

論文の内容の要旨

論文題目 p53を介した転写選択機構の解明とその応用
(Study on the mechanism of p53-mediated transcriptional selectivity and its application)

氏 名 宮崎 允

p53は代表的ながん抑制因子の1つであり、ヒトがんの約半数で変異が認められている。またp53遺伝子に異常がない場合においても、p53の負の制御因子であるMDM2の遺伝子増幅等が起こっており、ほとんどのがんにおいてp53経路は失活していると考えられている。細胞内においてp53は主に転写因子として働き、細胞周期停止関連遺伝子やアポトーシス誘導関連遺伝子の発現制御を介してがん抑制に寄与している。p53は通常MDM2等のE3ユビキチンリガーゼによってユビキチン化され、ユビキチン化されたp53は速やかにプロテアソーム系によって分解され、細胞内p53の蛋白質レベルは低く保たれている。DNA損傷等を含む様々な細胞内外のストレスによって、細胞内でのp53蛋白質が安定化し活性化される。現在開発されているp53活性化剤であるNutlin-3aやRG7112は、p53-MDM2相互作用を阻害し、ユビキチン化を介した蛋白質分解を抑制することでp53蛋白質の安定化させる。p53経路はがん抑制における最も重要な経路の1つであり、p53経路の再活性化は様々ながん腫に応用可能な治療戦略であると考えられる。

p53を活性化する様々な薬剤が開発されているがp53を標的とした治療法は成功しておらず、未だ承認薬は存在していない。この原因の1つとしては、p53が標的遺伝子の活性化を介して細胞周期停止とアポトーシスの両方を制御していることが考えられる。つまりがん細胞においてp53を活性化させるとアポトーシスにより死に至る細胞もあるが、一部の細胞では細胞周期停止が惹起され生存してしまう可能性がある。このような問題を解決するためには、p53を介した標的遺伝子の選択的な活性化機構の解明が必須である。これまでにp53による標的遺伝子の選択的活性化に関連する翻訳後修飾や結合パートナーが多数報告されているが、その全体像については未だ不明な点が多い。

本研究では、まず当研究室においてp53の転写コファクターであるClathrin heavy chain (CLTC)の結合因子として同定されたNuclear mitotic apparatus protein (NuMA)に着目

し機能解析を行った。NuMAは細胞周期M期においては紡錘体極に局在し、紡錘体極に微小管を係留する役割を持つ。一方で、NuMAはG1期には核内に局在するがその機能については不明であった。本研究によって、NuMAとp53が核内で結合し、NuMA-p53複合体がDNA損傷依存的に増加することがわかった。さらに、NuMAの発現抑制は、p53を介した細胞周期停止関連遺伝子*p21*やp53の負の調節因子*MDM2*遺伝子の転写を減弱させる一方で、PUMAやPIG3といったアポトーシス促進遺伝子の転写には影響がないことがわかった。また、NuMAの発現抑制はアクチノマイシンDによって誘導される細胞周期停止をキャンセルすることも判明した。続いてクロマチン免疫沈降法による解析を行ったところ、NuMAの発現抑制は*CDKN1A(p21)* 遺伝子プロモーター領域におけるp53の結合に影響しないが、p53を介したp21に転写活性化の際に重要な転写メディエーター複合体の構成因子である*CDK8*の*p21*遺伝子プロモーター領域への結合が減弱していることがわかった。まとめると、NuMAは*p21* 遺伝子プロモーター領域への*CDK8*の結合を促進させることで、p53を介した細胞周期停止関連遺伝子の選択的転写に寄与していると結論付けた。

次に小児がんの1つである神経芽腫におけるp53と受容体型チロシンキナーゼ ALKを標的とした新規治療法の開発を行った。約25%の神経芽腫において*ALK*遺伝子に変異や遺伝子増幅等により活性化していることが知られていることから、ALKを標的とした治療法が注目されている。一方で、ALK阻害剤を始め多くのチロシンキナーゼの阻害剤に対する耐性機構が細胞には備わっており、その耐性克服が今後の分子標的治療に重要であると考えられる。本研究では、高リスクグループに属する*ALK*遺伝子増幅を持つ神経芽腫に着目し、ALK阻害剤の有効性について調べた。この結果、*ALK*遺伝子増幅を持つ神経芽腫細胞は*ALK*遺伝子変異を持つ神経芽腫細胞に比べ、より低濃度のALK阻害剤により増殖抑制されることがわかった。さらに、ALK阻害剤はALK陽性神経芽腫細胞をG1期で停止させることで増殖を抑制するが、細胞死の誘導はほとんどなくがん細胞は生存しており、その後ALK阻害剤を除去すると再増殖し始めることが判明した。次に、マイクロアレイ解析によりALK阻害剤処理によって誘導される遺伝子発現変化を調べた結果、細胞周期関連遺伝子であるCyclin D1、Cyclin D3、E2F1の発現減少やCDKインヒビター*p27^{Kip1}*の発現上昇が誘導されていることが判明した。さらに、pRb蛋白質の脱リン酸化も誘導されており、ALK阻害剤がG1期での細胞周期停止を誘導していることと一致している。以上の結果から、ALK活性を有する神経芽腫に対し、ALK阻害剤での完全な治療は難しく、がんが再発してしまう可能性が考えられる。つまり、細胞の増殖抑制だけではなく細胞死を誘導することが、薬剤耐性の獲得および再発を抑制するために重要であることを示唆している。

