

腫瘍抑制分子 C-RASSF 蛋白

畑 裕 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 病態代謝解析学分野, 脳統合機能研究センター

要約: ヒトゲノムには, 低分子量 GTP 結合蛋白 Ras が結合すると想定されるアミノ酸配列 (RA ドメイン) をもつ蛋白をコードする遺伝子が 10 個あり, RASSF と総称されている. RA ドメインを分子中央にもち, C 末端に SARAH ドメインと呼ばれる蛋白相互作用領域をもつ RASSF1~6 を C-RASSF, RA ドメインを N 末端にもち, SARAH ドメインをもたない RASSF7~10 を N-RASSF と呼ぶ. C-RASSF は, ヒトがんでしばしばプロモーターの高メチル化によって発現が抑制されるので, 腫瘍抑制分子と考えられている. 本稿では, C-RASSF がどのような分子機構を使って腫瘍抑制分子として働くのか, がん以外の疾病の病態にも関係するのか, がん治療の分子標的になりうるかという問題に関連して, これまでにわかっている知見をまとめ, 今後, 解明すべき点を議論する.

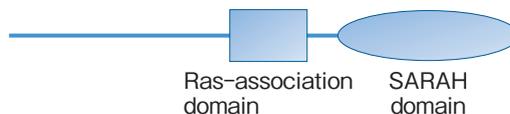
Key words : がん, 細胞死, 細胞周期, シグナル伝達, 腫瘍抑制分子

I. はじめに

ヒトゲノムには RASSF という ID を振られた遺伝子が 10 ある¹⁻⁴⁾ (図 1). RASSF とは Ras-association family member の意であり, 低分子量 GTP 結合蛋白 Ras が associate すると想定されるドメイン (RA) をもつ蛋白をコードする遺伝子が RASSF1~10 まで登録されている. このうち RASSF1~6 の 6 つは RA を分子中央部にもち, C 末端に SARAH ドメインという配列を共通してもつ. RASSF7~10 の 4 つは RA を N 末端にもち, SARAH ドメインをもたない. 両者は, 性状機能が異なり, 前者は C-RASSF, 後者は N-RASSF と分けて論じられる. C-RASSF には腫瘍抑制遺伝子としてよく知られる RASSF1A が含まれている. RASSF2~6 も, もっぱら腫瘍抑制遺伝子として研究がすすめられている. 筆者の教室は RASSF3 と RASSF6 に関する論文を発表してきた. 脳神経外科学教室の工藤巧巳氏 (医学 50・平 14 卒, 現在はドイツ留学中) が大学院博士課程に在籍当時, 筆者の教室で行った RASSF3 に関する研究を発表した論文は, 第 27 回お茶の水医科同窓会研究奨励賞に

連絡先: 畑 裕 yuhammch@tmd.ac.jp

C-RASSF : RASSF1~RASSF6



N-RASSF : RASSF7~RASSF10



図 1. RASSF の概念図

C-RASSF に分類される RASSF1~6 の 6 つは, Ras-association domain が分子中央部にあり, C 末端に SARAH ドメインをもつ. Salvador, RASSF, Hippo (mammalian Ste20-like kinases [MST1/2]) の 3 分子はいずれもこのドメインをもつので, 三つの分子名から SARAH と命名された. SARAH ドメインはホモ・オリゴマーを形成するほか, RASSF と Hippo (MST1/2) の SARAH ドメイン, Salvador と Hippo (MST1/2) の SARAH ドメインはヘテロ・オリゴマーも形成する. しかし, Salvador と RASSF の SARAH ドメインは結合しない. N-RASSF に属する RASSF7~10 には SARAH ドメインがない.

選ばれた⁵⁾. 筆者の教室には 20 名の学生, 職員が所属しているが, うち 4 名が RASSF の研究に従事している. 1998 年の RASSF5 に関する論文を皮切りに多くの論文が発表され, なかでも RASSF1A に関する研究論文数は 1,000 を超えている. 今回, 「お茶の水

醫學雑誌」に RASSF を紹介する記事の執筆の機会をいただいた。RASSF 研究全体に過不足なく目配りしようとする、話が複雑にすぎるので、ここでは、筆者の教室で行われている RASSF 研究を中心に論じる。RASSF 全体については文献欄にあげる英文総説を参照されたい¹⁻⁴⁾。学術的厳密性よりも、わかりやすさを旨として、砕けたスタイルをとり、読み物風になっている点もご了承いただきたい。

II. 筆者らは、どのような経緯で RASSF の研究を始めたのか？

C-RASSF のうち最初にみつかったのは RASSF5 である⁶⁾。活性型 Ras に特異的に結合する分子として酵母ツーハイブリッド法により同定され、Novel Ras effector (Nore) 1 と命名された。今も、RASSF5 よりは Nore1 の呼称が広く使われている。RASSF5 にはいくつかのスプライシング・バリエントがある。その一つは Ras とまったく同じエフェクター・ドメイン配列をもつ低分子量 GTP 結合蛋白 Rap1 に結合する分子として同定され、RAP1 と命名され、Tリンパ球における lymphocyte-function-associated antigen 1 (LFA-1) の局在制御にかかわることが報告されている⁷⁾。いずれにおいても、RASSF5 は、Ras ないし Rap1 シグナルの標的分子とみなされている。RASSF1A はヒト染色体 3 番短腕にあり、複数のスプライシング・バリエントがあるが、なかでも RASSF1A が有名である。RASSF1A は、ヒトの小細胞性肺がんの 90%、非小細胞性肺がんの 50~80% で、プロモーター領域の CpG アイランドの高メチル化により発現が抑制される遺伝子として 2000 年に報告されたが、その後も、多くのがんで発現が抑制されることが報告され、腫瘍抑制分子として位置づけられている⁸⁾。RASSF2 と RASSF4 は、RASSF1、RASSF5 と類似の配列をもつ分子として解析され、試験管内でがん細胞に対して抑制的に働くことが確認された^{9,10)}。ヒトゲノムにはそのほかに RASSF3 と RASSF6 もあることは知られていたが、両者を直接解析した報告は 2005 年前後には存在しなかった。

