

論文題目

Analysis of PTEN-EGR2 apoptotic signaling pathway

-癌抑制遺伝子 PTEN の下流遺伝子 EGR2 のアポトーシスシグナル伝達経路の解析-

指導教官 中村祐輔教授

東京大学医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程病因病理学専攻

氏 名 鷗木元香

PTEN は多くの癌で欠失が認められた染色体 10q23 から 1997 年に単離された癌抑制遺伝子である。これまでに *PTEN* 遺伝子の mutation や欠損は子宮体癌、前立腺癌、神経黄膠芽細胞腫などの多くの癌で報告されている。*PTEN* は他の多くの転写を直接制御している癌抑制遺伝子とは異なり、フォスファターゼとして機能している。*PTEN* の主な機能は細胞増殖シグナルを伝達する PI3K pathway の阻害であるが、*PTEN* の基質がすべて明らかにされたわけではなく、まだ *PTEN* が関わる未知の pathway は数多く存在していると考えられる。*PTEN* の過剰発現は細胞周期停止、場合によってはアポトーシスを誘導するが、*PTEN* シグナルが核へ伝達された以降の pathway についてはほとんど解明されていない。本研究では *PTEN* のシグナルが核へ伝達された以降の細胞増殖抑制並びにアポトーシス誘導に至るシグナル伝達分子を網羅的に同定し機能解析を行う事を主目的とし、最初に cDNA マイクロアレイを用いて *PTEN* 遺伝子の導入により発現が誘導される遺伝子 91 種類と抑制される遺伝子 67 種類を同定した。発現が誘導される遺伝子のうち、卵巣癌検体を用いたマイクロアレイの結果との比較により卵巣癌症例において発現が低下していた 6 種類の遺伝子 (*EGR2/Krox-20*, *BPOZ*, *HCLS1/HS1*, *DUSP1/MKP1*, *NFIL3/E4BP4*, *PINK1*) を候補遺伝子として選び機能解析を行った。これらの遺伝子を発現プラスミドベクターに組み込み細胞に導入して、これらの遺伝子の発現が細胞増殖に与える影響を検討した結果、*BPOZ* と *EGR2* が顕著な細胞増殖抑制能を持つ事が明らかとなった。アンチセ

ンスオリゴ導入により BPOZ 並びに EGR2 の発現を抑制すると細胞の増殖が速くなることより、この 2 遺伝子が癌抑制機能を持つ事が示唆された。

BPOZ は新規遺伝子として全長単離後、機能解析中に報告 (Dai et al., 2000)されたアンキリンリピートと蛋白-蛋白相互作用に関与する BTB/POZ domain を有する機能未知遺伝子である。Egr2/Krox-20 は血清刺激に反応する転写因子として 1988 年に Chavrier 等により報告された遺伝子で、ホモノックアウトマウスでは後脳の発生異常を来し、生後 2 週間以内に死亡することが報告されている (Schneider-Maunoury et al., 1993)。人では congenital hypomyelinating neuropathy や type1 Charcot-Marie-Tooth syndrome の原因遺伝子の 1 つとして報告されている (Warnwr et al., 1998)。これら BPOZ もしくは EGR2 と PTEN との関連についてはこれまでに報告がないが、謀らずして Pten のノックアウトマウスの解析に Egr2/Krox-20 を後脳のマーカーとして用いた報告が 1 報ある (Suzuki et al., 1998)。この Pten ホモノックアウトマウスでは胎生 8.5 日目で頭部の過増殖が認められ、正常では後脳に発現している Egr2 が前脳に発現していた。このことは、生理的条件下で Egr2 の発現パターンが PTEN の制御を受けている事を示唆している。

アデノウイルスベクター AdCAEGR2 を作製し、大腸癌、子宮体癌、神経膠芽細胞腫など 6 臓器由来の計 39 癌細胞株に in vitro で感染させたところ、33 細胞株において顕著にアポトーシスが誘導され、広範囲な癌種に対する遺伝子治療への応用が期待された。EGR2 によりアポトーシスが誘導される癌種は p53 と比較しても遜色なく、むしろ広範囲に及ぶものである。EGR2 の発現は利用した癌細胞株の大半において低下しており、この発現調節に EGR2 遺伝子のイントロン 1 の CpG 領域のメチル化が関与している可能性が示唆された。また、EGR2 によるアポトーシス誘導機構を cDNA マイクロアレイにて検討した。その結果、pro-apoptotic Bcl-2 ファミリーのメンバーである BNIP3L と BAK が EGR2 により直接転写誘導を受け、それらによってミトコンドリアの膜透過性が変化し、チトクローム c が細胞質へ放出され、それに伴いカスパーゼ 9、3 が活性化されることを明らかにした。Death ligand/receptor を介するアポトーシス誘導経路についても検討したが、TNF α が EGR2 により誘導されるもののその時期は BNIP3L や BAK の発現が誘導される時間よりも遅く、EGR2 によるアポトーシスはミトコンドリアを介する経路を主経路としていると考えられた。

本研究では PTEN の下流遺伝子として細胞増殖抑制並びにアポトーシス誘導に関与する 2 つの遺伝子 BPOZ と EGR2 を同定した。AdCAEGR2 の広範囲の癌種へのアポトーシス誘導能は臨床応用可能であると考えられ、そのアポトーシスシグナル伝達経路の一部を明らかにする事ができた。今後はマウスモデルを用いて in vivo での効果を検討する必要があると考えられた。