSX による p21^{WAF1/CIP1} 発現誘導の検討
2. p21^{WAF1/CIP1} プロモーター活性能の検討
3. SYT-SSX による p21 誘導の p53 依存性の検討
4. 老化モデルマウスの作成
5. 滑膜肉腫治療法の検討

倫理面への配慮:本研究は細胞バンクに登録されている腫瘍細胞株とプラスミドに挿入されたcDNAを用いるものであり、人体から採取した臨床検体は用いていない。したがって倫理面での問題は生じないと考えられる。

C. 研究結果

1. SYT-SSX1 による p21^{WAF1/CIP1} 発現誘導: SYT-SSX 発現ベクターをヒト大腸癌細胞 HCT116 及び SW13 細胞株に導入すると、p21^{WAF1/CIP1} の発現が増加することが明らかとなった。SYT-SSX1 と hBRM の共発現により p21^{WAF1/CIP1} の発現量は更に亢進した。ラット線維芽細胞株 3Y1 に SYT-SSX を一過性に発現させた場合には p21^{WAF1/CIP1} の発現誘導は検出されなかった。
2. SYT-SSX1 による p53 非依存性かつ Sp1 依存性

p21^{WAF1/CIP1} プロモーターの活性化: HCT116, SW13, 293T 細胞において SYT-SSX1 の過剰発現により p21^{WAF1/CIP1} プロモーターを活性化することを確認した。さらに、p53 欠損 HCT116 細胞株を用いて p21 の誘導における p53 依存性を確認したところ、Luc 活性に変化はなく SYT-SSX1 による p21^{WAF1/CIP1} 誘導は p53 非依存性であることが示唆された。p21^{WAF1/CIP1} プロモーターの欠失変異体解析より、Sp1 結合サイトのみを有する p21^{WAF1/CIP1} プロモーター-Luc ベクターを活性化することから、SYT-SSX による p21 誘導は Sp1 依存性であることが示された。

3. SYT-SSX の安定発現による SW13 細胞の増殖抑制: SYT-SSX は p21^{WAF1/CIP1} の発現を誘導することが示されたが、細胞増殖能に対する影響を調べるため SW13 細胞を用いて SYT-SSX の安定発現株を作成したところ細胞増殖能の低下を認めた。

4. SYT-SSX1 トランスジェニックマウスの作成: LTR 由来のプロモーターで発現が制御されるベクターを導入したマウスが作成された。現在ヘテロの状態で 6 ヶ月観察しているが明らかな異常は得られていない。

D. 考察

我々はこれまでに滑膜肉腫原因癌遺伝子 SYT-SSX が hBRM と結合し癌化を誘導することを明らかにしてきたが、本研究では SYT-SSX 分子に着目し細胞老化のメカニズムの検討を行った。SYT-SSX は SW13 細胞、HCT116 細胞、293T 細胞においては p21 の発現を誘導し、hBRM の共発現によりそれが増強し、また、SW13 細胞では SYT-SSX を安定的に導入発現させることで、その増殖能が低下した。3Y1 細胞は SYT-SSX によって癌化することが判明しているが、3Y1 細胞では p21 の誘導は検出されなかった。以上より SYT-SSX は 3Y1 細胞では癌化を誘導するが、他の細胞株では p21 の発現を誘導し、細胞増殖を停止するように作用すると考えられる。SYT-SSX は細胞増殖にとって、正と負のシグナルを伝達しており、細胞の種類、状態により、正のシグナルが優位になった場合に細胞癌化を誘導すると考えられる。

今後はマウスの初代培養繊維芽細胞を用いて SYT-SSX、hBRM と細胞癌化・老化との関連を明らか

にしていくと同時に個体のレベルで明らかにする。現在 SYT-SSX トランスジェニックマウスの作成中であり、SYT-SSX の恒常的な高発現が胎生致死である可能性が示唆されており、SYT-SSX 誘導可 TG マウスがこの問題を解決すると考えて実験を進めている。

E. 結論

クロマチンリモデリング因子に結合するヒト滑膜肉腫原因キメラ癌遺伝子産物 SYT-SSX は転写因子 Sp1 依存的かつ p53 非依存的に p21^{WAF1/CIP1} プロモーターを活性化し発現誘導を行い癌細胞の増殖を抑制することが判明した。本研究によって細胞老化とキメラ癌遺伝子との関連が明らかとなった。

F. 健康危険情報

特別に健康面に関与する情報は得られていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsuda, M., Makino, Y., Kimura, T., Minami, A., Sawa, H., Nagashima, K., Matsuda, M., and Tanaka, S. SYT-SSX induced p21 by p53-independent and Sp1-dependent mechanism (in preparation)
- 2) Okamoto, T., Tanaka, S., Stan, A.C., Koike, T., Kase, M., Makita, Z., Sawa, H., and Nagashima, K. *Microvascular Res.*, 63, 186-195, 2002
- 3) Tsuda, M., Tanaka, S., Sawa, H., Hanafusa, H., and Nagashima, K. *Cell Growth Differ*, 13, 131-139, 2002
- 4) Nishihara, H., Maeda, M., Oda, A., Tsuda, M., Sawa, H., Nagashima, K., and Tanaka, S. *Blood*, 100, 3968-3974, 2002
- 5) Nishihara, H., Maeda, M., Tsuda, M., Makino, Y., Sawa, H., Nagashima, K., and Tanaka, S. *Biochem Biophys Res Comm*, 296, 716-720, 2002

2. 学会発表

- 1) 田中伸哉: 第48回秋季病理学会 A 演説 岡山 2002.11.14-15
- 2) Tsuda, M., et al. : 18th Annual Meeting on Oncogene, June 21-24, 2002, San Diego, USA

H. 知的財産権の登録・出願状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

別紙 5

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N, Matsuda M.	Activation of Rac and Cdc42 video-imaged by FRET-based single-molecule probes in the membrane of living cells.	Mol.Cell. Biol.	22	6582-6591	2002
Tsuda, M., Makino, Y., Kimura, T., Minami, A., Sawa, H., Nagashima, K., Matsuda, M., and Tanaka, S.	SYT-SSX induced p21 by p53-independent and Sp1-dependent mechanism	in preparation			
Nishihara, H., Maeda, M., Tsuda, M., Makino, Y., Sawa, H., Nagashima, K., and Tanaka, S.	DOCK2 mediates T cell receptor-induced activation of Rac2 and IL-2 transcription.	Biochem Biophys Res Comm.	296	716-720	2002
Okamoto, T., Tanaka, S., Stan, A.C., Koike, T., Kase, M., Makita, Z., Sawa, H., and Nagashima, K.	Advanced glycation end products induce angiogenesis in vivo.	Microvascular Res.,	63	186-195	2002
Tsuda, M., Tanaka, S., Sawa, H., Hanafusa, H., and Nagashima, K.	Signalling adaptor protein v-Crk activates Rho and regulates cell motility in 3Y1 rat fibroblast cell line.	Cell Growth Differ	13	131-139	2002
Nishihara, H., Maeda, M., Oda, A., Tsuda, M., Sawa, H., Nagashima, K., and Tanaka, S..	DOCK2 associates with CrkL and regulates Rac1 in hematopoietic cells.	Blood	100	3968-3974	2002

20020212

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.8の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。