筆者らは、2003 年ごろまで、シグナル伝達の場合としての細胞間結合に関心をもち、その分子構築に関する研究を行っていた。細胞間結合の分子構築が保たれないと、神経細胞であれば神経伝達が攪乱されて脳の高次機能障害が起こり、上皮細胞であれば細胞極性の異常がもたらされて発がんにいたる。細胞同士の結合を担う主体は細胞接着分子であるが、細胞接着分子に細胞骨格の裏打ちが与えられてはじめて十分な機械的強度が得られる。また、細胞間の距離が近接する場所

に受容体が位置づけられることにより、細胞間の情報伝達が促進される。さらに、シグナル伝達分子が接着分子、受容体の近傍に集まると、接着や受容体へのリガンド結合に対応して、すみやかに細胞内に情報が伝わる。すなわち、接着分子、受容体、細胞骨格、シグナル伝達分子の集積と正しい空間的配置が細胞間結合の機能には重要である。このような細胞間結合の分子集積において中核的役割を担うのは、複数の蛋白分子間相互領域をもち、接着分子、受容体の細胞質内領域に結合して、これらを束ね、細胞骨格、シグナル伝達分子をつなぎとめる役割を果たす膜裏打ち蛋白である。Membrane-associated guanylate kinase with an inverted arrangement of protein-protein interaction domains (MAGI) ファミリー蛋白は、そのような膜裏打ち蛋白の一つである¹¹⁾。MAGI には MAGI1~3 の三つがある。筆者らは脳の興奮性シナプスで NMDA 型グルタミン酸受容体と接着分子 neuroligin を束ねる分子として MAGI2 をみつけ (筆者らは S-SCAM と命名した)、その後、抑制性シナプスでも neuroligin と β -dystroglycan を裏打ちすることを見出した¹²⁻¹⁴⁾。抑制性シナプスにおける MAGI2 については、脳神経外科教室の壽美田一貴氏 (医学 49・平 13 卒、米国留学から戻り現在、脳外科で医局長を務めている) が研究し 2007 年に発表している。MAGI1 は脳以外の臓器によく発現している。ノザンプロットのレベルでは MAGI2 の mRNA は脳以外の組織で検出されなかったため、筆者らは、MAGI1 を上皮細胞型、MAGI2 を神経細胞型アイソフォームと仕分けて研究を行った。実際は、MAGI2 は神経細胞以外にも発現し、とくに腎臓スリット膜では接着分子 nephrin の裏打ち蛋白として非常に重要な役割を果たしている¹¹⁾。筆者らは、腎臓スリット膜に発現しているのは MAGI1 であるという視点で研究を行い、MAGI1 に結合する蛋白を探索し、腎臓に発現する分子として RASSF6 を同定した¹⁵⁾。

III. RASSF は、どのようにして腫瘍抑制的に働くのか？

C-RASSF の中では RASSF1A と RASSF5 の研究が先行し、研究のプロトタイプが形作られた。まず注目されたのは、活性型 Ras の発現によって起こる細胞死に RASSF1A、RASSF5 が寄与するという現象である^{16,17)}。最近では活性型 Ras による細胞老化に RASSF5 が関係することも報告されている¹⁸⁾。活性型 Ras は細胞増殖を促進する印象が強いが、活性型 Ras のアウトプットとしては、細胞死や細胞老化もあり、RASSF1A、RASSF5 が Ras のシグナルを受けて

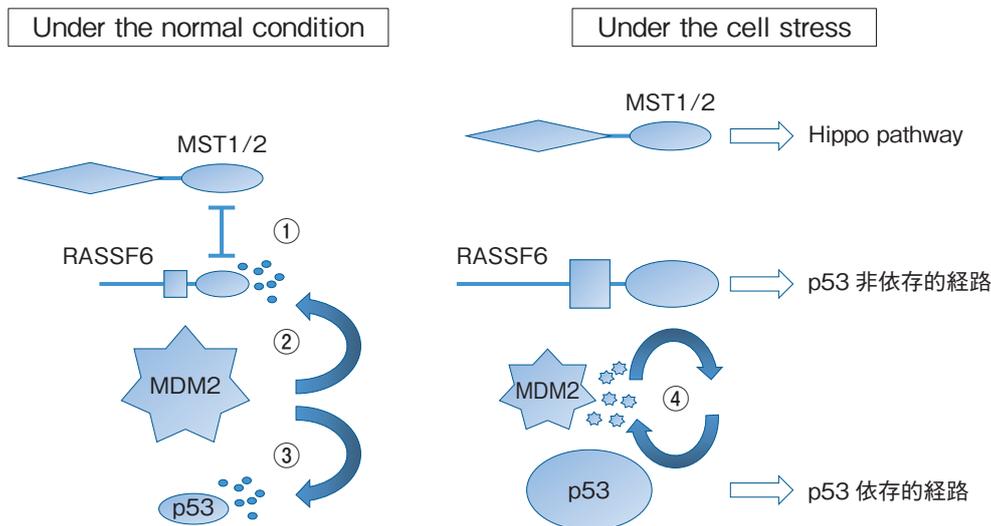


図2. C-RASSFによる腫瘍抑制作用の概念図

RASSF6を代表例としてC-RASSFとp53, Hippo pathwayの関係を表記する。

- ①：定常状態では、RASSF6はmammalian Ste20-like kinases (MST1/2)と複合体を形成し、相互に抑制し合っている。
- ②, ③：MDM2はRASSF6とp53を分解し、それらの発現量を抑えている。細胞がDNA損傷などのストレスに曝露されると、MST1/2とRASSF6は乖離し、MST1/2の活性化によりHippo pathwayがオンになる (Hippo pathwayについては図3を参照)。
- ④：MDM2は自己分解に傾き、RASSF6とp53の発現量が増える。MDM2がRASSF6, p53の分解よりも自己分解に傾斜する機構はまだ不明である。結果としてHippo pathway, p53に依存して細胞周期はとまり、細胞死が起こりやすくなる。RASSF6にはp53に依存せずに細胞周期, 細胞死を制御する機能もあるが、その詳細は不明である。

