

[別紙 1]

論 文 内 容 の 要 旨

論文題目： K 選択標的遺伝子の探索によって得られた 14-3-3 σ 遺伝子の機能と発現に関する研究

指導教員 北村 俊雄 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

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 佐藤 博之

癌は遺伝子の病気であり遺伝子異常の蓄積によって発症する。この多段階発癌は古くから「自然選択によるクローン選択での進化の過程」と提唱され、進化生物学の概念が導入されてきた。1967年 MacArthur と Wilson は、離島における生物種の進化を説明する際の環境による自然選択のモデルとして「 r 選択と K 選択」を提唱した。 r 選択は、個体密度が低く栄養が充分にある状況で作用し、増殖率“ r ” (intrinsic growth rate) が最も大きい個体を選択される。一方 K 選択は、個体密度が高く十分な栄養などが得られない状況で作用し、ある生物種がある環境で生存出来る最大の個体数 (carrying capacity of the environment) “ K ” 値が大きい個体を選択される。Cavalier-Smith は、この考えを原生生物に当てはめ、 K 選択下では細胞が大きく DNA 含量が多い個体が生存に有利で、 r 選択下では増殖に適した小さく DNA 含量の少ない個体が有利と推論した。そして千勝らは、ラット胎児線維芽細胞 (rat embryo fibroblast, REF) に *c-myc* と *EJ-ras* を導入する発癌モデルに「 r 選択と K 選択」を応用し、 r 選択では *p53* のヘテロ接合性消失 (loss of heterozygosity, LOH) クローンが、 K 選択では大型の多倍体クローンが優位性を獲得することを報告し、進化生物学の概念である「 r 選択と K 選択」が発癌モデルにも有用であることを示した。

そこで今回私は、千勝らが用いた実験系を利用して K 選択下に腫瘍細胞に選択優位性を付与する遺伝子を単離することを試みた。細胞は REF に *c-myc* と

EJ-*ras*(活性化 H-*ras*)を導入し樹立された 2 倍体のフォーカス形成細胞 MR8 を使用した。レトロウイルスベクター pMXI を用い、すでに K 選択を受けた MR8 細胞より cDNA ライブラリーを作製した。パッケージング細胞 Plat-E を用いレトロウイルス化し、MR8 親株細胞に感染させた後、*r* 選択もしくは K 選択を行った。2 週ごと cDNA を回収増幅し、選択されたクローンに組み込まれた cDNA についてダイレクトシーケンスを施行したところ、14-3-3 σ 遺伝子が複数の培養から検出された。

14-3-3 σ 蛋白は 14-3-3 ファミリー蛋白の 1 つで上皮系細胞にのみ発現を認め、p53 によって転写が活性化される。そして、cdc2 / cyclin B 複合体を細胞質に留めて G2 期に細胞周期を止める作用を持つ。また、臨床的には乳癌などでその発現低下が多数報告されていることから、癌抑制蛋白と考えられている。その一方で、14-3-3 σ 蛋白は BAD や BAX を不活化する抗 apoptosis 作用も持ち合わせており、膵臓癌などでその発現上昇が報告されてもいる。そこで、14-3-3 σ 遺伝子の発現について、REF、MR5 と MR8 細胞の親株及び *r* 選択と K 選択された細胞につき半定量的 RT-PCR で解析を行った。他の 6 種の 14-3-3 ファミリー遺伝子とは違い、14-3-3 σ mRNA の発現は *r* 選択で著明に低下し、K 選択(特に倍数移行すなわち 4 倍体への移行を示した細胞)で亢進しており、real-time RT-PCR ではその差は 20 倍以上であった。蛋白レベルでも、REF、親株、*r* 選択された細胞では発現を認めなかったが K 選択後には発現を確認できた。

また、p53 遺伝子変異との関連を検討するために、p53 に点突然変異を持ち高率に p53 LOH となる MR5 細胞の亜株についても 14-3-3 σ の発現を解析した。その結果、p53 LOH の出現と 14-3-3 σ の発現変化との間には関連は認められなかった。一方、K 選択下での倍数移行と 14-3-3 σ の高発現との関連性が認められた。14-3-3 σ の強制発現が細胞を多倍体化するとの報告があり、4 倍体の出現に 14-3-3 σ 高発現が関与した可能性がある。ただし MR9 細胞由来の 4 倍体細胞や、MR8 を短期間 K 選択した後に亜株化した 4 倍体細胞では、14-3-3 σ の高発現は認められず、14-3-3 σ 高発現が 4 倍体細胞の維持に不可欠なものではないと考えられた。

