

drs 癌抑制遺伝子による癌化抑制機構

旦部 幸博¹⁾, 井上 寛一¹⁾

1) 病理学講座微生物感染症学部門

Function of Tumor Suppressor Gene, *drs*

Yukihiro TAMBE¹⁾ and Hirokazu INOUE¹⁾

1) Division of Microbiology and Infectious Disease, Department of Pathology

Abstract The *drs* gene was originally isolated as a suppressor of *v-src* transformation. Expression of *drs* mRNA is markedly downregulated in a variety of human cancer cell lines and tissues. Ectopic expression of the Drs protein induced apoptosis in human cancer cell lines via the novel pathway initiated from the endoplasmic reticulum (ER), involving the binding to ASY, apoptosis-inducing proteins localized in ER, and activation of caspase-12, -9, and -3. We generated *drs* knockout (KO) mice and showed that malignant tumors including lymphomas, lung adenocarcinomas and hepatomas were generated in about 30% of *drs* KO mice. These results indicate that *drs* contributes to the suppression of malignant tumor formation, and this suppression is closely correlated with *drs*-mediated apoptosis. We also investigated the physiological roles of *drs* gene by using mouse embryonic fibroblast (MEF) cells derived from *drs* KO mice, and found that *drs* is associated with Rab24, autophagy regulating protein, and regulates autophagy maturation under low serum culture conditions. Furthermore, *drs* suppresses viral replication via mTOR-dependent pathway. These results suggest that *drs* is involved in the protective responses of the cells against the carcinogenesis and viral infection.

Keyword *drs*, tumor suppressor gene, knockout mouse, autophagy, anti-viral activity.

はじめに

本稿は、平成 24 年 7 月 17 日に開催された「第 8 回基礎臨床融合研究発表会：がんにおける遺伝子異常と予後因子について」において発表された「Drs 癌抑制遺伝子による癌化抑制機構」の講演内容をまとめたものである。

drs (down-regulated by *v-src*) は、ウイルス癌遺伝子 *v-src* によって mRNA の発現が抑制されるものとして発見された新規癌抑制遺伝子である[1]。我々はこの *drs* 遺伝子の機能に着目して研究を行ってきた。特に *drs* ノックアウト(KO)マウスを本学で独自に作製し、それを用いて *drs* の癌抑制遺伝子としての機能を解明し、またその生理機能について検討を行ってきた。本稿では、これまでの研究成果を総合的に紹介する。

drs 遺伝子

1. 発見の経緯

癌の発症は、癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活化が細胞ゲノムに蓄積されて生じる「多段階発癌」と呼ばれるメカニズムで進行することが知られている[2, 3]。ras や src などの癌遺伝子、p53 や Rb などの癌抑制遺伝子をはじめ、数多くの癌関連遺伝子が発見されてきた。井上ら[4]は、ウイルス癌遺伝子 *v-src* による癌化機構を研究する過程で、NIH3T3 や 3Y1、F2408 などのげっ歯類の線維芽細胞由来の培養細胞株が *v-src* によって容易に transform するのに対して、正常な初代ラット胎児線維芽細胞(REF)は、*v-src* 単独では transform しないことを見いだした。さらに、*v-src* で transform させた F2408 細胞を、正常な F2408 または REF と細胞融合させたところ、前者の融合細胞は

Received November 20, 2006

Correspondence: 滋賀医科大学病理学講座微生物感染症学部門 旦部 幸博

〒520-2192 大津市瀬田月輪町

tambe@belle.shiga-med.ac.jp
a21

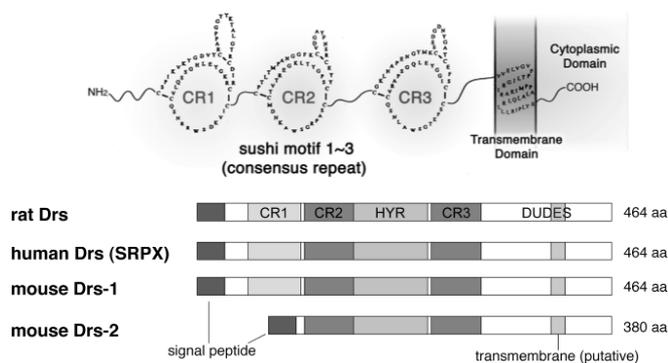


図 1. Drs タンパク質の構造模式図[1, 6].