細胞死, 細胞老化を起こすというモデルが想定される。このモデルに従うと、Rasに変異が入り腫瘍源性に作用するとき、RASSF1A, RASSF5がRas変異をもつ細胞を除去して、ブレーキ役を演じると理解される。もっとも、ヒト膵臓がんを対象とする解析からは、RASSF1Aのプロモーターの高メチル化によるRASSF1Aの発現抑制は、K-Rasの変異のある膵がんでは少なく、K-Rasの変異のない膵がんが多いという結果が得られているので、K-Rasの変異があってもRASSFが健在ならば発がんにブレーキがかかるという図式は正しくないかもしれない¹⁹⁾。

ヒトがん症例を対象とするRASSF1Aの発現抑制の報告例は膨大な数にのぼり、がんの進展度, 悪性度とも相関が認められるので、腫瘍抑制分子としての機能には疑う余地がない。では、どのような分子機構で腫瘍抑制的に機能するのであろうか？ 最初に示されたのは、RASSF1Aが微小管に間接的に結合して微小管の安定化を招くというメカニズムであった^{20~22)}。Cdc20にRASSF1Aが結合してanaphase-promoting complexの活性を抑え、細胞周期をとめるというメカニズムも報告された²³⁾。しかし、どちらもRASSF1A特有のメカニズムのようである。C-RASSFの中で微小管に結合するのはRASSF1Aだけであるし、Cdc20との結合もRASSF1AのN末端の配列に依

し、同じRASSF1であってもRASSF1Cは結合しない。これに対して、RASSF1AがDAXX, HAUSPによるMDM2の安定化を阻害し、MDM2の自己分解を促進し、結果、p53の発現量が増え、G1/Sアレストを引き起こすというメカニズムは、DAXX, HAUSPの関与は別として、MDM2を抑制しp53を安定化するというところは、C-RASSFに共通の作用機序である可能性が高い²⁴⁾ (図2)。筆者らは、紫外線や抗がん剤によるDNA損傷に応答して引き起こされるp53依存性のG1/SアレストにRASSF3, RASSF6がかかわり、RASSF3とRASSF6がMDM2の自己分解を高めp53の安定化を招くことを明らかにしている^{5, 25)}。RASSF2とRASSF4については、まだ報告がないが、RASSF5もMDM2に結合するとされているので、MDM2の抑制は、おそらくC-RASSF共通の機構と思われる²⁶⁾。

IV. RASSFとHippo pathway

C-RASSFに共通するもう一つの性状として、mammalian Ste20-like kinases (MST1/2)との相互作用がある。MST1/2は蛋白リン酸化酵素である²⁷⁾ (図2)。MST1/2にもC-RASSFと同じくSARAHドメインがあり、SARAHドメイン同士のオリゴマー形成

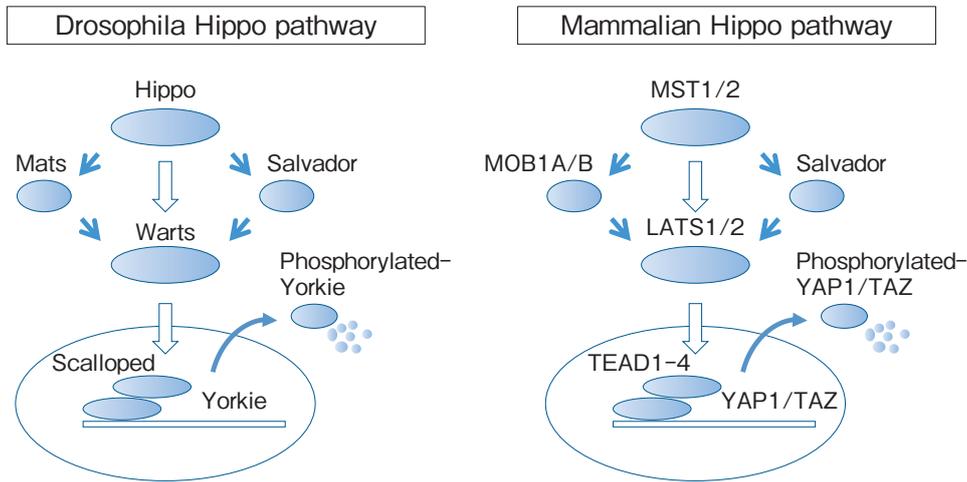


図3. ショウジョウバエと哺乳動物の Hippo pathway

Hippo と Warts は蛋白リン酸化酵素である。Hippo は Warts をリン酸化し活性化する。Mats, Salvador は両者をつなぐアダプター、活性化分子として働く。Warts は Yorkie をリン酸化する。Yorkie はそれ自体には DNA 結合配列がないが、転写因子 Scalloped と共役し、細胞増殖を促進し、細胞死を抑制する遺伝子の転写を亢進させる。Warts によってリン酸化されると Yorkie は細胞核から細胞質に移行して分解される。すなわち、Hippo-Warts が活性化すると Yorkie が抑制される。哺乳動物でもこの基本的枠組みは保存されているが、Hippo に対して mammalian Ste20-like kinases (MST1/2), Warts に対して large tumor suppressor kinases (LATS1/2), Mats に対しては MOB1A/B, Yorkie に YAP1 と TAZ, Scalloped に 4 つの TEAD が対応し複雑化している。Hippo pathway が機能不全に陥ると、Yorkie ないし、YAP1, TAZ による遺伝子転写が暴走する結果、細胞の異常増殖が起こる。ここにはきわめて単純化した図式を示した。現在では、Hippo pathway を構成する複雑な蛋白ネットワークの存在が知られている。

