

[ 別紙 1 ]

論 文 内 容 の 要 旨

論文題目: “*Noxa* 遺伝子欠損マウスの解析を通じた p53 依存性アポトーシスの研究”

指導教官: 谷口 維紹 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名: 渋谷 司

DNA 傷害やがん遺伝子の活性化をはじめとした、がんの形成・進展に伴う種々のストレスはがん抑制因子 p53 を活性化する。この際、p53 は主として標的遺伝子の転写調節を介し、細胞周期の停止や DNA の修復、アポトーシスといった応答を引き起こす。ヒトがんの 50%以上の症例に p53 の機能欠損につながる遺伝子変異が認められることなどから、p53 を介した応答は発がんの抑制においてきわめて重要であると考えられる。これら p53 を介した応答のなかでも、アポトーシスの誘導は発がんの抑制ととりわけ密接に関与する。この p53 依存性アポトーシスに関し、その進行にはミトコンドリアを介した経路が重要であることが分かってきている。さらにこれまでにいくつかの p53 の標的遺伝子産物がミトコンドリアを介したアポトーシスの経路を制御していることが報告されている。しかし、各因子の役割の詳細についてはいまだ不明な点が多い。p53 の標的遺伝子の一つである *Noxa* は Bcl-2 ファミリーに属するアポトーシス誘導因子をコードする。そして HeLa 細胞に *Noxa* を高発現させるとミトコンドリアを介した経路によりアポトーシスが誘導されることも分かっている。本論文では、*Noxa* 遺伝子欠損マウスの解析などにより、p53 依存性アポトーシスにおける

Noxa の役割について検討した結果を報告する。

マウス胎仔線維芽細胞 (MEF) にアデノウイルス E1A を発現させ、DNA 傷害を加えた際のアポトーシスは p53 依存性に進行するが、Noxa 遺伝子欠損 MEF においてはアポトーシスが部分的に抑制されていた。p53 の標的遺伝子である Bax の欠損によっても、同程度にアポトーシスが抑制されたが、Noxa, Bax 両遺伝子を欠損させることによって、さらに抑制が強まった。このことから、MEF の E1A 依存性アポトーシスにおいて Noxa, Bax の両因子が重要な役割を果たしていること、この両因子が関与する経路は少なくとも一部は重複していないことが示された。さらに、MEF に E1A と活性型 Ras を発現させて、メチルセルロースを含む培地上でのコロニー形成を見たところ、Noxa, Bax 各単独の遺伝子欠損 MEF において野生型 MEF の場合よりも多くのコロニーが形成された。そして、Noxa, Bax 両遺伝子欠損の MEF においてはさらに多くのコロニーの形成が見られた。そこで、Noxa, Bax 両因子はがん遺伝子による細胞の形質転換の抑制においても重要であることが分かった。一方、胸腺細胞 (thymocyte) に X 線照射を行った際のアポトーシスも p53 依存性に進行することが知られるが、この系に関しては Noxa, Bax 遺伝子の欠損による影響は見られず、細胞種によって p53 の下流におけるアポトーシスの誘導機構が異なることが示唆された。

マウスに全身 X 線照射を行った際、小腸の 2 種類の細胞においてアポトーシスが起きることが知られる。このうち陰窩の幹細胞領域における上皮細胞のアポトーシスは p53 遺伝子欠損マウスにおいてはほとんど見られないが、Noxa 遺伝子欠損マウスにおいても部分的に抑制されており、*in vivo* においても Noxa が p53 の下流のアポトーシス誘導経路において重要な役割を果たすことが分かった。一方、粘膜固有層の細胞のアポトーシスは p53 遺伝子欠損マウスにおいては野生型マウスと変わりなく起きるのに対し、Noxa 遺伝子欠損マウスにおいては明らかに抑制されていた。この結果から、従来 p53 の関与が知られていなかったアポトーシスの系においても Noxa が何らかの機能を果たすことが示唆された。

そこで、MEF に種々のアポトーシス誘導刺激を加え、p53 の役割が明らかでない系における Noxa の関与を見たところ、重度の DNA 傷害によるアポトーシスが Noxa 遺伝子欠損 MEF において抑制されていることが分かった。この際、Noxa は p53 依存性に発現誘導されたが、p53 遺伝子欠損マウスにおいては必ずしもアポトーシスの抑制は見られなかった。さらに、p53 の標的遺伝子の一つである *p21<sup>WAF1/Cip1</sup>* を欠損した MEF ではアポトーシスが促進されていたことから、p53 は

Noxa の誘導などを介してアポトーシスを促進する経路に加え、p21 の誘導などを介してアポトーシスを抑制する経路をも同時に活性化していることが示唆された。以上の *Noxa* 遺伝子欠損マウスの解析結果から、いくつかの系において p53 依存性のアポトーシスが *Noxa* を介して進行することが明らかになった。しかし、p53 依存性でありながら *Noxa* を介さずに進行するアポトーシスの系も存在することから、*Noxa* の関与の有無については細胞種や細胞の状況、刺激の性質によって異なると考えられる。

MEF に抗がん剤による処理を行った際、E1A を発現している MEF およびこれを発現していない MEF のいずれにおいても、ほぼ同程度の *Noxa* mRNA の発現誘導が見られた。しかし、前者ではアポトーシスの誘導が見られるのに対し、後者ではそれが見られなかった。また、NIH3T3 細胞に *Noxa* を単独で強制発現させた際にはアポトーシスの誘導は見られず、*Noxa* と E1A とを共発現させることではじめて明らかなアポトーシスの誘導が見られた。そこで、E1A の存在により *Noxa* の機能が影響を受けることが示唆された。さらに、MEF に *Noxa* を強制発現させたところアポトーシスの誘導はほとんど見られなかったが、*Noxa* の強制発現に、抗がん剤による処理や紫外線照射、といった刺激をあわせて加えたところ、*Noxa* を発現させた細胞において明らかなアポトーシスの促進が見られた。これらの結果から、*Noxa* が機能する上で、その発現が誘導されるだけでは十分でなく、E1A の発現や抗がん剤による処理、紫外線照射などの刺激による付加的な変化があわせて必要となることが示唆された。すなわち、アポトーシスの経路に対する *Noxa* の作用は、誘導された際の細胞の状況などにより変化しうる、ということである。*Noxa* の持つこのような性質は、状況に応じた細胞応答の決定に寄与しているものと考えられる。