次に、K 選択下に 14-3-3 σ 高発現が選択優位性を付与するかどうか、またその機序について検討した。まず、14-3-3 σ 遺伝子を IRES-GFP 付のレトロウイ

ルスベクターpMXs-IG で MR5 親株細胞に導入後再度選択の実験を行った。その結果 14-3-3 σ 遺伝子導入細胞の K 選択の極早期には優位性が認められた。機序に関しては、同様の方法で 14-3-3 σ 遺伝子を導入した MR5、MR8 細胞で、actinomycin D などの薬剤や血清、糖飢餓などの低栄養状態で誘導される apoptosis への拮抗作用を解析した。しかしコントロールとの間に明らかな差を認めず、また同様に細胞周期停止作用も検討したが、G2 停止作用は確認できなかった。

最後に K 選択における 14-3-3 σ 高発現の機序について解析した。まず、K 選択における 14-3-3 σ 遺伝子の発現亢進には前記の通り p53 は無関係であると考えられたので、ユビキチン・プロテアソーム経路での分解作用の関与を検討した。MR8 細胞の親株と、r 選択および K 選択後の細胞にプロテアソーム阻害剤 MG132 を添加後 14-3-3 σ 蛋白の発現を観察したが、ユビキチン・プロテアソーム経路の関与も否定的と考えられた。

乳癌などの多数の癌において 14-3-3 σ 遺伝子の CpG アイランドのメチル化がその発現低下と関連して報告されている。ラット 14-3-3 σ 遺伝子にも ATG より 85 塩基 5' 側から 622 塩基 3' 側の部位に、Gardiner-Garden の基準による CpG アイランドが存在するので、そのメチル化状態を bisulfite シークエンス法で確認した。その結果、ATG より 5' 側の領域において、r 選択された細胞では著明なメチル化が、K 選択され倍数移行した細胞では著明な非メチル化が観察された。r 選択された細胞に 5-aza-2'-deoxycytidine 処理を行ったところ、脱メチル化とともに発現が亢進することを認め、発現抑制にメチル化が関与していることが確認できた。PCR 産物のクローン化による各アレルの解析では、REF や親株ではそれぞれ、21.1%、27.5%と同程度のメチル化だったが、r 選択後には 97.5%のメチル化となり、K 選択後には 0.0%だった。選択に伴うメチル化状態の変化については E-cadherin の報告があるが、r と K 選択によるメチル化の変化ほど極端な変化を示した報告はない。そして MR5 細胞を亜株化した細胞でも同様の解析を行ったところ、メチル化状態と 14-3-3 σ 発現レベルの間に相関を認めた。つまり、r 選択後はほぼ全てがメチル化し発現が低下した。一方 K 選択後は、倍数移行する群と 2 倍体を維持する群に分かれたが、前者では脱メチル化が進行し発現亢進する傾向が認められ、後者ではメチル化が進行し低発

現のままだった。中でも高度にメチル化した細胞では *K* 選択下に脱メチル化することはなく、メチル化状態は不可逆性であった。これらの観察から、癌細胞のメチル化には可塑性と不可逆性の 2 つの側面があることが示された。**14-3-3 σ** のメチル化状態は、乳癌などではメチル化、膵臓癌などでは非メチル化と癌種によって両極端に分かれる。今回の結果によって、癌における CpG アイランドのメチル化状態は、由来する組織の違いではなく、発癌過程に受ける選択様式の違いが関わっている可能性が示された。

まとめ

今回、私は *K* 選択標的遺伝子の候補として **14-3-3 σ** 遺伝子を単離し、その発現解析から *K* 選択下に脱メチル化と高発現が、*r* 選択下にメチル化と発現低下が誘導されることを見出した。多段階発癌におけるメチル化と選択様式の密接な関連を示唆するとともに、メチル化が持つ可塑性と不可逆性の 2 つの側面を示した。癌遺伝子導入による REF の発癌モデルは古典的実験系であるが、ジェネティクスのみならず、エピジェネティクスの実験モデルとしても今後期待される。