により C-RASSF と MST1/2 は相互作用する。MST1/2 のショウジョウバエのホモログは Hippo と呼ばれる。Hippo が働かないと臓器の異常増殖が起こる。Hippo という名前は、Hippo 変異体の表現型がカバ (Hippotamus) を連想させることに由来している。Salvador, Mats, Warts という遺伝子の変異体も Hippo 変異体と同じ表現型を示す。Warts も蛋白リン酸化酵素をコードする。Warts は Hippo によってリン酸化されると活性化する。Salvador, Mats 蛋白は Hippo と Warts をつなぐアダプター分子である。すなわち、Hippo, Salvador, Mats, Warts の 4 分子は細胞増殖を制御するシグナル系を構成するとみなされる。このシグナル系が Hippo を代表者として、Hippo pathway と呼ばれるようになった (図3)。その後、Warts に結合する分子として Yorkie が発見され、Warts の基質であることが判明した。Yorkie は転写共役因子で、転写因子 Scalloped と共役して細胞増殖を促進し、細胞死を抑制する遺伝子の転写を高める。Yorkie は Warts によってリン酸化されると、細胞核から細胞質に移行して蛋白分解される。つまり Hippo pathway は Yorkie を負に制御する。ショウジョウバエの Hippo pathway の構成分子はヒトでも保存されている。ただし、Hippo に対して MST1/2, Warts に対しては large tumor suppressor kinases (LATS)

1/2, Yorkie には、yes-associated protein 1 (YAP1) と transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ), Scalloped には TEA domain family に属する 4 つの TEAD1~4 が対応するというように複雑化している。Hippo pathway がオフのときは、YAP1 と TAZ が細胞核にあって遺伝子転写を高める。細胞密度が高まり細胞接着が成熟すると、あるいは DNA 損傷を起こすような刺激が入ると Hippo pathway はオンになり、YAP1 と TAZ が抑制され、細胞増殖がとまり、細胞死が起こる。Hippo pathway が正常に機能しないと、接触抑制がかからなくなり細胞が異常増殖する。あるいは、DNA 損傷時にチェックポイントが働かず DNA 修復されないまま細胞が分裂して腫瘍化する。ヒトがんでは、しばしば Hippo pathway の機能不全が認められる。Hippo pathway に異常があり YAP1, TAZ の活性が高いがんは、転移浸潤しやすく薬剤抵抗性を示し悪性化する。Hippo pathway について詳述する余裕はないので、文献欄の総説をお読みいただきたいが、代表的な腫瘍抑制シグナルで、がん治療の新しい標的として注目されていることを強調したい²⁸⁾。

ヒトの 6 個の C-RASSF に対応して、ショウジョウバエには一つだけ C-RASSF (dRASSF) がある。dRASSF と Hippo も SARAH ドメインを介して結合

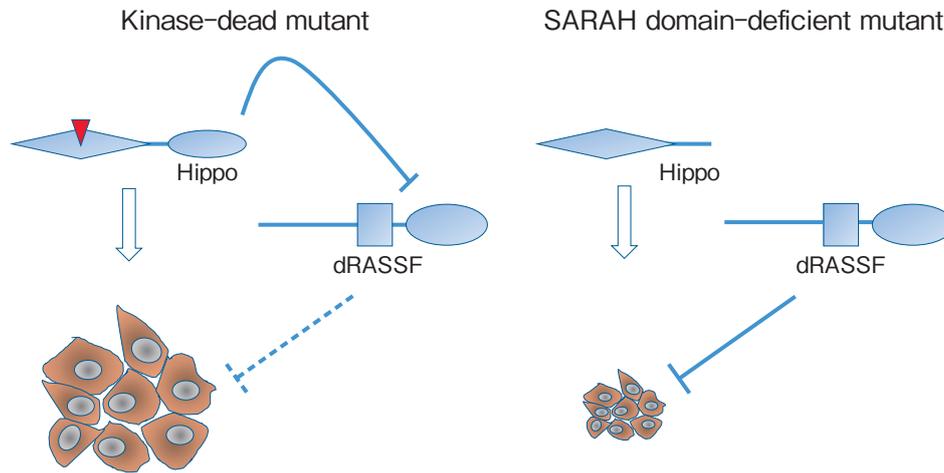


図4. ショウジョウバエにおける dRASSF と Hippo 変異の関係についての説明図

図2の①の MST1/2 と RASSF6 と同じように、Hippo と dRASSF が SARAH ドメインを介して複合体をつくり、dRASSF は Hippo の活性を抑制し、Hippo は dRASSF による細胞周期、細胞死制御を抑制すると想定すると、キナーゼ活性を失った Hippo 変異による細胞の腫瘍性増殖は dRASSF によっても抑制されないが、SARAH ドメインを欠損している Hippo 変異による腫瘍性増殖は dRASSF によって抑制される現象が説明される。

