

論文の内容の要旨

論文題名

発癌及びアポトーシス誘導における Pim-1 と c-Myc
の協調作用の機構解明に関する研究

氏名 望 月 俊 宏

一般に細胞の癌化は癌遺伝子や癌抑制遺伝子における遺伝子異常が段階的に蓄積された結果生じるものと考えられている（多段階発癌説）。このような発癌過程において蓄積される遺伝子異常の組み合わせには様々なものが知られているが、多くの場合個々の遺伝子異常が互いにどのように関連しあって細胞のがん化に関わっているかは明らかでない。*pim-1* 遺伝子は Molony murine leukemia virus (MoMuLV)の感染により生ずるリンパ腫において、その近傍へのプロウイルスの組み込みによって活性化される遺伝子として単離・同定されたがん遺伝子である。また、*pim-1* 遺伝子を用いたトランスジェニックマウスにおいても有意に高頻度のリンパ腫の発生が認められることや、ヒトの骨髄腫などでもその高発現が認められることから *pim-1* は癌の発生に関わる重要な遺伝子として認知されている。興味深いことにトランスジェニックマウスを用いた実験から *pim-1* 遺伝子の発現単独では癌化には不十分であり *myc* 遺伝子の活性化が要求されること、また *pim-1* の発現は *myc* による細胞の癌化を促進することなどの点から *pim-1* は *myc* 依存的かつ協調

的に細胞の癌化の進展に寄与していると推察されている。しかしながらこれまでのところ *pim-1* 遺伝子の生理機能や癌発生における作用機作などについてはほとんどわかっておらず、その遺伝子産物である Pim-1 セリン/スレオニンキナーゼの標的となるべき分子もいまだ同定されていない。

近年、遺伝子変化の結果細胞死に対する耐性能を獲得することが細胞の多段階的な発癌過程において一つの重要なステップと考えられるようになってきたが、その一つの例として *c-myc* と *bcl-2* による協調的癌化作用が挙げられる。*bcl-2* 遺伝子は *pim-1* と同様に *c-myc* と協調してリンパ腫の発生に関わることが知られているが、*bcl-2* は癌遺伝子であると同時に代表的なアポトーシス抑制遺伝子であり、*c-myc* 過剰発現によってひきおこされるアポトーシスを抑制し、細胞に survival advantage を与えることによって積極的に細胞の癌化に関与していると考えられている。このような観点から Pim-1 にも Bcl-2 と同様にアポトーシス抑制能があり、それによって細胞の癌化に寄与しているのではないかとこの可能性がこれまでも指摘されてきた。事実デキサメサゾン処理によるリンパ球のアポトーシス誘導においては Pim-1 は抑制的に機能することが報告されている。しかしながら、Pim-1 が c-Myc により誘導されるアポトーシスに対してどのように機能するのかについては不明であった。この点を明らかにするため、c-Myc 誘導アポトーシスに対する Pim-1 の影響を検討した。

pim-1 遺伝子発現ベクターを構築し、親株 Rat-1 細胞ならびに血清除去により効率よくアポトーシスを誘導できる c-Myc 高発現 Rat-1 細胞 (Rat-1/c-Myc) のそれぞれに遺伝子導入することにより Pim-1 を過剰発現する Rat-1/Pim-1 細胞ならびに Rat-1/c-Myc/Pim-1 細胞を樹立した。また Pim-1 のもつセリン/スレオニンキナーゼ活性の発現に必須である ATP 結合部位 (67 番目のリジン残基) をメチオニンに置換することで、キナーゼ活性を失くした変異体 Pim-1(K67M) を作成し、その発現ベクターを同様に Rat-1/c-Myc 細胞に導入し Rat-1/c-Myc/Pim-1(K67M) 細胞を得た。これらの細胞株を用いて血清除去によるアポトーシス誘導実験を行った結果、以下のような事実が判明した。1) Pim-1 は血清除去による c-Myc 依存的アポトーシスを抑制せず、むしろこれを増強する。2)

Pim-1 による c-Myc 依存的アポトーシスの増強にはそのキナーゼ活性が必要である。3) Pim-1 の単独発現は血清除去下でもアポトーシスを誘導しない。4) Pim-1 は血清除去+c-Myc 過剰発現によるカスパーゼ3様プロテアーゼの活性化を増強することによりアポトーシスを増強している。

これらの結果は当初の予想に反して Pim-1 が c-Myc 依存的アポトーシスを抑制しないことを示すと同時に Pim-1 がトランスフォーメーションだけではなくアポトーシス誘導においても c-Myc と協調的に機能していることを示唆している。このことは c-Myc からトランスフォーメーションあるいはアポトーシスへと至るシグナル伝達経路が一部重複しており、その重複領域において Pim-1 が機能している可能性を示唆するものである。そこで Pim-1 が c-Myc による癌化やアポトーシス誘導に共通に関わっている分子のリン酸化を介して機能している可能性を探るため、まず Pim-1 キナーゼに結合する細胞性蛋白質の検索を行った。その結果約 65kDa の蛋白質が Pim-1 に特異的に結合することが明らかとなり、さらにウエスタンブロッティング解析の結果、この約 65kDa のバンドには少なくとも c-Myc の転写標的遺伝子産物で細胞周期関連フォスファターゼである Cdc25A を含んでいることがわかった。Pim-1 と Cdc25A の特異的結合は免疫共沈によっても確認され、また in vitro kinase assay, phosphatase assay の結果 Pim-1 が Cdc25A をリン酸化すること、Pim-1 によってリン酸化された Cdc25A はそのフォスファターゼ活性が上昇することも明らかとなった。

Cdc25A は血清除去による c-Myc 依存性アポトーシスに関わっていることが報告されており、その一方でトランスフォーミング能を有することも示されている。そこで実際の細胞内で Pim-1 によるリン酸化が Cdc25A のもつアポトーシス誘導能やトランスフォーミング能にどのような影響を与えるか検討した。遺伝子導入により Cdc25A 単独あるいは Pim-1, Pim-1(K67M)とともに Cdc25A を過剰発現する細胞(Rat-1/Cdc25A、Rat-1/Cdc25A/Pim-1、Rat-1/Cdc25A/Pim-1(K67M))を樹立し、これらの細胞の足場非依存性増殖能と血清除去によるアポトーシス誘導に対する感受性を調べた。その結果、1) Cdc25A の過剰発現が足場非依存性増殖とアポトーシス感受性の両者を誘導すること、2)

Pim-1 がそのキナーゼ活性依存的に Cdc25A による足場非依存的増殖ならびにアポトーシス感受性の誘導を増強することが判明した。以上の結果は Pim-1 キナーゼがその標的分子である Cdc25A と結合し、リン酸化を介してその活性を上昇させることによって Cdc25A のもつアポトーシス誘導能やトランスフォーメーション能等の生物学的機能を増強していることを示唆している。このような結果は Pim-1 と c-Myc の協調的癌化のメカニズムとしてこれまで c-Myc と Bcl-2 について言われていたようなアポトーシス抑制に基づく協調作用とは異なり、Pim-1 が c-Myc の標的遺伝子産物である Cdc25A を活性化することによるという全く新しいモデルの提唱につながるものである。この新たなモデルによってアポトーシス抑制モデルでは説明が困難であった事実（Pim-1 が Bcl-2 と協調的癌化作用をもつ、Pim-1 と c-Myc がさらにアポトーシス抑制因子 Gfi-1 と協調作用を示す等）をも包括的に説明できるようになった。このように本研究の成果は多段階発癌でみられる癌遺伝子産物間の相互作用の分子レベルでの理解に貢献するものである。