

論文の内容の要旨

論文題目 **Sirt1** 作用阻害による **ATM-Chk2** シグナル経路を介したヒト癌細胞における細胞老化様増殖抑制効果

指導教官 大内尉義教授

東京大学大学院医学研究科

平成14年4月1日入学

医学博士課程

生殖発達加齢医学専攻

氏名 大田秀隆

【序論】我が国の高齢化は世界でも類を見ない速度で進行しており、現在5人に1人が65歳以上の高齢者となった。これら高齢者を健康で自立した状態に保つことが重要であり、そのため老化予防や健康長寿につながる研究への期待が高い。こうした社会要請もあり、分子生物学の分野では老化・寿命の研究が近年急速な進歩を遂げつつある。その中で、**NAD⁺** (nicotinamide adenine dinucleotide) 依存性脱アセチル化酵素 **Sir2** (silent information regulator 2) は、老化・寿命の重要な制御因子として注目されている。**Sir2** は酵母の長寿遺伝子として発見され、その後線虫、ショウジョウバエにおいても老化・寿命を制御することが実験的に証明されている。**Sir2** は古細菌から哺乳類に至るまで高度に保存されており、酵母 **Sir2** は、**mating-type loci**、テロメアやリボゾーマル DNA の繰り返し配列に作用し、遺伝子のサイレンシング機能を担っている。このサイレンシング機能は、ヒストン **H2A**、**B**、**H3**、**H4** の特定リジン残基を脱アセチル化することにより発揮される。つまり **Sir2** は、ヒストンを脱アセチル化することにより、その染色体は、よりコンパクトな、閉じられた構造をとることになり、サイレンシング機能を示すのである。これらの作用により、**Sir2** は、DNA 修復や組み換えを通して、寿命および加齢を制御していると考えられている。

現在、**Sir2** は哺乳類にも存在することがわかっており、そのホモログである **Sirt** ファミリーは、現在7種類同定されている。その中でもっとも酵母 **Sir2** と構造が類似している **Sirt1** は、**NAD⁺** 依存性蛋白脱アセチル化酵素として機能する。核内転写因子であり、**p53**、**Ku-70**、**Foxo**、**PPAR- γ** 等の分子と相互作用することにより細胞周期、細胞分化、アポトーシス、代謝等多様な生物学的作用を発揮することがわかっている。それらの相互作用する分子の中でも、癌抑制遺伝子である **p53** 蛋白は、老化やアポトーシスにおいて主要な役割を演じている。細胞老化という面でも、**p53** 蛋白は重要な役割を演じており、細胞老

化度が進むにつれてその発現が上昇し、細胞が不可逆的な静止状態になることがわかっている。その p53 蛋白を Sirt1 は脱アセチル化し、その活性を落とすことにより、細胞増殖、アポトーシスや老化を制御することがわかっている。また細胞老化の制御因子として重要な、TTAGGG の繰り返し配列をとるテロメアも、Sirt1 を過剰発現するとテロメラーゼである hTERT の発現を亢進させ、その短縮を遅らせることが報告されており、これらの作用が細胞の長寿形質に大きく寄与しているのではないかと考えられている。

近年、Sir2 の活性を上げる物質として赤ワインに含まれるポリフェノールの一成分であるレスベラトロールが同定された。これらは、直接 Sir2 に作用することにより、その活性を上げることがわかっている。同様に Sir2 阻害薬も同定されており、それらは Sir2 の脱アセチル化酵素活性を特異的に阻害することが示されている。これらの物質は HDAC (histone deacetyltransferase) クラス III 阻害薬に属している。クラス I、II HDAC 阻害薬であるトリコスタチン A は、ヒト癌細胞の増殖抑制効果があり、また白血病患者に対して実際に臨床研究もなされているが、クラス III 阻害薬は、いまだなされていない状況である。

現在、細胞老化という現象について、v-ras や c-myc といった癌原性遺伝子を正常細胞に導入すると、癌化せずに細胞老化現象を示す基礎実験があり、これらの現象は、癌に対する防御システムとして働いている可能性があると考えられるようになった。また逆に、癌細胞においても、放射線や抗癌剤のような増殖抑制作用に、細胞老化様形質が大きく寄与していることがすでに報告されている。今回これらの現象をもとに、長寿遺伝子である Sirt1 を標的に、癌細胞内で阻害することにより、つまり HDAC クラス III を阻害することにより、それに類似した現象が起きうるかを検討した。

