

Mdm2-mediated pRB downregulation is involved in carcinogenesis in a p53-independent manner

著者	三輪 清一
発行年	2006-03-09
URL	http://hdl.handle.net/10271/279

doi: 10.1016/j.bbrc.2005.11.148

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 449号	学位授与年月日	平成18年 3月 9日
氏名	三輪 清一		
論文題目	Mdm2-mediated pRB downregulation is involved in carcinogenesis in a p53-independent manner (Mdm2によるpRBの分解はp53非依存的発癌に関与する)		

博士(医学) 三輪 清一

論文題目

Mdm2-mediated pRB downregulation is involved in carcinogenesis in a p53-independent manner

(Mdm2によるpRBの分解はp53非依存的発癌に参与する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

癌遺伝子Mdm2は、RINGフィンガータイプのユビキチンリガーゼであり、癌抑制遺伝子産物p53をユビキチン-プロテアソーム系への分解に導く。最近我々はMdm2がもう一つの癌抑制遺伝子産物retinoblastoma gene product (pRB)のユビキチンリガーゼであることを報告した。Mdm2はp53を過剰分解することで癌化の方向へ導くと考えられているが、p53非依存的な癌化機構も報告されており、詳細なことは分かっていない。本研究では、Mdm2によるpRBの分解亢進はp53非依存的癌化に参与していることを検討した。

[材料ならびに方法]

1. 臨床の肺癌手術検体30例を用いて、Mdm2とpRBの発現を免疫組織化学染色で調べた。また同検体のp53遺伝子やRB遺伝子の変異をそれぞれsingle strand conformation polymorphism (SSCP)解析と、loss of heterozygosity (LOH)解析にて調べた。
2. 肺癌細胞株においてもMdm2とpRBの発現量を調べた。また変異型p53を持つ細胞株でのpRBの*in vivo*ユビキチン化アッセイ、サイクロヘキシミド(CHX)処理による分解実験を施行した。
3. p53遺伝子とRB遺伝子が欠損しており、テトラサイクリンでpRBが誘導できるSRB1細胞(Tet offシステム)を用いて、Mdm2による細胞周期への影響をフローサイトメトリー(FACS)で解析した。またMdm2がcyclin dependent kinase 4CDK4(CDK4)活性に直接の影響を与えるか否かを調べるために、細胞内因性CDK4を免疫沈降し、その活性を*in vitro*のキナーゼアッセイで調べた。
4. 野生型p53をもつNIH3T3細胞、p53ノックアウトマウス胎仔線維芽細胞(p53^{-/-}MEF)を用いて、Mdm2による形質転換能を、軟寒天培地中コロニー形成アッセイで調べた。

[結果]

1. Mdm2が高発現している肺癌検体ではpRBの発現は有意に低下しており、Mdm2とpRBの発現には逆相関が認められた。またMdm2高発現かつpRB低発現の癌において、p53遺伝子のstatusは様々であり、pRBの低発現にRB遺伝子のLOHは参与していなかった。
2. 肺癌細胞株においてもMdm2とpRBの発現には逆相関が認められた。p53遺伝子が欠損しているH1299細胞において野生型Mdm2はpRBをポリユビキチン化した。RING変異型Mdm2はpRBのユビキチン化を抑制しドミナントネガティブ効果を示した。変異型p53を持ちMdm2高発現のABC1細胞ではCHX処理にてpRBの分解がみられ、それはプロテアソームインヒビターによって回復した。
3. SRB1細胞において、低濃度テトラサイクリンで誘導されたpRBの量は野生型Mdm2の過剰発現によって減少し、逆にRING変異型Mdm2ではドミナントネガティブ効果によりpRBの蓄積が観察された。また野生型Mdm2によって減少したpRBはプロテアソームインヒビターによって回復した。これらのSRB1

細胞の細胞周期の変化はMdm2によるpRBの量的制御に一致しており、Mdm2はp53非依存的に細胞周期G1期からS期への移行を制御した。G1期からS期への移行には、CDK4等のサイクリン依存性キナーゼの活性化が重要であることが知られているが、内因性CDK4活性は、野生型およびRING変異型Mdm2の過剰発現の有無に関わらず、変動しなかった。すなわちMdm2による細胞周期の変動は、Mdm2依存性のpRBの量的制御に起因するものであり、Mdm2が直接CDK4活性に影響を与えたからではないことが分かった。

4. NIH3T3細胞およびp53^{-/-}MEFにおいて、野生型Mdm2による足場非依存的コロニー形成能の増加が認められた。RING変異型Mdm2、Mdm2Δp53(p53との結合部位が欠失)、Mdm2Δ273-321(pRBとの結合部位が欠失)などのMdm2変異体では形成能の増加は認められなかった。Mdm2分子上のpRBおよびp53結合部位の両方がMdm2による形質転換能に必須であり、Mdm2はp53非依存的に形質転換能があることが示された。

[考察]

