

20030224

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松田 道行

平成16(2004)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	6
松田道行	
2. 細胞老化における SYT-SSX 分子による	10
p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> 発現誘導機構の解析	
田中伸哉	
III. 研究成果	13

## 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キナーゼを介することが明らかにされた。また、継代数を重ねることによる細胞老化においても、p38の活性化の関与が報告されている。本研究では、p38の活性化を生細胞でモニターし、細胞の老化過程におけるこれらの分子の活性変化を生きた細胞で観察する系を確立した。さらに、滑膜肉腫細胞株においては細胞老化関連  $\beta$ -Galactosidaseの発現が増加していること判明し、様々の細胞株においても滑膜肉腫の癌遺伝子であるSYT-SSXがp21を誘導し、細胞老化を引き起こすことを明らかにした。これらの結果は、癌化の情報と老化の情報が密接に関連していることを示した。

分担研究者 田中伸哉  
北海道大学大学院医学系研究科助教授

### A. 研究目的

本研究の目的は、老化の分子メカニズムを細胞の情報伝達経路の視点から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。その手がかりとしてわれわれが着目したのは、癌遺伝子産物であるG蛋白Rasの恒常的活性化型が、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、この老化誘導がp38MAPキナーゼを介することが明らかにされた。そこで本研究では、p38の活性化を生細胞でモニターし、細胞の老化状態を生きた細

胞で観察する系の確立に取り組んだ。生きたまま観察できるという点を生かして、将来的には薬剤スクリーニングの系に組み込んで使用できる可能性もあると考えられる。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。さらに、本年度の研究では様々な細胞株を用いて滑膜肉腫の癌遺伝子である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

**プラスミド** pRaichu-Ras, pRaichu-Racについては既に報告した。pRaichu-Rasはアミノ末端から順に、YFP、スペーサー、Ras、スペーサー、RafのRas結合領域、スペーサー、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で作製した。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および不活性化因子であるMKP7をサブクロニングした。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細胞は福井泰久博士(東京大学)から、SVts8細胞は井出利憲博士(広島大学)から、Hs68細胞は原英二博士(徳島大学)から供与いただいた。COS7細胞は10%血清を含む低グルコースDMEM培地で培養した。SVts8細胞およびHs68細胞は、10%血清を含む高グルコースDMEM培地で培養した。SVts8細胞は通常、許容温度である34度で培養し、非許容温度である38.5度で培養することで老化を誘導した。Hs68細胞はecotropic receptorを組み込んだものを使用し、Rasの活性化型変異体をレトロウイルスを用いて発現させることにより細胞老化を誘導した。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。

**プローブ分子を用いたイメージング** Pirmondプローブ、またはRaichu-Ras、Raichu-RacプローブをCOS7細胞、SVts8細胞、Hs68細胞に発現させ、イメージングを行った。プローブはリポフェクション法またはマイクロインジェクション法により細胞に導入した。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、Ras、Racの活性を測定した。フィルターセットは励起フィルター440AF21(Omega)、445DRLPダイクロイックミラー(Omega)、吸収フィルター480AF30および535AF26(Omega)を用いた。必要により細胞をアニソマイシン、EGF、PDGF(Sigma)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** ヒト滑膜肉腫細胞株において老化関連 $\beta$ ガラクトシダーゼ活性が増加しているか否かを検討する。また、様々な細胞株をもちいて、SYT-SSXがp21を誘導するか否かを検討する。さらにSYT-SSXトランスジェニックマウスを作製し、細胞老化の促進の有無を個体レベルで検討する。

**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

**p38活性モニター分子の老化細胞での実証検討:**

p38活性モニター分子Pirmondが、細胞老化の基礎研究で多用される系において設計どおりの機能を果たすかどうかについて、実証検討を行った。細胞老化メカニズムの実験系はreplicative senescenceとpremature senescenceに大別される。今回の検討では、それぞれSVts8細胞とHs68細胞をモデルとして用いた。SVts8細胞は、癌蛋白質SV40 LT抗原の温度感受性変異体に