transform したのに対し、後者では正常型の phenotype を示した。すなわち、正常な REF においては *v-src* に拮抗する何らかの癌抑制遺伝子が発現していると考えられた。そこで REF の cDNA ライブラリを作製して、*v-src* 癌化細胞への DNA transfection によってその癌化形質を発現抑制する活性を持った遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、発見されたのが *drs* 遺伝子である[1]。

2. Drs の構造と特徴

drs 遺伝子は X 染色体上(Xp21.1)に位置し、464 アミノ酸からなる Drs タンパク質をコードする。Drs タンパク質は、N 末端にシグナルペプチド、C 末端付近に putative な transmembrane (TM) 領域を一つ有している (図 1)。培養細胞への遺伝子導入実験の結果も、小胞体と細胞膜上に発現する 1 型膜タンパク質であることを示した。また、構造上の大きな特徴として、TM 領域より N 端側に「Sushi モチーフ」と呼ばれる consensus repeats (CRs) を 3 つ有している。Sushi モチーフは、セレクトインファミリーやインターフェロン受容体、補体結合タンパクなどにも見られる、リガントとの結合などタンパク間相互作用に関与するドメイン構造であり、Drs においても何らかのタンパク間相互作用に関与していると考えられる。この他、CR2 と CR3 の間には hyalin repeat (HYR) と呼ばれる consensus repeat が 1 つあり、また TM 領域を含む C 末端側について、別の癌抑制遺伝子である DRO-1 をはじめとするいくつかのタンパク質との相同性が見られ、DUDES repeat と名付けられた[5]。ただし HYR や DUDES repeat の機能についてはまだ十分には判っていない。

drs 遺伝子は、これまでにラット[1]、マウス[6]、ヒト[7]をはじめ、多くの哺乳動物、ニワトリ、ゼブラフィッシュから分離されている。ヒトの *drs* ホモログは SRPX(sushi-repeated protein on chromosome X)とも呼ばれている。これらはいずれも非常に高い相同性を示す。例えばマウス *drs* はアミノ酸レベルで、ラットと 97.4%、ヒトと 92.9% 同一である[6]。また、*drs* mRNA はヒトやマウスの様々な正常組織では、ほぼ ubiquitous に発

現しており[6, 8]、生物間で高度に保存された遺伝子であることと合わせて、何らかの基本的な生理機能に関与すると考えられる。

drs の腫瘍抑制作用の解析

1. ヒト癌における *drs* mRNA の発現

drs mRNA は大部分の正常細胞で発現しているが、*v-src*, *v-fps*, *v-ras*, *v-mos*, *v-sis*, *v-abl* などのレトロウイルス癌遺伝子を導入すると、mRNA レベルで発現が抑制される[1]。そこで実際のヒト癌においても、*drs* mRNA の発現が抑制されているかどうかについて、検討した[8-12]。種々のヒト癌細胞株を用いて Northern blotting によって解析した結果、大腸癌、肺癌、精巣癌、直腸癌、卵巣癌、子宮頸癌、膵臓癌、上皮癌、胃癌、膀胱癌など様々な癌細胞株において、*drs* mRNA 発現の減少や消失が認められた[8]。そこで実際のヒトがん組織における *drs* mRNA 発現を、*in situ* ハイブリダイゼーションによって検討した[9-12]。例えば、大腸癌[9]では、一人の大腸癌患者から切除した腫瘍組織のうち悪性度の異なる三箇所(軽度異型性腺腫、中度異型性腺腫、腺癌)、および付随した正常大腸組織(normal colon)について、それぞれ *drs* mRNA の発現を検討した結果、正常組織や悪性度の低い腺腫では *drs* mRNA の発現が認められたが、悪性度の高い腺腫や癌組織では発現が消失していた。このことから、正常組織で発現している *drs* mRNA が、大腸癌の悪性化に伴って発現消失すると考えられた。この他、肺腺癌[10]、前立腺癌[11]、ATL リンパ腫[12]でもほぼ同様に、悪性化に伴って *drs* mRNA 発現が抑制された。このことから、さまざまなヒト癌発症に *drs* mRNA の発現抑制が関与している可能性が示唆された。

