

## 論文の内容の要旨

Identification and functional analysis of a novel p53-target gene, *p53RDL1*.

新規 p53 標的遺伝子 *p53RDL1* の単離とその機能解析

指導教官 中村祐輔教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

病因病理学専攻

谷川千津

ヒトの癌の約半数で変異の見られる代表的な癌抑制遺伝子である *p53* は転写因子であり、その標的遺伝子を介して細胞周期の停止、アポトーシスの誘導、DNA 修復といった様々な機能を発揮する。そして、これら標的遺伝子を複合的に制御することによって、*p53* は癌抑制遺伝子として機能している。しかし、現在までに、100 以上存在すると推測されている *p53* 標的遺伝子の内、まだその半数程しか明らかになっていない。したがって *p53* の機能の全貌を解明するには、未知の *p53* 標的遺伝子の同定および、個々の標的遺伝子の機能解析が必須である。これら標的遺伝子の解析を通して、発癌機構の解明のみならず、癌の診断や治療へ応用することを最終的な目標とし、研究を行った。

これまで *p53* の標的遺伝子の検索方法としては Yeast Enhancer Trap 法、Differential Display 法等が用いられてきた。本研究の特徴として、*p53* により発現誘導を受ける遺伝子群を網羅的にスクリーニングするため、cDNA マイクロアレイを利用した点があげられる。変異型 *p53* 遺伝子を有する脳腫瘍の細胞株である U373MG に、正常型 *p53* 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (Ad-*p53*) と、対照群として

*LacZ* 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (Ad-*LacZ*) を感染させ、時系列で RNA を回収、これらを標識化してプローブとして利用し、cDNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、コントロールと比較して Ad-p53 を感染させた系で mRNA の顕著な発現誘導が見られた遺伝子群を p53 標的遺伝子の候補として選別し、それらの遺伝子について RT-PCR を施行することにより、cDNA マイクロアレイの結果を確認した。

本研究ではその中のひとつである *p53RDL1* (p53-regulated receptor for death and life) を新規 p53 標的遺伝子として単離、機能解析を行った。この遺伝子は p53 により発現誘導される EST のひとつとして選択された。まず、EST の配列をもとに cDNA ライブラリースクリーニングを行い、mRNA の全長および全アミノ酸配列を決定した。その結果、*p53RDL1* は、C 末側に death ドメインを有する 1 回膜貫通型タンパク質をコードし、軸索誘導および神経系アポトーシスに重要な働きを持つラットの *Unc5H2* と高い相同性 (アミノ酸配列で 92% が一致) を有していることがわかった。また、イントロン 1 に存在する p53 結合候補配列に p53 タンパク質が結合することや、reporter assay により p53 依存性に発現が誘導されることが明らかとなり、p53 の直接の標的遺伝子あることが証明された。

アンチセンスオリゴにより *p53RDL1* の発現を抑制すると、p53 依存性のアポトーシスが抑制され、またアデノウイルスを用いた *p53RDL1* 遺伝子導入は、Glioblastoma 細胞株に対して顕著にアポトーシスを誘導した。このことから、*p53RDL1* は p53 依存性のアポトーシス誘導に重要な新しい因子であることが推測された。また、この *p53RDL1* によるアポトーシス誘導には、カスパーゼを介した 412 残基のアスパラギン酸での切断による活性化が必須であることを証明した。

さらにこれらのメカニズムを解析するために、*p53RDL1* がレセプターであることに着目した。まず、*p53RDL1* と高い相同性を持つラット *Unc5H2* のリガンドである *Netrin-1* のリコンビナントタンパク質を作製した。GST-pull down assay にて *p53RDL1* と *Netrin-1* は実際に結合する事、また、その結合によって、*p53RDL1* の 412 残基のアスパラギン酸での切断が阻害され、*p53RDL1* および p53 依存性アポトーシスが顕著に抑制されることを明らかにした。またこの現象は神経前駆細胞を用いた実験においても確認された。

*Netrin-1* とそのレセプターは、神経系の発生、分化において、軸策の進展する方向性を決定する際に重要な役割を示すことが知られている。また近年になって、DCC や *UNC5H* といった *Netrin-1* のレセプターが dependence レセプターとして機能し、リガンドの非存在下においてアポトーシス誘導に関与すること、および *Netrin-1* がレセ

プター存在下において癌遺伝子として機能していることが報告された。つまり、Netrin-1 とそのレセプターは、細胞を生存させる機能と、細胞死を誘導する機能の両方を、そのリガンドの結合状態によって制御している可能性がある。興味深いことに、p53RDL1 もラット Unc5H2 と同様 Dependence receptor として機能していた。このことは p53 が、*p53RDL1* の発現誘導を介して、細胞の生死のバランスを決定している可能性を示唆するものである。

以前より p53 が神経系アポトーシスに重要な役割を果たすことが示唆されていたものの、その詳細なメカニズムは十分に解明されていなかった。今回、Netrin-1 が p53RDL1 を介して神経系細胞における p53 依存性アポトーシスを抑制することが明らかとなったことから、p53 による軸索誘導関連因子の制御機構の研究が進むことにより、神経系細胞のアポトーシス誘導における p53 の役割が明らかになるものと考えている。

現在、p53 を用いた遺伝子治療が実際の臨床の場で行われているが、期待していたほどの効果は認められていないという問題がある。その原因の一つとして、p53 は様々な機能を発揮する能力を持つため、遺伝子導入によって増殖停止のみをもたらす腫瘍が残存するという現象がある。癌治療法として外来遺伝子導入を考えた場合、p53 そのものを用いるよりむしろ、その目的に沿った機能(アポトーシス誘導能)を有する標的遺伝子を導入する方がより効果的ではないかと考えられる。p53 の標的遺伝子の単離・機能解析を通して、癌細胞に対し高い治療効果を持つ遺伝子を同定できれば、これまでにない新たな可能性が開けるものと期待される。

臨床応用という点で、本研究は、*p53RDL1* 遺伝子導入は脳腫瘍に対する新しい治療法の可能性を示唆し、また Netrin-1 による p53 依存性アポトーシスの抑制は神経変性疾患・神経損傷などに対する新しい治療法の開発へと発展する可能性を示したものとする。