より有限寿命の線維芽細胞TIG-3を不死化させた細胞であり、非許容温度での培養により速やかに老化する。また、有限寿命の線維芽細胞であるHs68細胞は、Rasの活性化型変異体をレトロウイルスを用いて発現させることにより老化を誘導できる。双方の老化細胞において、Pirmondを用いて生きた細胞でp38MAPキナーゼの活性をモニターできることが確認できた。平行して行った生化学的解析により、SVts8細胞では細胞老化に伴うp38活性の上昇が見られたが、Hs68細胞では形態・増殖速度から判断して明らかに老化が誘導されている場合についてもp38活性の上昇が見られなかった。

**ヒト滑膜肉腫細胞株を用いた細胞老化:** ヒト滑膜肉腫細胞株、SYO-1、HS-SY-II、Fuji、FU-SY-1においては $\beta$ -Gal活性が約3倍以上増加していることが明らかとなった。対照としてはU251、SK-OV3、HeLa、HCT116、NIH3T3、3Y1細胞を用いた。ウエスタンブロット法にて滑膜肉腫細胞のFujiとSYO1において著明にp21<sup>WAF1/CIP1</sup>の蛋白発現の増加が認められた。次に、p21<sup>WAF1/CIP1</sup>のプロモーターの活性化状態をルシフェラーゼアッセイを用いて検討したところ、滑膜肉腫細胞4種類すべてにおいて、他の癌細胞株に比較して10倍から40倍の活性化を認めた。さらに、SYT-SSX発現ベクターをヒト線維芽細胞株に一過性に導入した場合にもp21<sup>WAF1/CIP1</sup>のプロモーターの活性化を認めた。

#### **SYT-SSXの安定発現による細胞の増殖抑制:**

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。

#### **D. 考察**

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。この老化誘導がp38MAPキナーゼを介することが明らかにされた。また継代数を重ねることによる細胞老化においても、p38の活性化が関与するという報告も行われている。本年度行った生化学的解析により、SVts8細胞では細胞老化に伴うp38活性の上昇が見られたが、Hs68細胞では形態・増殖速度から判断して明らかに老化が誘導されている場合についてもp38活性の上昇が見られなかった。このことは細胞老化に関わるメカニズムが予想以上に複雑なものであることを示唆している。その場合、p38活性化の場所やタイミングについてさらに詳細な解析が必要になると思われる。本研究で開発されたp38のプロローブは、その要請に応えるツールとして有用である。今回の検討ではp38のプロローブによって細胞の老若によるp38の活性化パターンに有意な差を認められなかったが、その点は、イメージング技術の進歩と、プロローブに使用している蛍光蛋白質の改良によって見込まれる感度の向上により、さらに正確な検討が行えるものと考えている。本研究により、p38MAPキナーゼの活性を老若の細胞で生きたまま比較検討する系を確立することができた。今後の技術的進歩によりさらに感度が向上することが見込めるので、老化の分子メカニズムを細胞の情報伝達経路の視点から解明するツールとしてますます有用になると考えられる。また、細胞を生きたまま観察できるという点を生かして、薬剤スクリーニングの系に組み込んで使用できる可能性もあると考えられる。

一方、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。昨年度までの当該研究においてSYT-SSXはSW13細胞においてはp21の

発現を誘導することを報告してきたが、本年度は、滑膜肉腫細胞株4種類全てにおいて老化関連  $\beta$ -Galが活性化する事が明らかとなった。またSYT-SSXのトランスジェニックマウスにおいては体重増加の抑制がみられたことからSYT-SSXは細胞増殖抑制能を有することが考えられた。今後はこの内因性の増殖抑制能を利用した。腫瘍の老化促進治療法の開発に発展させたい。

## E. 健康危険情報

なし。

## F. 結論

p38MAPキナーゼの活性を老若の細胞で生きたまま比較検討する系を確立することができた。また、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と細胞老化の関連が明らかとなった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takaya, A., Ohba, Y., Kurokawa, K., and Matsuda, M. RalA Activation at Nascent Lamellipodia of EGF-stimulated Cos7 cells and Migrating MDCK Cells. *Mol. Biol. Cell*, in press.
2. Kurokawa, K., Itoh, R.E., Yoshizaki, H., Ohba, Y., Nakamura, T., Matsuda, M. (2004). Co-activation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Mol.*

*Biol. Cell* 15, 1003-1010.