する。Salvador にも SARHA ドメインがあり、Hippo に結合する。dRASSF と Salvador は Hippo の SARAH ドメインをめぐって競合関係にあり、dRASSF は Salvador と Hippo の相互作用を阻害し、Hippo pathway を抑制的に制御するという趣旨の論文が2006年に発表された²⁹⁾。そのまま受け取ると dRASSF は腫瘍抑制シグナル Hippo pathway を抑制し、腫瘍形成的に働くことと解釈される。その一方で、Ras 変異体による腫瘍形成には dRASSF は抑制的に作用し、Hippo 変異体による腫瘍性増殖にも抑制的に働くことが示された。したがって、dRASSF もヒトの C-RASSF 同様に腫瘍抑制分子とみなされるのであるが、dRASSF が Salvador と Hippo の相互作用を阻害し、Hippo pathway を抑制するという知見が整合しない。しかも、Hippo 変異体の中でも、SARAH ドメインを欠損する変異体による腫瘍性増殖は抑制するのに、キナーゼ活性をもたない Hippo 変異体を引き起こす腫瘍性増殖は抑制しないという不思議な現象も観察され、dRASSF は一体、Hippo pathway とどのような関係にあるのかが議論的になった。ヒトの MST2 については、Raf-1 が血清刺激下で MST2 を阻害して細胞死を抑制することが知られていたが、続いて RASSF1A が Raf-1 による MST2 の抑制を解除して、Hippo pathway をオンにし、細胞死を誘導するという報告がなされた³⁰⁾。RASSF1A が Hippo pathway を介して腫瘍抑制作用を発揮することになり納得しやすいが、dRASSF とは働き方がまったく異なっている。そのため、C-RASSF は種を超えて保存されながら、機能は異なるのかという新たな疑問がつけ加わっ

た。筆者らが RASSF6 を研究対象にし始めたのは、ちょうどそのころであった。

筆者らは MAGI1 結合分子として RASSF6 を同定した後、引き続き RASSF6 と相互作用する分子を探索し、MST2 が RASSF6 の結合分子であることを確認した³¹⁾。その過程で MST2 が RASSF6 による細胞死を見事にとめる事実気がついた。RASSF6 は6個の C-RASSF の中でも細胞死誘導能が高く、各種の細胞に人為的に過剰発現させると細胞はたちまち死んでしまう。ところが MST2 を同時発現すると細胞がまったく死ななくなる。MST1 でも同様であった。その一方、試験管内の MST1/2 のキナーゼアッセイに RASSF6 を共存させると、MST1/2 の活性が抑制されることも見出した。後者の観察は、ショウジョウバエにおいて dRASSF が Hippo の活性を抑制する事実と符合する。どうやら、RASSF6 と MST1/2 は複合体を形成して、たがいに抑制し合っているらしいとわかった(図2)。RASSF6 は MST1/2 の SARAH ドメインに結合して、MST1/2 同士の会合を阻止し、MST1/2 の活性化に必要な自己リン酸化を抑制する。その結果、MST1/2 は不活性状態におかれ Hippo pathway はオフの状態に保たれる。しかし、DNA 傷害などの刺激が入ると、RASSF6 と MST1/2 は乖離する。MST1/2 は RASSF6 による抑制から解放されて活性化し Hippo pathway がオンになる。RASSF6 は MST1/2 による抑制から解放されて、MDM2-p53 の系を介して細胞死を起こす。このモデルに即して考えると、ショウジョウバエの dRASSF が、SARAH ドメインを欠損する Hippo 変異体による腫瘍性増殖

を抑制するのに、キナーゼ活性をもたない Hippo 変異体による腫瘍性増殖を抑制しないのは、後者では dRASSF による細胞死誘導が Hippo によって阻害されるが、前者では dRASSF が Hippo による阻害を受けないからであると説明がつく (図 4)。この考えはショウジョウバエで十分に検証されているわけでない点は申し添えなければならないが、RASSF6 は Hippo pathway と並行な関係にあつて、Hippo pathway が活性化し腫瘍抑制機能を発揮する場面では、RASSF6 を介する腫瘍抑制機構も作動して、両者が協働するという図式が想定され、この図式はショウジョウバエでも保存されている可能性が高いと、筆者らは考えている。ただし、RASSF1A は MST2 を Raf-1 による阻害から解放するほか、MST1/2 の脱リン酸化を阻止して活性を維持し、RASSF2 は MST1 の活性を高め MST2 を安定化するとされているので、すべての C-RASSF が Hippo pathway と並行関係にあるわけではなく、一部は Hippo pathway を上流から制御し活性化する様式で働いているかもしれない^{32~34)}。

V. C-RASSF の多様性と Ras との関係

Hippo pathway とのかかわり方が均一でないほかにも、C-RASSF の中には多様性がある。細胞内局在が異なる。RASSF1A は微小管に沿って分布する。RASSF5 は単独では細胞核に集積しやすいが、Ras の活性型と同時発現させると、著明に形質膜に移行する。RASSF2, 3, 4, 6 の細胞内局在の特徴は明瞭でないが、RASSF6 の一部は一次線毛やセントロソームに認められる。当然、それぞれに固有の機能が予測され、多様性が想定される。Ras 蛋白との結合の親和性にも大きな差がある。RASSF5 は強く結合するが、それ以外の C-RASSF の結合は弱く、RASSF1A においては、そもそも Ras 蛋白と直接結合するのかが議論されている³⁵⁾。

筆者らが主に扱っている RASSF3 と RASSF6 では、RASSF6 のほうが Ras と結合しやすいようであるが、RASSF5 と Ras の結合に比べると弱い。しかし、Ras のシグナルの一部を担う点は C-RASSF に共通する特性であると、筆者らは考えている。その根拠は線虫の C-RASSF にある³⁶⁾。線虫に Ras 活性型変異体を発現させると、陰門形成に異常が起こるが、線虫の C-RASSF の発現を抑制すると、その表現型が失われる。哺乳動物においては細胞死、細胞老化が出力であるのに対して、線虫では陰門形成異常が出力となり、大きな隔たりがあるが、Ras シグナルの下流に C-RASSF が位置する枠組みは、線虫でも保たれている。