2. *drs* の *in vitro* 腫瘍抑制作用

drs は、*v-src* によって mRNA レベルで発現抑制される一方、*v-src* の導入によって引き起こされる focus 形成などの細胞癌化(悪性化)形質を抑制する活性を示す[13]。またヒト癌細胞株にレトロウイルスベクターを用いて *drs* を遺伝子導入すると、癌細胞の悪性化形質の一つである足場非依存性増殖が抑制された[8]。また、DNA トランスフェクションによって *drs* 遺伝子を一過性大量発現させた癌細胞にはアポトーシスが誘導された[14]。このとき、Drs は小胞体に局在するアポトーシス関連分子である ASY/Nogo-B と相互作用し、Caspase-12 を活性化する新規の小胞体関連アポトーシスの誘導に関与すると考えられた。また、*drs* が完全に欠損した LC-T1 癌細胞株(後述)に、レトロウイルスベクターを用いて再導入を行うと、低血清ストレス条件下で Caspase-12 の活性化を伴うアポトーシス誘導が認められた[15]。以上の結果から、*drs* はアポトーシ

ス誘導を介して癌化抑制に関与していると考えられる。

3. *drs* ノックアウトマウスにおける発癌

drs が癌抑制遺伝子であることを直接証明するために、我々は *drs* KO マウスを作製した[15]。出生から半年の間に、*drs* KO マウスには野生型(WT)と比べて特に差は見られなかったが、生後 7-12 ヶ月を経過した *drs* KO マウスの約 30% (14/46) に、リンパ腫(6 例)をはじめ、肺腺がん(4 例)、肝がん(3 例)、肉腫(1 例)と、様々な種類の腫瘍が発生した。このとき、対照の WT マウスには生後 12 ヶ月までに一例の腫瘍も発生しなかった(0/23)。この結果から、*drs* の欠損が *in vivo* において悪性腫瘍の発生に癌抑制遺伝子として働くことを明らかにした。また *drs* KO マウスの 30% のみに癌が発生したことは、癌の発生には他の癌関連遺伝子の変化も必要であることが考えられるが、少なくとも *drs* の発現消失が多段階発癌の一ステップになりうると考えられた。

ノックアウト細胞による *drs* の機能解析

drs は多くの生物種で高度に保存されており、*drs* mRNA が大部分の正常細胞で発現していることから、細胞の持つ基本的な生理機能に関与していることが予想される。しかし *drs* KO マウスには、上述の発癌傾向を除いて目立った異常は認められず、*drs* KO 由来のマウス胎児線維芽細胞(MEF)も、通常の培養条件下においては細胞増殖や細胞老化などに WT MEF との有意な違いは認められなかった。我々は、これまでの研究から *drs* が発癌の比較的後期の、腫瘍の微小環境が悪化して生理的ストレスが高くなる時期に発現消失していることに着想して、さまざまな生理的ストレス負荷状態での WT MEF と *drs* KO MEF に生じる違いを検討した[16, 19]。

1. オートファジー成熟化の調節

我々は既に *drs* KO マウス肺腺癌から樹立した細胞株、LCT1 細胞が、低血清ストレス条件下で培養するとアポトーシスを起こすことと、*drs* 遺伝子を再導入した LCT1 細胞ではこのアポトーシスが抑制されることを明らかにし、*drs* が低血清ストレス応答に関与する可能性を見いだしていた[15]。そこで WT および *drs* KO MEF を用いて低血清ストレスに対する細胞応答を検討した。MEF においては、WT、KO の両細胞において、低血清によるアポトーシスの誘導に差は認められなかった。ところが低血清処理においては、オートファジーが誘導され、WT MEF と *drs* KO MEF ではこのオートファジー成熟化の過程に違いがあることを見い