3. Aoki, K., Nakamura, T., Matsuda, M. (2004). Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 279, 713-719.
4. Ohba, Y., Kurokawa, K., Matsuda, M. (2003). Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. *EMBO J.* 22, 859-869.
5. Endo, S., Okada, Y., Orba, Y., Nishihara, H., Tanaka, S., Nagashima, K., Sawa, H. (2003). JC virus agnoprotein colocalizes with tubulin. *J. Neurovirol.* 9, 10-14.
6. Oda, A., Wada, I., Miura, K., Okawa, K., Kadoya, T., Kato, T., Nishihara, H., Maeda, M., Tanaka, S., Nagashima, K., Nishitani, C., Matsuno, K., Ishino, M., Machesky, L.M., Fujita, H., Randazzo, P. (2003). CrkL directs ASAP1 to peripheral focal adhesions. *J. Biol. Chem.* 278, 6456-6460.
7. Orba, Y., Tanaka, S., Nishihara, H., Kawamura, N., Itoh, T., Shimizu, M., Sawa, H., Nagashima, K. (2003). Application of laser capture microdissection to cytologic specimens for the detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement in patients with malignant lymphoma. *Cancer* 99, 198-204.

### 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

佐藤 壮司、藤岡 亜紀、中村 岳史、西田 栄介、松田 道行: p38 MAPキナーゼの活性化モニター分子

の開発 第26回日本分子生物学会年会 神戸 平成  
15, 12月 10-13

田中伸哉: ヒト滑膜肉腫癌遺伝子SYT-SSXによる細  
胞老化誘導能の解析 第26回日本分子生物学会 神  
戸 12.10-13, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

## Ras活性化状態の幼弱細胞と老化細胞での違いの可視化

分担研究者 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キナーゼを介することが明らかにされた。また、継代数を重ねることによる細胞老化においても、p38の活性化の関与が報告されている。本研究では、p38の活性化を生細胞でモニターし、細胞の老化状態を生きた細胞で観察する系の確立を行った。

### A. 研究目的

本研究の目的は、老化の分子メカニズムを細胞の情報伝達経路の視点から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。その手がかりとしてわれわれが着目したのは、癌遺伝子産物であるG蛋白Rasの恒常的活性化型が、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、この老化誘導がp38MAPキナーゼを介することが明らかにされた。そこで本研究では、p38の活性化を生細胞でモニターし、細胞の老化状態を生きた細胞で観察する系の確立に取り組んだ。生きたまま観察できるという点を生かして、将来的には薬剤スクリーニングの系に組み込んで使用できる可能性もあると考えられる。

### B. 研究方法

プラスミド pRaichu-Ras, pRaichu-Racについては既

に報告した。pRaichu-Rasはアミノ末端から順に、YFP、スペーサー、Ras、スペーサー、RafのRas結合領域、スペーサー、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で作製した。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。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細胞は福井泰久博士(東京大学)から、SVts8細胞は井出利憲博士(広島大学)から、Hs68細胞は原英二博士(徳島大学)から供与いただいた。COS7細胞は10%血清を含む低グルコースDMEM培地で培養した。SVts8細胞およびHs68細胞は、10%血清を含む高グルコースDMEM培地で培養した。SVts8細胞は通常、許容温度である34度で培養し、非許容温度であ

る38.5度で培養することで老化を誘導した。Hs68細胞はecotropic receptorを組み込んだものを使用し、Rasの活性化型変異体をレトロウイルスを用いて発現させることにより細胞老化を誘導した。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。

**プローブ分子を用いたイメージング** Pirmondプローブ、またはRaichu-Ras、Raichu-RacプローブをCOS7細胞、SVts8細胞、Hs68細胞に発現させ、イメージングを行った。プローブはリポフェクション法またはマイクロインジェクション法により細胞に導入した。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、Ras、Racの活性を測定した。フィルターセットは励起フィルター440AF21(Omega)、445DRLPダイクロイックミラー(Omega)、吸収フィルター480AF30および535AF26(Omega)を用いた。必要により細胞をアノマイシン、EGF、PDGF(Sigma)で刺激し、活性変化を解析した。