そこで、神経芽腫においてp53変異が非常に稀なことに着目し、p53活性化剤とALK阻害剤の併用について検討した。また、比較としてシスプラチンとALK阻害剤との併用についても調べた。この結果、p53活性化剤単独ではALK阻害剤単独と同様にALK活性を有する神経芽腫細胞において細胞周期停止が誘導される一方で、ALK阻害剤との併用により

非常に効率的に細胞死が誘導すること、さらに薬剤除去後の再増殖も抑制することがわかった。興味深いことにp53活性化剤とALK阻害剤の併用は、シスプラチンとALK阻害剤の併用に比べより強い相乗効果を示すことがわかった。次に、ALK阻害剤とp53活性化剤の併用について *in vivo* で検証を行った。ここではヌードマウスに神経芽腫細胞を皮下移植し、腫瘍形成後14日間薬剤を経口投与し、腫瘍体積の比較を行った。この結果、ALK阻害剤やp53活性化剤単剤投与群ではコントロール群と比べて腫瘍の増殖にほとんど影響を与えないのに対して、ALK阻害剤とp53活性化剤併用投与群では腫瘍の強い増殖抑制効果が認められた。これらの結果から、ALK阻害剤とp53活性化剤の併用によりALK活性を有する神経芽腫に対する有効な治療法となることが示唆された。

次に、ALK阻害剤とp53活性化剤により誘導される細胞死がどのような種類の細胞死なのか調べた。この結果、ALK阻害剤とp53活性化剤の併用によりミトコンドリアからのシトクロムCの流出、カスパーゼ-9及びカスパーゼ-3の切断、カスパーゼ-3の基質であるPARPの切断が起こっていることから、内因性のアポトーシス経路が活性化していることが示唆された。さらにカスパーゼ阻害剤で処理すると、ALK阻害剤とp53活性化剤の併用により誘導される細胞死が抑制された。また、p53を発現抑制した際にも同様に細胞死が抑制されたことから、ALK阻害剤とp53活性化剤により誘導される細胞死は、p53を介した内因性のアポトーシスであることが判明した。

続いて、p53はPUMA、BAXやNOXAといったアポトーシス促進性の標的遺伝子を介して内因性のアポトーシス経路を制御していることから、ALK阻害剤とp53活性化剤を併用した際のこれら遺伝子の発現を調べた。この結果、非常に興味深いことにPUMAの発現がp53活性化剤単剤処理に比べALK阻害剤との併用により亢進していた。さらに、PUMAを発現抑制すると併用による細胞死が抑制されることから、PUMAの選択的な転写活性化がALK阻害剤とp53活性化剤により誘導されるアポトーシスに重要であることが示唆された。またマイクロアレイによる遺伝子発現比較解析を行いp53転写選択に関与すると予想される遺伝子を探索したところ、ALKの下流で制御されp53と協調的に働くことが示唆される転写因子SOX4を候補遺伝子として同定した。SOX4の遺伝子発現抑制は、ALK阻害剤とp53活性化剤の併用によって誘導されるPUMAの発現亢進が起らず、アポトーシスも抑制されることが明らかになった。これらの結果をまとめると、ALK遺伝子増幅を有する神経芽腫に対してALK阻害剤とp53活性化剤を併用すると、p53とSOX4を介してアポトーシス促進性因子であるPUMAの発現が亢進し、アポトーシスが強く誘導されることが明らかになった。

総括すると、本研究の結果p53を介した標的遺伝子の選択的転写活性化に関与する因子としてNuMAとSOX4という2つの因子を同定することが出来た。NuMAは細胞周期停止関連因子であるp21の選択的転写活性化に関与し、SOX4はアポトーシス促進因子であるPUMAの選択的転写活性化に関与する。さらに、ALK遺伝子増幅を有する神経芽腫に対しALK阻害剤単独では細胞周期停止が惹起されるのに対し、p53活性化剤を併用することでア

ポトーシスが効率的に誘導されることがわかった。これはp53活性化剤とALK阻害剤の併用の結果、PUMAの選択的転写活性化が起こるためである。p53活性化剤とRTK阻害剤の併用によりp53の転写選択性を制御することでより効率的にアポトーシスを誘導できる可能性が示唆された。これは幅広いがんに応用可能な有効な治療戦略になると考えられる。