だした[16]。

オートファジーは、細胞内に生じる二重の膜構造(オートファゴソーム/オートリソソーム)が細胞質中の異常タンパク質やオルガネラを非特異的に取り込んで分解する(バルク分解)生理応答であり、細胞内異物の除去やアミノ酸のリサイクルのために機能すると考えられている[17, 18]。オートファジーは定常状態の細胞でも部分的に起きているが、栄養飢餓や低血清ストレス、異常タンパク質の蓄積、あるいは一部の病原体による感染を受けたときに強く誘導される、細胞のストレス応答機構の一つである。オートファジーの進行は、(1)細胞質での隔離膜の出現、(2)オートファゴソームの形成、(3)オートリソソームの形成(オートファゴソームとリソソームの融合)、(4)オートリソソーム内容物の分解、というステップで進行するが、*drs* KO MEF では(2)から(3)への移行、すなわちオートリソソームの形成が WT MEF に比べて抑制されていることがわかった[16]。*drs* KOMEF に *drs* 遺伝子を再導入すると、この抑制は低減された。また、このとき *Drs* タンパク質じゃ小胞輸送タンパク質 Rab ファミリーの一つ、Rab24 と相互作用してオートファゴソーム上に共局在することを見いだした。以上の結果から、正常細胞においては *drs* が Rab24 と協同して、低血清ストレスにより誘導されるオートファジーの成熟化過程を調節することが明らかになった。このことは *drs* が、癌細胞と正常細胞のどちらにおいても、生理的ストレス応答に関与することを示している。またオートファジーは癌の進行過程においても誘導され、癌細胞の生死の調節にも関与することが報告されている[17, 18]。*drs* が生理的ストレスによって誘導されるオートファジーを調節することで、その癌抑制作用にも関与している可能性が示唆された。

2. 抗ウイルス作用

我々はまた、生理機能解析の過程で、*drs* がウイルス感染防御にも関与していることを明らかにした[19]。

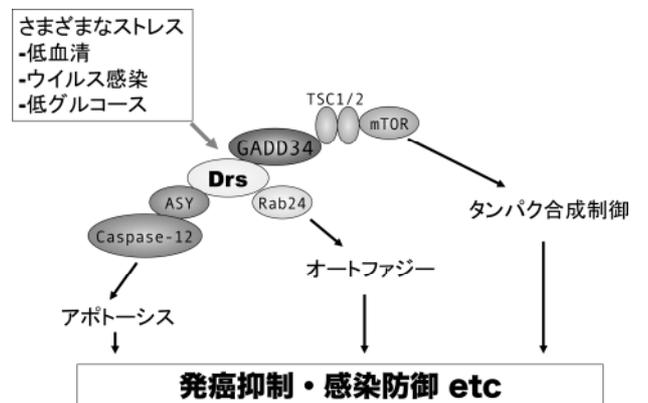


図 2. *Drs* が関与する生理機能ネットワーク

RNA ウイルスの一種である VSV(水疱性口内炎ウイルス) を感染させると、WT MEF と比べて *drs* KO MEF では、ウイルス増殖が亢進した。*drs* KO MEF に *drs* 遺伝子を再導入すると、この亢進は抑制されたことから、*drs* が VSV の増殖を抑制する抗ウイルス作用を持つことが明らかになった。DNA ウイルスである HSV-1 (単純ヘルペスウイルス 1 型) やレトロウイルスである MRSV (マウス Raus 肉腫ウイルス) でも *drs* KO MEF での増殖亢進が認められたことから、*drs* の抗ウイルス作用はタイプの異なる、種々のウイルスに有効であることが示された。