### C. 研究結果

**p38活性モニター分子の老化細胞での実証検討:**

p38活性モニター分子Pirmondが、細胞老化の基礎研究で多用される系において設計どおりの機能を果たすかどうかについて、実証検討を行った。細胞老化メカニズムの実験系はreplicative senescenceとpremature senescenceに大別される。今回の検討では、それぞれSVts8細胞とHs68細胞をモデルとして用いた。SVts8細胞は、癌蛋白質SV40 LT抗原の温度感受性変異体により有限寿命の線維芽細胞TIG-3を不死化させた細胞であり、非許容温度での培養により速やかに老化する。

また、有限寿命の線維芽細胞であるHs68細胞は、Rasの活性化型変異体をレトロウイルスを用いて発現させることにより老化を誘導できる。双方の老化細胞において、Pirmondを用いて生きた細胞でp38MAPキナーゼの活性をモニターできることが確認できた。平行して行った生化学的解析により、SVts8細胞では細胞老化に伴うp38活性の上昇が見られたが、Hs68細胞では形態・増殖速度から判断して明らかに老化が誘導されている場合についてもp38活性の上昇が見られなかった。

**成長因子によるRasおよびRacの活性変化の老若の細胞での差異の検討:** 老化に伴うp38の活性化が認められたSVts8細胞において、p38の活性化に中心的な役割を果たすと考えられるRasおよびRac分子について、以前に作製したモニター分子を用いて、成長因子EGFおよびPDGFによる活性変化のパターンを老若の細胞で検討した。Rasに関してはそのパターンに変化が認められないことから、刺激に応答したRas活性化のメカニズム自体には細胞の老若で大きな差は見出されなかった。Racについては、同じ刺激に対して老化細胞の方が敏感に応答する傾向が認められた。

### D. 考察

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。この老化誘導がp38MAPキナーゼを介することが明らかにされた。また継代数を重ねることによる細胞老化においても、p38の活性化が関与するという報告も行われている。本年度行った生化学的解析により、SVts8細胞では細胞老化に伴うp38活性の上昇が見られたが、Hs68細胞では形態・増殖速度から判断して明らかに老化が誘導されている

場合についてもp38活性の上昇が見られなかった。このことは細胞老化に関わるメカニズムが予想以上に複雑なものであることを示唆している。その場合、p38活性化の場所やタイミングについてさらに詳細な解析が必要になると思われる。本研究で開発されたp38のプロープは、その要請に応えるツールとして有用である。今回の検討ではp38のプロープによって細胞の老若によるp38の活性化パターンに有意な差を認められなかったが、その点は、イメージング技術の進歩と、プロープに使用している蛍光蛋白質の改良によって見込まれる感度の向上により、さらに正確な検討が行えるものと考えている。

成長因子によるRasの活性変化のモニター分子を用いた検討の結果では、老若の細胞で変化のパターンに顕著な差は認められなかった。このことから、刺激に応答したRas活性化のメカニズム自体には細胞の老若で大きな差はなく、老若でRasの活性が変化するとすれば、入ってくる刺激の量・質の違いによるものではないかと推測される。Rac1については、同じ成長因子の刺激に対して老化細胞の方が敏感に応答する傾向があり、そのことが老化に伴うp38活性の上昇に一定の寄与をしている可能性が考えられる。

本研究により、p38MAPキナーゼの活性を老若の細胞で生きたまま比較検討する系を確立することができた。今後の技術的進歩によりさらに感度が向上することが見込めるので、老化の分子メカニズムを細胞の情報伝達経路の視点から解明するツールとしてますます有用になると考えられる。また、細胞を生きたまま観察できるという点を生かして、薬剤スクリーニングの系に組み込んで使用できる可能性もあると考えられる。

## E. 健康危険情報

なし。

## F. 結論

p38MAPキナーゼの活性を老若の細胞で生きたまま比較検討する系を確立することができた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takaya, A., Ohba, Y., Kurokawa, K., and Matsuda, M. Rac1 Activation at Nascent Lamellipodia of EGF-stimulated Cos7 cells and Migrating MDCK Cells. *Mol. Biol. Cell*, in press.
2. Kurokawa, K., Itoh, R.E., Yoshizaki, H., Ohba, Y., Nakamura, T., Matsuda, M. (2004). Co-activation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Mol. Biol. Cell* 15, 1003-1010.
3. Aoki, K., Nakamura, T., Matsuda, M. (2004). Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 279, 713-719.
4. Ohba, Y., Kurokawa, K., Matsuda, M. (2003). Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. *EMBO J.* 22, 859-869.