しかし、線虫の Hippo シグナルと C-RASSF が関係するという知見は得られていない。C-RASSF の元来の役割は Ras シグナルの標的分子であり、その先がどこにつながるかは種間で相違があり、ショウジョウバエや哺乳動物における Hippo シグナルとのつながりは、進化の過程で獲得されたものと推定される。

VI. がん以外の疾病と RASSF

ここまでは、もっぱら、がんとの関係で C-RASSF について紹介してきた。RASSF1A を筆頭に、どの C-RASSF もがんで発現が低下し、その低下は悪性度や進行度、臨床予後の悪化と相関するので、C-RASSF がヒトがんの病態に重要であることは議論の余地はない。RASSF6 は、小児リンパ性白血病、胃がん、膵がん、鼻咽頭がん、悪性黒色腫で発現が低下し、RASSF3 は乳がん、肺がんで発現が低下している^{37~43)}。C-RASSF は明らかにヒトがんの病態に関係している。

では、C-RASSF は、がん以外の疾病の病態にもかかわりをもつのだろうか？ 現時点では実験データをもとに推論できるにすぎないが、炎症にかかわる可能性があげられる。RASSF1A のノックアウトマウスは炎症性腸炎を起こしやすい⁴⁴⁾。RASSF1A は toll-like receptor の下流の NF κ のシグナルを抑制するので、RASSF1A の発現が低下すると、NF κ のシグナルが増強する。RASSF6 も NF κ のシグナルを抑制することが知られているので、C-RASSF の機能低下は、がんのみならず、炎症性疾患の病態を増強するかもしれない。心臓の線維芽細胞で RASSF1A の発現が低下すると tumor necrosis factor α (TNF α) の分泌が高まり、心筋の肥大につながる⁴⁵⁾。一方、心筋細胞内での TNF α のシグナル伝達にも RASSF1A が関与し、実験的に心肥大を起こしたマウスの心臓や、心不全を起こしているヒトの心臓では RASSF1A の発現が低下する⁴⁶⁾。RASSF1A の機能低下は心不全の病態の進行に関係しているかもしれない。

C-RASSF の機能を抑制するほうが有利な場面も想定される。筆者らは、高浸透圧にさらされた腎臓尿管上皮細胞の細胞死に RASSF6 がかわる可能性を報告している⁴⁷⁾。がん治療では Hippo pathway の機能を保ち、YAP1, TAZ の活性を阻害すると、がんの悪性化が防がれ、臨床予後の改善につながると期待されている⁴⁸⁾。しかし、腸炎や皮膚損傷、肝切除、心筋障害後の組織修復が求められる場面では YAP1 の活性は高いほうが有利とされる。TAZ の活性は間葉組織幹細胞の筋細胞、骨細胞への分化を促進し、脂

筋細胞への分化を抑制するので、TAZの活性化は、筋萎縮や骨粗鬆症、肥満の予防、治療に有益と予測されている。ヒト疾病の治療標的としてHippo pathwayを論じるときは、その二面性がしばしば話題とされる。C-RASSFについても同じ傾向がありそうである。がん治療の視点ではC-RASSFの活性が高いほうが望ましい。プロモーター領域の高メチル化によって発現抑制されているC-RASSFの発現を回復すると、がん治療成績の向上に貢献するかもしれない。他方、虚血、外傷などで組織に損傷が起こる状況では、C-RASSFの機能を抑えて、組織損傷を最小化する介入が意味をもつかもしい。

VII. おわりに

腫瘍抑制分子として知られるC-RASSFについて、研究がすすんでいるRASSF1A, RASSF5を引き合いに出しながら、筆者らが主として扱っているRASSF3, RASSF6について紹介してきた。解明すべき点は多く残されている。RASSF6の腫瘍抑制作用の一端がp53を介していることは間違いないが、p53だけに依存しているわけではない。p53を欠損する細胞にRASSF6を発現させても、細胞死は起こり、細胞周期はとまる。一体、どのような分子機構が働いているのかは、まだ明らかでない。p53に変異があるがんは多いので、p53が働かない状態でも腫瘍抑制を達成する機構の解明は意味が深い。筆者らは、MAGIに結合する分子としてRASSF6に遭遇し研究を始めた。MAGIにはPDZドメインという蛋白相互作用領域があり、RASSF6はPDZドメインに結合するモチーフをもっている。ほかのC-RASSFには、このモチーフがないので、C-RASSFの中でRASSF6だけがMAGIに結合すると考えられる。ここにもC-RASSFの多様性がうかがわれるが、MAGIとRASSF6の相互作用の意味が、いまだにわからない。MAGIにはPTENを安定化させる働きがあり腫瘍抑制的に働くので、RASSF6とMAGIの相互作用にも意味があると予測され、多くの検討を重ねているが解決できていない。RASSF6一つとっても未解明の問題が多く残されている。C-RASSF研究は基礎研究としておもしろく、ヒト疾病との関連も保証されている。しかし、なにかにつけ研究の出口を求められがちな今日、“おもしろい”や“臨床に関係している”では足りず、もう少し具体的に“役に立つか”を問わなければならない。C-RASSF研究は役に立つのであろうか？

