

論文の内容の要旨

論文題目 p53 下流遺伝子 p53AIP1 はミトコンドリアを
介したアポトーシス経路を制御する

指導教官 中村 耕三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 松田浩一

p53 遺伝子は、ヒト癌の半数以上で変異が見られる癌抑制遺伝子である。p53 は 1979 年、SV40 でトランスフォームした細胞において、large T 抗原と結合する 53 KDa の未知のタンパク質として Levine らによって初めて報告された。当初は癌遺伝子の一つと考えられていたが、マウスの腫瘍細胞において p53 遺伝子の変異が観察されることや、正常型 p53 遺伝子の過剰発現系において、p53 が増殖抑制作用を示すことより、細胞周期の負の制御因子として考えられるようになった。さらに 1988 年、大腸癌にて高頻度に欠失を認めていた第 17 番染色体短腕上の癌抑制遺伝子が p53 であった事が Vogelstein らにより報告された。その後、ヒトの様々な癌において p53 遺伝子の変異が高頻度に報告され、さらに癌組織のみで変異がみられる体細胞変異だけでなく、1990 年、若年発症型の多発癌を特徴とする Li-Fraumeni 症候群の患者において p53 遺伝子の胚細胞変異が報告された。これらの研究により、現在 p53 遺伝子の癌抑制遺伝子としての地位は不動のものとなり、その重要性は明らかとなっている。

p53 は転写因子として働き様々な下流遺伝子を発現誘導し、その癌抑制機能を発揮する。p53 蛋白は DNA ダメージなど細胞障害性のストレスによりリン酸化などの修飾を受け量的、質的に活性化され細胞内で増加する。活性化された p53 蛋白は転写調節因子として染色体上の特定の DNA 配列に結合し、転写を活性化し下流遺伝子を発現誘導する。p53 の下流遺伝子は 100 以上あると考えられておりその下流遺伝子を介して多様な生理活性を示す。p53 の下流遺伝子の機能

は多岐にわたるが、細胞周期の制御、アポトーシスの誘導、血管新生抑制、DNA修復、p53の質的量的制御、免疫系の賦活などが報告されている。その中でも特に重要なのが細胞周期の制御およびアポトーシスの誘導である。

紫外線など様々なストレスにより染色体 DNA に傷が付くと細胞は癌化の危険性が増加する。このような細胞では増殖を止めたり、細胞死を誘導したりしてその細胞の癌化を防ぐ機構が必要となる。実際の細胞に紫外線や抗癌剤などで DNA ダメージを与えると p53 蛋白が増加し、細胞は増殖の停止やアポトーシスを起こす。またウイルスベクター等を用いて p53 蛋白を過剰発現させても細胞は G₁ 期に停止したり、アポトーシスが誘導されたりする。

この細胞周期の制御およびアポトーシスの誘導が p53 の最も重要な機能と一般に考えられていた。しかし、最近我々のグループは DNA 修復に関係する新しい p53 の標的遺伝子である p53R2 を単離した。その発見により、p53 が増殖の制御や細胞死の誘導の他にゲノムの完全性を維持するという別の重要な役割を果たすという可能性を示唆した。つまり、p53 はその標的遺伝子を細胞の状況に応じて選択し、ある場合は細胞死を引き起こしその細胞を除去する(アポトーシスの誘導)、又ある場合には細胞増殖を停止しその間に別の下流遺伝子の働きにより DNA の傷を修復させ細胞を正常な状態に戻す(細胞を修理する)というものである。これによって p53 はダメージに応じて活性化され、細胞の生か死かという運命を決定するという重要な役割を持つ可能性が見いだされた。では p53 がどのように下流遺伝子を選択的に活性化し細胞の運命を決定するかという疑問が残るが、この疑問に答えたのが p53AIP1(p53-regulated Apoptosis Inducing Protein 1)の誘導機構の解明である。

細胞にダメージが生じた際、p53 が活性化し細胞周期の停止もしくはアポトーシスの誘導が起こってくるが、どのような場合に細胞死が起こりどのような場合に細胞周期停止が起こるかはこれまで不明であった。p53 依存性のアポトーシスは p53 による腫瘍抑制の最も重要な特徴であるが、その誘導メカニズムの大部分は未解明である。これまで bax、PIG3、Killer/DR5、Fas、Noxa、PERP および PUMA などが p53 依存性アポトーシスに対する、候補遺伝子として報告され

てきたが、単独でどれも p53 によるアポトーシス誘導のメカニズムを明白に説明することができない。

我々は、p53 の 46 番目のセリン残基のリン酸化が p53 によるアポトーシス誘導に重要である事を示し、このリン酸化によって特異的に誘導されてくる遺伝子として p53AIP1 を単離同定した。p53AIP1 遺伝子は、3 つの splicing variant (α , β , γ) があり、それぞれ 124、86、108 のアミノ酸によってコードされる。p53AIP1 α 、p53AIP1 β はミトコンドリアに局在し、細胞増殖を抑制することがわかっていた。DNA 障害に応じて p53 の活性化が起きるが、この際アポトーシスを誘導するような強いダメージの時に p53 の 46 番目のセリン 残基(以下 Ser-46)がリン酸化を起こし、そしてそのリン酸化特異的に p53AIP1 が誘導されることが我々の解析によってこれまでに証明されている。しかし p53AIP1 が実際にどのような細胞にアポトーシスを誘導するか、どのような刺激によって発現誘導されてくるのかなどは不明であった。p53 依存性アポトーシスの分子メカニズムをより明確にするために、p53AIP1 のアポトーシス経路における役割をさらに明らかにする必要がありと考え、我々はさらなる p53AIP1 の機能解析を行った。

本編中ではまず、アポトーシス経路における p53AIP1 の役割を解明するために、まずアンチセンスオリゴを用いた機能抑制系において p53AIP1 が p53 依存性アポトーシスに不可欠な因子であることを証明した。またアデノウイルスを用いた p53AIP1 の強発現により実際に著明にアポトーシスが誘導されることを示した。

次に p53AIP1 による実際のアポトーシス誘導のメカニズムについては、p53AIP1 がミトコンドリアを介したアポトーシス経路に重要で Ser-46 のリン酸化特異的に発現誘導されることを内因性のダメージの系で証明した。また p53AIP1 が bax などと同様、ミトコンドリアの膜電位の制御を通じてミトコンドリアからの cytochrome C の放出を引き起こすことを示した。さらに p53AIP1 はアポトーシスの負の制御因子である bcl-2 と結合しかつ機能的にも相関することを示した。

また実際に癌の遺伝子治療において臨床治験が行われている p53³⁸ と比べて

もより強い程度で癌細胞にアポトーシスを誘導でき、p53 遺伝子治療抵抗性の癌において p53AIP1 による遺伝子治療が一つの選択肢となりうる可能性があることを示した。