一般に、ウイルスが感染した細胞にはインターフェロン応答が誘導され、タンパク質合成が mRNA 転写レベルで全体的に抑制されて抗ウイルス状態になることが知られている。しかし *drs* KO MEF ではインターフェロン経路への影響は認められず、宿主細胞の mRNA 転写レベルが抑制される一方で、ウイルスのタンパク質合成が特異的に亢進していた。我々はさらにこのタンパク質合成調節のメカニズムについて検討し、mTOR 経路が関与していることを明らかにした。*Drs* は、ウイルス感染によって誘導されるストレス応答分子 GADD-34 [20] と協調して、mTOR 上流の調節分子 TSC2 のを脱リン酸化して mTOR 経路を抑制的に調節していることがわかった。*drs* KO MEF ではこの調節が失われることで mTOR が活性化して、その下流分子の S6 や eIF4E を介してタンパク質合成が亢進すると考えられた。

おわりに

我々が作製した *drs* KO マウスおよび KO 細胞を用いた実験によって、*drs* の生理機能 (図 2) と発癌におけるその役割 (図 3) が明らかになってきた。

細胞が低栄養や低血清などの環境ストレスやウイルス感染など、広い意味でのストレスに曝されると、アポトーシスやオートファジーなど細胞自体の生死を決定する生理的応答が惹起される。*drs* 遺伝子は、ASY, Rab24, GADD34 などの分子と相互作用して、アポトーシス、オートファジー、タンパク質合成抑制など、さまざまな生理的ストレス応答を調節する分子であると考えられる。

また、この生理的ストレス応答の調節は、*drs* の癌化抑制機能にも関与すると考えられる。固形腫瘍内部の微小環境は栄養源や酸素、増殖因子などが枯渇し、強い生理的ストレスが誘導された状態になっていることが知られている。癌が進行する初期の段階では、この生理的ストレスによって、前癌状態にある細胞の多くはアポトーシス等によって死滅し、このことが生体の癌化抑制機構の一端を担っていると考えられている。

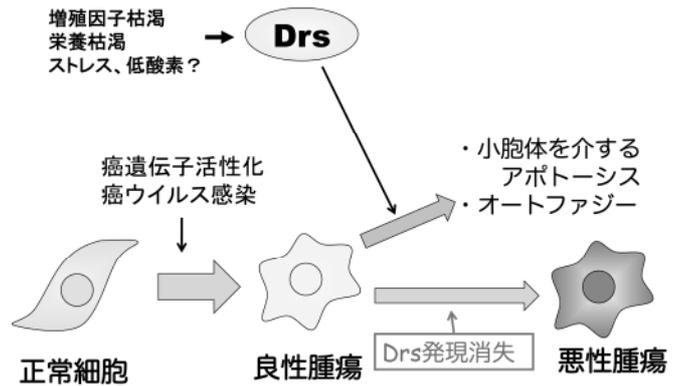


図 3. *Drs* による癌化抑制機構のモデル

癌細胞の悪性化に伴って *drs* 遺伝子の発現が消失すると、これらの生理的ストレス応答が生じにくく変化し、その結果生き残った、より悪性度の高い癌細胞が増殖することで、癌の悪性化が進行すると考えられた。

drs は癌抑制遺伝子であるだけでなく、ウイルス感染に対しても防御的に働くことから、より広い意味での「生体防御分子」として機能している可能性がある。我々が作製した *drs* KO マウスおよび KO 細胞は、*drs* 遺伝子の機能を明らかにする上で重要なツールであるとともに、その研究成果は、発癌やウイルス感染に対する生体防御機構を明らかにする上で有用なものになることが期待される。