C-RASSFは、DNA損傷時に細胞周期をとめてDNA修復のための待機時間をつくり出す。あるいは、

細胞を死に導く。Rasのシグナルが強くとると、細胞死や細胞老化を招いて、細胞増殖の暴走を未然に防ぐ。プロモーター領域の高メチル化によって発現が抑制されると、安全弁として働かなくなる。その結果、がん化する。ざっくりとした説明ながら、がんの病態におけるC-RASSFの位置づけは、このように説明できる。しかし、問題は、C-RASSFが治療標的になるかである。Rasに変異をもつがんは多く、Rasは発がんに重要であるが、Rasそのものを標的とする治療は実現していない。C-RASSFを標的とする治療法は開発できるだろうか？有効だろうか？ヒトがんにおけるC-RASSFの異常は、Ras変異やp53の変異とは違い、配列異常でなく発現抑制である。その意味では、発現を回復するだけで、治療になりそうにも思われるが、そう考えるのは、楽観的すぎるかもしれない。Ras変異など主要ながん遺伝子の変異に加えてC-RASSFの発現が低下し、一度、暴走が始まってしまったがんにおいて、C-RASSFの発現を後から回復しても、すでに多種多様の変異が集積していて、効果は得にくいのではないかと懸念される。しかし、もしRas変異のようなドライバーとなる変異が起こる前にC-RASSFの発現低下が起こるならば、あらかじめ、C-RASSFの発現低下を予防、ないしは発現回復する治療的なアプローチが意味をもつ。老化やがんの母地となる慢性炎症の状態でC-RASSFの発現が低下するかを調べる研究が重要な情報を与えてくれそうである。あるいは、がんの進展に伴ってC-RASSFの発現が低下し、がんの悪性化が起こる場合であっても、もし、C-RASSFの発現が維持されている“初期”病変を検出できるならば、治療的介入の余地が生じるかもしれない。C-RASSFの発現が低下するメカニズムを知り、発現を回復させる方法を開発する試みと同時に、ヒトのサンプルを対象とする情報の収集が欠かせない。本稿が、がん診療に従事されている諸先生方がC-RASSFに関心をもつ契機になるとよいと願っている。

文献

- 1) Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH: The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochim Biophys Acta* 1796: 114-128, 2009.
- 2) Volodko N, Gordon M, Salla M et al: RASSF tumor suppressor gene family; biological functions and regulation. *FEBS Lett.* 2014.
- 3) Avruch J, Xavier R, Bardeesy N et al: Rassf family of tumor suppressor polypeptides. *J Biol Chem* 284: 11001-11005, 2009.
- 4) Underhill-Day N, Hill V, Latif F: N-terminal RASSF family; RASSF7-RASSF10. *Epigenetics*

- 6 : 284-292, 2011.
- 5) Kudo T, Ikeda M, Nishikawa M et al : The RASSF3 candidate tumor suppressor induces apoptosis and G1-S cell-cycle arrest via p53. *Cancer Res* **72** : 2901-2911, 2012.
 - 6) Vavvas D, Li X, Avruch J, Zhang XF : Identification of Nore1 as a potential Ras effector. *J Biol Chem* **273** : 5439-5442, 1998.
 - 7) Katagiri K, Maeda A, Shimonaka M et al : RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nat Immunol* **4** : 741-748, 2003.
 - 8) Dammann R, Li C, Yoon JH et al : Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* **25** : 315-319, 2000.
 - 9) Vos MD, Ellis CA, Elam C et al : RASSF2 is a novel K-Ras-specific effector and potential tumor suppressor. *J Biol Chem* **278** : 28045-28051, 2003.
 - 10) Eckfeld K, Hesson L, Vos MD et al : RASSF4/AD037 is a potential ras effector/tumor suppressor of the RASSF family. *Cancer Res* **64** : 8688-8693, 2004.
 - 11) Nagashima S, Kodaka M, Iwasa H et al : MAGI2/S-SCAM outside brain. *J Biochem* **157** : 177-184, 2015.
 - 12) Hirao K, Hata Y, Ide N et al : A novel multiple PDZ domain-containing molecule interacting with N-methyl-D-aspartate receptors and neuronal cell adhesion proteins. *J Biol Chem* **273** : 21105-21110, 1998.
 - 13) Iida J, Hirabayashi S, Sato Y et al : Synaptic scaffolding molecule is involved in the synaptic clustering of neuroligin. *Mol Cell Neurosci* **27** : 497-508, 2004.
 - 14) Sumita K, Sato Y, Iida J et al : Synaptic scaffolding molecule (S-SCAM) membrane-associated guanylate kinase with inverted organization (MAGI)-2 is associated with cell adhesion molecules at inhibitory synapses in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* **100** : 154-166, 2007.
 - 15) Ikeda M, Hirabayashi S, Fujiwara N et al : Ras-association domain family protein 6 induces apoptosis via both caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Exp Cell Res* **313** : 1484-1495, 2007.
 - 16) Khokhlatchev A, Rabizadeh S, Xavier R et al : Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway. *Curr Biol* **2** : 253-265, 2002.
 - 17) Praskova M, Khokhlatchev A, Ortiz-Vega S et al : Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras. *Biochem J* **381** (Pt 2) : 453-462, 2004.
 - 18) Donninger H, Calvisi DF, Barnoud T et al : NRE1A is a Ras senescence effector that controls the apoptotic/senescent balance of p53 via HIPK2. *J Cell Biol* **208** : 777-789, 2015.
 - 19) Dammann R, Schagdarsurengin U, Liu L et al : Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene* **22** : 3806-3812, 2003.
 - 20) Liu L, Tommasi S, Lee DH et al : Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor. *Oncogene* **22** : 8125-8136, 2003.
 - 21) Dallol A, Agathangelou A, Fenton SL et al : RASSF1A interacts with microtubule-associated proteins and modulates microtubule dynamics. *Cancer Res* **64** : 4112-4116, 2004.
 - 22) Vos MD, Martinez A, Elam C et al : A role for the RASSF1A tumor suppressor in the regulation of tubulin polymerization and genomic stability. *Cancer Res* **64** : 4244-4250, 2004.
 - 23) Song MS, Song SJ, Ayad NG et al : The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. *Nat Cell Biol* **6** : 129-137, 2004.
 - 24) Song MS, Song SJ, Kim SY et al : The tumour suppressor RASSF1A promotes MDM2 self-ubiquitination by disrupting the MDM2-DAXX-HAUSP complex. *EMBO J* **27** : 1863-1874, 2008.
 - 25) Iwasa H, Kudo T, Maimaiti S et al : The RASSF6 tumor suppressor protein regulates apoptosis and the cell cycle via MDM2 protein and p53 protein. *J Biol Chem* **288** : 30320-30329, 2013.
 - 26) Lee D, Park SJ, Sung KS et al : Mdm2 associates with Ras effector NRE1 to induce the degradation of oncoprotein HIPK1. *EMBO Rep* **13** : 163-169, 2012.
 - 27) Avruch J, Zhou D, Fitamant J et al : Protein kinases of the Hippo pathway ; regulation and substrates. *Semin Cell Dev Biol* **23** : 770-784, 2012.
 - 28) Kodaka M, Hata Y : The mammalian Hippo pathway ; regulation and function of YAP1 and TAZ. *Cell Mol Life Sci* **72** : 285-306, 2015.
 - 29) Polesello C, Huelsmann S, Brown NH et al : The Drosophila RASSF homolog antagonizes the hippo pathway. *Curr Biol* **16** : 2459-2465, 2006.
 - 30) Matallanas D, Romano D, Yee K et al : RASSF1A elicits apoptosis through an MST2 pathway directing proapoptotic transcription by the p73 tumor suppressor protein. *Mol Cell* **27** : 962-975, 2007.
 - 31) Ikeda M, Kawata A, Nishikawa M et al : Hippo pathway-dependent and -independent roles of RASSF6. *Sci Signal* **2** : ra59, 2009.
 - 32) Guo C, Zhang X, Pfeifer GP : The tumor suppressor RASSF1A prevents dephosphorylation of the mammalian STE20-like kinases MST1 and MST2. *J Biol Chem* **286** : 6253-6261, 2011.
 - 33) Cooper WN, Hesson LB, Matallanas D et al : RASSF2 associates with and stabilizes the proapoptotic kinase MST2. *Oncogene* **28** : 2988-2998,

