

論文の内容の要旨

論文題目 ユビキチンリガーゼの新規発癌変異

氏名 山戸 梓

肺がんは我が国を含む世界のがん死の原因第1位であり、その少なくとも80%が腺がん、扁平上皮がん、大細胞がんよりなる非小細胞肺がんに分類される。肺がんの患者の多くは進行期に見つかり、その5年生存率は20%を下回る。非小細胞肺がんは進行期には通常プラチナ系抗がん剤に他の1剤を加えた2剤による化学療法が行われるが全生存期間の中央値は1年前後にすぎない。

がんは様々なゲノム異常・エピゲノム異常の蓄積の結果生じると考えられているが、近年ある種の非小細胞肺がんが epidermal growth factor (*EGFR*)、anaplastic lymphoma kinase (*ALK*)、ret proto-oncogene (*RET*) や receptor tyrosine kinase1 (*ROS1*) といった遺伝子に特異的な変異を持ち、かつそれらの変異が腫瘍形成に強く関与することが明らかになった。さらにそれらを標的とした治療薬「分子標的薬」が実際に開発され、標的となる遺伝子異常を持つ患者の無増悪生存期間・全生存期間を大幅に改善している。これらをふまえると、発がん重要な遺伝子異常を同定し、その産物を標的とする治療を行う「分子標的療法」を開発することが現在のがん治療において最も効果的であると考えられる。

本研究は、未だ臨床応用されている分子標的薬がない肺扁平上皮がんの原因遺伝子を明らかにするため、肺扁平上皮がん細胞株のゲノム DNA および cDNA を次世代シーケンサーで解析し、得られた変異の中で形質転換能を示したものをさらに機能解析を試みたものである。

具体的には肺扁平上皮がん細胞株一種よりゲノム DNA および cDNA を次世代シーケンサー解析した結果、42 種類の遺伝子に 44 カ所の変異を同定した。得られた変異のうちキナーゼを含む、発がんに関係することが予想される 6 遺伝子を 3T3 focus formation assay でスクリーニングしたところ、ユビキチンリガーゼであり NF- κ B activator として知られている遺伝子（以下、NF- κ B activator A と称する）のナンセンス変異型でのみ形質転換能を示した。さらに、ナンセンス変異体はヌードマウスを用いた腫瘍形成試験でも腫瘍を形成した。NF- κ B activator A は 6 個のドメインより形成されるタンパクである。N 末端よりそれぞれのドメインを①から⑥とするとユビキチンリガーゼ活性を持つのは⑥ドメインであり、ナンセンス変異体では④以降のドメインが欠損する。我々はユビキチンリガーゼが失活することが形質転換の原因であると考え、ユビキチンリガーゼを失活させるミスセンス変異を人工的に導入したプラスミドを複製し同様に形質転換能を調べた。その結果、失活変異体でも形質転換能を認めたことからナンセンス変異体の形質転換能はユビキチンリガーゼ活性の消失によるものであることが示唆された。さらに、失活変異体をベースとして①から⑤のドメインそれぞれを欠損させる変異を作成した結果、①の欠失により形質転換能は完全に失われ、③の欠失は形質転換能を弱くした。

次にナンセンス変異体および失活変異体とそのドメイン欠損変異体で NF- κ B レポータールシフェラーゼアッセイを行った。その結果、ナンセンス変異体では NF- κ B 経路を野生型と同程度にしか活性化しない一方、失活変異体ではそれを明瞭に上回って NF- κ B を活性化することが示された。また、その活性化は①ドメインをさらに欠損させると完全に失われ、③、④ドメインのいずれかを欠損すると野生型程度までに下がった。ナンセンス変異体と失活変異体の両方が形質転換能を認めた一方で、ナンセンス変異体では NF- κ B 経路を野生型と同程度にしか活性化しないことからナンセンス変異の形質転換能は NF- κ B の活性化に依存しない経路があることが示唆された。（このことは NF- κ B

を活性化させるタンパクで、NF- κ B activator A の下流でユビキチン化を受けてプロテアーゼによる分解を受けるタンパク X を標的とする sh-RNA を恒常的に発現する NIH3T3 細胞を作製し 3T3 focus formation assay を行った結果、ナンセンス変異、失活変異の両方でフォーカスを形成することからさらに裏付けられた。)

さらに既存のデータベースにおける検索で NF- κ B activator A の変異が多数報告されていたため、これらについても 3T3 focus formation assay を行った。その結果ユビキチンリガーゼ欠失変異では 3T3 focus formation assay で形質転換能を認め、ヌードマウスでの腫瘍形成試験でも腫瘍を形成することが示された。また、NF- κ B の活性化に関してもレポーターアッセイを行ったがドメイン欠失変異体の知見と矛盾しないものだった。

また、NF- κ B activator A と同じファミリーに属しユビキチンリガーゼの基質に相同性があるとされる遺伝子（以下 NF- κ B activator B と称する。）でもユビキチンリガーゼ活性を消失させる変異を人工的に作製した。また NF- κ B activator A と同様にデータベースで変異を検索した結果 7 種のユビキチンリガーゼ欠失変異が見つかった。これらについても 3T3 focus formation assay および NF- κ B レポータールシフェラーゼアッセイを行った。その結果、①ドメインを含む全てのドメインを欠失する変異を除いてフォーカスを形成したことから NF- κ B activator A と NF- κ B activator B は形質転換能に相同性があることが示唆された。一方 NF- κ B の活性化に関しては一つの変異体を除き NF- κ B activator A の変異と比較すると弱いものであった。(NF- κ B activator B に NF- κ B の活性化と独立した形質転換能があることは、NF- κ B activator A と同様に、タンパク X の shRNA を恒常的に発現する NIH3T3 cell を使用した focus formation assay において失活変異体がフォーカスを形成したことからさらに裏付けられた。)

今後は各種のがんにおいて NF- κ B activator A,B の変異が実際にど

の程度みられるのかを確認していくと共に、ヒトの細胞に NF-kB activator A,B の変異を導入することが実際に腫瘍化をもたらすのか、さらに活性型 NF-kB activator A,B 変異体と協同して発がんに寄与する変異遺伝子は何か、等の検討が必要と考えられる。さらに NF-kB activator A,B の標的タンパクを共免疫沈降法や two-hybrid 法などを用いて解析する予定である。