文献

- [1] Pan J, Nakanishi K, Yutsudo M, Inoue H, Li Q, Oka K, Yoshioka N, Hakura A. Isolation of a novel gene down-regulated by v-src. FEBS Lett. 383:21-25, 1996.
- [2] Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. Trends Genet. 9:138-141, 1993.
- [3] Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell 87:159-170, 1996.
- [4] Inoue H, Tavoloni N, Hanafusa H. Suppression of v-Src transformation in primary rat embryo fibroblast. Oncogene. 11:231-238, 1995.
- [5] Bommer GT, Jäger C, Dürr EM, Baehs S, Eichhorst ST, Brabletz T, Hu G, Fröhlich T, Arnold G, Kress DC, Göke B, Fearon ER, Kolligs FT. DRO1, a gene down-regulated by oncogenes, mediates growth inhibition in colon and pancreatic cancer cells. J Biol Chem. 280:7962-7975, 2005.
- [6] Kawai T, Suzuki Y, Yamashita A, Inoue H. Isolation of a novel mouse variant of the *drs* tumor suppressor gene. Cancer Lett. 183:79-86, 2002.
- [7] Meindl A, Carvalho MR, Herrmann K, Lorenz B, Achatz H, Lorenz B, Apfelstedt-Sylla E, Wittwer B, Ross M, Meitinger T. A gene (SRPX) encoding a sushi-repeat-containing protein is deleted in patients with X-linked retinitis pigmentosa. Hum Mol Genet. 4:2339-2346, 1995.
- [8] Yamashita A, Hakura A, Inoue H. Suppression of anchorage-independent growth of human cancer cell lines by the *drs* gene. Oncogene 18:4777-4787,

1999.

- [9] Shimakage M, Kawahara K, Kikkawa N, Sasagawa T, Yutsudo M, Inoue H. Downregulation of drs mRNA in human colon adenocarcinomas. *Int. J. Cancer* 87:5-11, 2000.
- [10] Shimakage M, Takami K, Kodama K, Mano M, Yutsudo M, Inoue H. Expression of drs mRNA in human lung adenocarcinomas. *Hum. Pathol.* 33:615-619, 2002.
- [11] Kim CJ, Shimakage M, Kushima R, Mukaisho K, Shinka T, Okada Y, Inoue H. Down-regulation of drs mRNA in human prostate carcinomas. *Hum. Pathol.* 34:654-657, 2003.
- [12] Shimakage M, Inoue N, Oshima K, Kawahara K, Yamamoto N, Oka T, Tambe Y, Yasui K, Matsumoto K, Yutsudo M, Inoue H. Down-regulation of drs mRNA is associated with the progression of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int. J. Oncol.* 30:1343-1348, 2007.
- [13] Inoue H, Pan J, Hakura A. Suppression of v-Src transformation by the drs gene, *J. Virol.* 72: 2532-2537, 1998.
- [14] Tambe Y, Isono T, Haraguchi S, Yoshioka-Yamashita A, Yutsudo M, Inoue H. A novel apoptotic pathway induced by the drs tumor suppressor gene. *Oncogene* 23:2977-2987, 2004.
- [15] Tambe Y, Yoshioka-Yamashita A, Mukaisho K, Haraguchi S, Chano T, Isono T, Kawai T, Suzuki Y, Kushima R, Hattori T, Goto M, Yamada S, Kiso M, Saga Y, Inoue H. Tumor prone phenotype of mice deficient in a novel apoptosis-inducing gene, drs, *Carcinogenesis* 28:777-784, 2007.
- [16] Tambe Y, Yamamoto A, Isono T, Chano T, Fukuda M, Inoue H. The drs tumor suppressor is involved in the maturation process of autophagy induced by low serum. *Cancer Lett.* 283:74-83, 2009.
- [17] Mizushima N. Autophagy: process and function, *Genes Dev.* 21:2861-2873, 2007.
- [18] Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:931-937, 2007.
- [19] Tambe Y, Okuyama N, Nakagawa T, Muramoto A, Hasebe M, Chano T, Inoue H. Suppression of viral replication by drs tumor suppressor via mTOR dependent pathway. *Cancer Lett.* 314:82-91, 2012.
- [20] Minami K, Tambe Y, Watanabe R, Isono T, Haneda M, Isobe K, Kobayashi T, Hino O, Okabe H, Chano T, Inoue H. Suppression of viral replication by stress-inducible GADD34 protein via the mammalian serine/threonine protein kinase mTOR pathway. *J Virol.* 81:11106-11115, 2007