- 2009.
- 34) Song H, Oh S, Oh HJ et al : Role of the tumor suppressor RASSF2 in regulation of MST1 kinase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **391** : 969–973, 2010.
 - 35) Chan JJ, Flatters D, Rodrigues-Lima F et al : Comparative analysis of interactions of RASSF1–10. *Adv Biol Regul* **53** : 190–201, 2013.
 - 36) Iwasa H, Kuroyanagi H, Maimaiti S et al : Characterization of RSF–1, the *Caenorhabditis elegans* homolog of the Ras-association domain family protein 1. *Exp Cell Res* **319** : 1–11, 2013.
 - 37) Hesson LB, Dunwell TL, Cooper WN et al : The novel RASSF6 and RASSF10 candidate tumour suppressor genes are frequently epigenetically inactivated in childhood leukaemias. *Mol Cancer* **8** : 42, 2009.
 - 38) Wen Y, Wang Q, Zhou C et al : Decreased expression of RASSF6 is a novel independent prognostic marker of a worse outcome in gastric cancer patients after curative surgery. *Ann Surg Oncol* **18** : 3858–3867, 2011.
 - 39) Liang YY, Chen MY, Hua YJ et al : Downregulation of Ras association domain family member 6 (RASSF6) underlies the treatment resistance of highly metastatic nasopharyngeal carcinoma cells. *PLoS One* **9** : e100843, 2014.
 - 40) Mezzanotte JJ, Hill V, Schmidt ML et al : RASSF6 exhibits promoter hypermethylation in metastatic melanoma and inhibits invasion in melanoma cells. *Epigenetics* **9** : 1496–1503, 2014.
 - 41) Ye HL, Li DD, Lin Q et al : Low RASSF6 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with poor survival. *World J Gastroenterol* **21** : 6621–6630, 2015.
 - 42) Jacquemart IC, Springs AE, Chen WY : Rassf3 is responsible in part for resistance to mammary tumor development in neu transgenic mice. *Int J Oncol* **34** : 517–528, 2009.
 - 43) Fukatsu A, Ishiguro F, Tanaka I et al : RASSF3 downregulation increases malignant phenotypes of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **83** : 23–29, 2014.
 - 44) Gordon M, El-Kalla M, Zhao Y et al : The tumor suppressor gene, RASSF1A, is essential for protection against inflammation -induced injury. *PLoS One* **8** : e75483, 2013.
 - 45) Del Re DP, Matsuda T, Zhai P et al : Proapoptotic Rassf1A/Mst1 signaling in cardiac fibroblasts is protective against pressure overload in mice. *J Clin Invest* **120** : 3555–3567, 2010.
 - 46) Oceandy D, Pickard A, Prehar S et al : Tumor suppressor Ras-association domain family 1 isoform A is a novel regulator of cardiac hypertrophy. *Circulation* **120** : 607–616, 2009.
 - 47) Withanage K, Nakagawa K, Ikeda M et al : Expression of RASSF6 in kidney and the implication of RASSF6 and the Hippo pathway in the sorbitol-induced apoptosis in renal proximal tubular epithelial cells. *J Biochem* **152** : 111–119, 2012.
 - 48) Johnson R, Halder G : The two faces of Hippo : targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov* **13** : 63–79, 2014.