### 2. 学会発表

佐藤 壮司、藤岡 亜紀、中村 岳史、西田 栄介、松田 道行：p38 MAPキナーゼの活性化モニター分子の開発 第26回日本分子生物学会年会 神戸 平成15, 12月 10-13

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

SYT-SSX 分子による細胞老化機構の解析

分担研究者 田中 伸哉 北海道大学大学院医学系研究科分子細胞病理学

研究要旨:細胞老化(premature senescence)は外界から強い刺激が加わった時に起こる細胞の反応であるが、中でも代表的な癌遺伝子 Ras が premature senescence を誘導する事が知られている。我々はヒト滑膜肉腫由来癌遺伝子 SYT-SSX1がクロマチンリモデリング因子 hBRM に結合することを明らかにした後に、SYT-SSX 分子の癌化機構と細胞老化の関連を検討し、これまでの研究でヒト腺癌細胞 SW13 においては SYT-SSX が p21<sup>WAF1/CIP1</sup> の発現を増加させ細胞増殖能を抑制することを報告してきた。本年度の研究では、滑膜肉腫細胞株においては細胞老化関連  $\beta$ -Galactosidase の発現が増加していること判明し、様々の細胞株においても SYT-SSX が p21 を誘導することを明らかにした。また SYT-SSX は細胞増殖を抑制することが判明し、これと相関して生後7ヶ月のトランスジェニックマウスでは体重増加の抑制を有意に認めた。

A. 研究目的

細胞老化は様々な外界刺激から細胞を守る生命現象であることが知られているが、本研究は細胞老化における癌遺伝子の役割とそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。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 のと結合する滑膜肉腫関連癌遺伝子 SYT-SSX 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いる。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、SYT-SSX 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 SYT-SSX を報告してきた。SYT-SSX が SW13細胞においては細胞老化を誘導することを報告してきた。本年度の研究では様々な細胞株を用いて 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

ヒト滑膜肉腫細胞株において老化関連  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性が増加しているか否かを検討する。また、様々な細胞株をもちいて、SYT-SSX が p21 を誘導するか否かを検討する。さらに SYT-SSX トランスジェニックマウスを作製し、細胞老化の促進の有無を個体レベルで検討する。

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 を用いているものであり、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. ヒト滑膜肉腫細胞株を用いた細胞老化関連  $\beta$ -Gal アッセイ:ヒト滑膜肉腫細胞株、SYO-1、HS-SY-II、Fuji、FU-SY-1 においては  $\beta$ -Gal 活性が約3倍以上増加して

いることが明らかとなった。対照としては U251、SK-OV3、HeLa、HCT116、NIH3T3、3Y1 細胞を用いた。

2. SYT-SSX1 による p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 発現とプロモーターの活性化:ウエスタンブロット法にて滑膜肉腫細胞の Fuji と SYO1 において著明に p21<sup>WAF1/CIP1</sup> の蛋白発現の増加が認められた。次に、p21<sup>WAF1/CIP1</sup> のプロモーターの活性化状態をルシフェラーゼアッセイを用いて検討したところ、滑膜肉腫細胞 4 種類すべてにおいて、他の癌細胞株と比較して 10 倍から 40 倍の活性化を認めた。さらに、SYT-SSX 発現ベクターをヒト線維芽細胞株に一過性に導入した場合にも p21<sup>WAF1/CIP1</sup> のプロモーターの活性化を認めた。

3. SYT-SSX1 による p53 非依存性かつ Sp1 依存性 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> プロモーターの活性化: 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 誘導は p53 非依存性であることが示唆された。p21 プロモーターの欠失変異体解析より、Sp1 または Sp3 結合サイトのみを有する p21 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 および Sp3 依存性であることが示された。