正常の細胞周期においてpRBの制御は主にリン酸化によるものであるが、Mdm2の過剰発現がおこると、pRBの分解亢進が起こりp53非依存的に細胞を癌化の方向へ導くことが示唆された。実際p53遺伝子が変異型(Mdm2によって分解されない)の癌は比較的多く存在する。Mdm2の活性化はp53遺伝子のstatusに関わらず、RB経路とp53経路の2大癌抑制経路を破壊し、発癌に対して促進的に働くことが予想された。ゆえにMdm2が活性化している癌ではMdm2の細胞内インヒビター蛋白質であるARFの存在は重要である。今後Mdm2遺伝子そのものをターゲットにした遺伝子治療が期待される。

[結論]

癌遺伝子Mdm2はpRBの分解を促進し、p53非依存的な癌化に関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

癌遺伝子Mdm2はRINGフィンガータイプのユビキチンリガーゼであり、癌抑制遺伝子産物p53をユビキチン-プロテアソーム系への分解に導く。まず、副論文の内容について概説があった。Mdm2が癌抑制遺伝子産物Retinoblastoma gene product(pRB)に結合すること、Mdm2とRBを遺伝子導入した細胞ではRB蛋白質がユビキチン化されRB蛋白質の寿命が短くなること、Mdm2欠損細胞ではRB蛋白質の寿命が長くなること、RB蛋白質のもつ細胞扁平化作用をMdm2は阻害すること、などにより、Mdm2蛋白質はRB蛋白質を分解亢進に導きダウンレギュレーションすることを述べた。

次に、主論文の説明をした。非小細胞肺癌30例について、免疫組織学的に全癌細胞中のMdm2発現細胞とpRB発現細胞の割合の関係を見たところ、負の相関性が明らかになった。また、同症例標本からのDNAを用いてp53やRBの突然変異を検討した結果、p53の変異が6例、RBのLOHは1例であった。以上のことから、Mdm2高発現の癌ではpRBは低発現であり、p53の発現はさまざまであった。また、Mdm2低発現、pRB高発現の肺癌の数もかなり存在していた。

さらに、p53とMdm2-pRBの関係を明らかにするために、p53の欠損しているH1299細胞においてMdm2、RB、HA-Ubを共遺伝子導入するとpRBの著明なユビキチン化が起こった。また、プロテアソーム阻害剤MG115の存在下ではpRBの分解が抑制された。また、Saos2細胞をテトラサイクリン除去によりpRBが誘

導されるように作成したSRB細胞を用いて、野生型Mdm2を発現させるとpRBが減少し、変異型Mdm2を発現させるとpRBが増加した。また、Mdm2の細胞周期への効果を調べるためにセルソーター解析を行ったところ、pRBが存在している条件下でMdm2は合成期(S)の割合を増加させた。

最後に、Mdm2と細胞のトランスフォーメーションの関係について検討した。まず、Mdm2のp53結合部位を欠損させた変異蛋白、pRB結合部位を欠失させた変異蛋白(少しpRB結合能が残っている)、ユビキチン活性を喪失させた変異蛋白を作成した。野生型およびpRB結合部位欠失変異蛋白はp53蛋白をユビキチン化できるが、p53結合部位欠失変異蛋白はユビキチン化できなかった。一方、野生型およびp53結合部位欠失変異蛋白はRB蛋白をユビキチン化できることおよびpRB結合部位欠失変異蛋白はRB蛋白をわずかにユビキチン化できた。そして、ユビキチン活性をもたない変異蛋白はいずれもユビキチン化できないことを確認した。NIH-3T3細胞にHa-Rasを遺伝子導入すると足場非依存的細胞増殖がおりコロニーが10個ほど形成される。この際同時に、野生型Mdm2を共発現させるとコロニー数は30個になるが、p53結合部位欠失変異体、pRB結合部位欠失変異体、ユビキチン活性変異体の共発現ではコロニー数は10個と差がなかった。p53^{-/-}MEF細胞にHa-Rasを遺伝子導入するとコロニー数は30個になる。この際に、野生型Mdm2を共発現させるとコロニー数は45個になるが、p53結合部位欠失変異体、pRB結合部位欠失変異体、ユビキチン活性変異体を共発現させてもコロニー数は25~30個であった。

この結果は、Mdm2は細胞のトランスフォーメーションを促進すること、またそれにはp53結合部位、pRB結合部位、ユビキチン活性がいずれも必要であることを示している。

本研究はMdm2がpRBをユビキチン化すること、そのためMdm2とpRBは逆相関を示すこと、Mdm2はシャーレ内細胞トランスフォーメーションの系でコロニー数を増加させること、を明らかにしたことを本審査委員会は高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 非小細胞肺癌を選んだ理由は何か
- 2) pRBやMdm2の染色陽性はいかにして判断したか
- 3) RB遺伝子がLOHの時、RB蛋白量はどうなるのか
- 4) Mdm2トランスジェニックマウスでの発癌性について
- 5) Mdm2の他の基質は何か
- 6) Mdm2が低発現でRBが高発現である肺癌はどう解釈するのか
- 7) Mdm2のCDK4への効果実験はなぜ行ったか
- 8) mutant p53はなぜ高発現なのか
- 9) Mdm2過剰発現細胞をヌードマウスに移植すると親株の細胞に比し、腫瘍形成に有意差が出るか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 三浦直行
副査 蓑島伸生 副査 永田 年