4. SYT-SSX の安定発現による細胞の増殖抑制: SYT-SSX は p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 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 プロモーターで SYT-SSX1 の発現が制御されるベクターを導入したマウスを作製した。現在ヘテロの状態で 4 世代観察を行ったところ、7ヶ月においては、野生型では体重約 34kg に比して、トランスジェニックマウスでは約 27 kg と、有意な体重減少を認めた。

#### 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。昨年度までの当該研究において SYT-SSX は SW13 細胞においては p21 の発現を誘導することを報告してきたが、本年度は、滑膜肉腫細胞株 4 種類全てにおいて老化関連  $\beta$ -Gal が活性化する事が明らかとなった。また SYT-SSX のトランスジェニックマウスにおいては体重増加の抑制がみられたことから SYT-SSX は細胞増殖抑制能を有することが考えられた。今後はこの内因性の増殖抑制能を利用した。腫瘍の老化促進治療法の開発に発展させたい。

#### 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 依存性かつ p53 非依存性に p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 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

特別に健康面に関する情報は得られていない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Oda, A., Wada, I., Miura, K., Okawa, K., Kadoya, T., Kato, T., Nishihara, H., Maeda, M., Tanaka, S., et al. *J. Biol. Chem.*, 278, 6456-6460, 2003
- 2) Endo, S., Okada, Y., Orba, Y., Nishihara, H., Tanaka, S., et al. *J. Neuro Virol.*, 9, 10-14, 2003
- 3) Orba, Y., \*Tanaka, S., Nishihara, H., Kawamura, N., Itoh, T., Shimizu, M., Sawa, H., and Nagashima, K. *Cancer [Cytopathology]*, 99, 198-204, 2003
- 4) Ishida, M., Tanaka, S., and Ohta, T. *Genes to Cells*, in press
- 5) Higashi, H., Nakaya, A., Tsutsumi, R., Yokoyama, K., Fujii, Y., Ishikawa, S., Higuchi, M., Takahashi, A., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Tanaka, S., Azuma, T., and Hatakeyama, M. *J. Biol. Chem.*, in press.

##### 2. 学会発表

- 1) Shinya Tanaka, et al. Analysis of human synovial sarcoma oncogene SYT-SSX induced cellular senescence Salk/EMBL Oncogenes and growth control, 2003. 8.15-19, San Diego, USA
- 2) 田中伸哉ら. ヒト滑膜肉腫癌遺伝子 SYT-SSX による細胞老化誘導能の解析

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
Takaya, A., Ohba, Y., Kurokawa, K., and Matsuda, M.	RalA Activation at Nascent Lamellipodia of EGF-stimulated Cos7 cells and Migrating MDCK Cell.	Mol. Biol. Cell		in press.	
Kurokawa, K., Itoh, R. E., Yoshizaki, H., Ohba, Y., Nakamura, T., Matsuda, M.	Co-activation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor.	Mol. Biol. Cell	15	1003-1010	2004
Aoki, K., Nakamura, T., Matsuda, M.	Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells.	J. Biol. Chem.	279	713-719	2004
Ohba, Y., Kurokawa, K., Matsuda, M.	Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1.	EMBO J.	22	859-869	2003
Endo, S., Okada, Y., Orba, Y., Nishihara, H., Tanaka, S., Nagashima, K., Sawa, H.	JC virus agnoprotein colocalizes with tubulin.	J. Neurovirol.	9	10-14	2003
Oda, A., Wada, I., Miura, K., Okawa, K., Kadoya, T., Kato, T., Nishihara, H., Maeda, M., Tanaka, S., Nagashima, K., Nishitani, C., Matsuno, K., Ishino, M., Machesky, L. M., Fujita, H., Randazzo, P.	CrkL directs ASAP1 to peripheral focal adhesions.	J. Biol. Chem.	278	6456-6460	2003

Orba,Y., Tanaka,S., Nishihara,H., Kawamura,N., Itoh,T., Shimizu,M., Sawa,H., Nagashima,K.	Application of laser capture microdissection to cytologic specimens for the detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement in patients with malignant lymphoma.	Cancer	99	198-204	2003
----------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------	----	---------	------

20030224

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