近年の研究で、ATM-Chk2 シグナル経路が細胞老化でも重要な役割を演じていることが報告された。ATM (ataxia-telangiectasia mutated gene) はヒト早老症の原因遺伝子の一つであり、臨床的に AT 患者は、小脳失調、免疫不全、性腺萎縮、放射線感受性増強や早老症を呈する。DNA 障害性薬剤、放射線、活性酸素、テロメア構造欠損、染色体構造の変化により活性化され、引き続く二量体の解離がこれらシグナル経路の最初の段階となる。以後 Chk1 や Chk2 のような細胞周期を制御する分子へとシグナルが伝達される。以上の背景をもとに、今回の研究では、主にヒト癌細胞である MCF-7 細胞、H1299 細胞を用いて、以下のことを検討した。すなわち、(1) HDAC クラス III 阻害である、Sirt1 の阻害により、ヒト癌細胞において細胞増殖抑制が起こりえるのか、検討した。次に、(2) その増殖抑制にともない、各癌細胞が細胞老化様形質をとりえるのかを検討した。そして最後に、(3) その増殖抑制はどのような細胞周期制御因子によりコントロールされているのかを検討した。

【結果】 Sirt1 の脱アセチル化作用を抑制するため、サーチノール、スプリトマイシン、M15 等の HDAC class III 阻害剤、Sirt1 dominant negative 体、および Sirt1 siRNA を用

いた。用いた細胞株は主に MCF-7 細胞 (human breast cancer cell、p53 wt)、H1299 細胞 (human lung cancer cell、p53 null) である。細胞増殖曲線で 10 日間観察した両細胞系で増殖抑制が起きており、また BrdU および FACS analysis を用いても同様に Sirt1 作用阻害により主に G1 期休止を起こしていることが示された。MCF-7 細胞 関しては顕微鏡所見および FACS analysis により macrophage 様多核細胞体および染色体異常が増えることが観察された。細胞老化のマーカとして Senescent-associated (SA) - β galactosidase assay、PAI-1 高発現、および成長因子に対する MAPK signal pathway を介した c-jun/c-fos の活性反応低下を用いた。今回 Sirt1 抑制をした両癌細胞系列でこれらの老化マーカーを用いて、細胞老化様形質を示していることが確認された。Sirt1 の主な制御因子に p53 がある。サーチノールによる作用のみでは p53 はアセチル化されておらず、サーチノールおよび HDAC class I、II 阻害剤を同時処理した際に p53 のアセチル化の増強が観察された。シスプラチンでは p53 が強く誘導されているのに対して Sirt1 抑制のみでは p53 は誘導がほとんど見られなかった。また p16、p21 についても同様に強い誘導が見られなかった。これらのことにより p53 は Sirt1 抑制による細胞増殖抑制に主な役割を演じてないことが示唆され、それを確認するため H1299 細胞 以外に各種の p53 形態をもつ細胞株 (LOVO、DU145、HT29、PC3、Hela、COS7 細胞) を用いて細胞増殖に大きな差がないことを確認した。p53 dominant negative form および p53 anti-sense を用いて p53 の作用を抑制するとエトポシドはこれらの作用が大きく抑制されるのに対し、サーチノール作用ではそれらの影響をほとんど受けないことを確認した。以上のことより p53 以外の細胞周期制御が考えられた。ATM が近年テロメアの維持ばかりでなくその他のストレスを受けたときにも活性化されることが示され、細胞老化の制御経路の一つとして報告された。Sirt1 抑制により ATM - Chk2 - Cdc25A/B/C - cdc2 - Rb の活性化が確認された。更に p27 の発現上昇も確認された。この経路の活性化を更に確認するために ATM siRNA、ATM の機能を失活した kd 遺伝子 (kinase dead) 、および Chk2 dominant negative 体を用いてこの経路を抑制すると Sirt1 阻害作用による細胞増殖抑制は回避されることも示した。近年報告されたように赤ワインの成分であるポリフェノールの一種レスベラトロールが Sirt1 活性化剤として作用することが報告されている。このレスベラトロールを作用させるとシスプラチンを作用させただけの細胞と比較すると ATM - Chk2 経路の活性化が抑制されていることも確認された。

【結論】 今回の研究により Sirt1 抑制により主に癌細胞が細胞増殖抑制を起こし、細胞老化様形質をとっていること、さらにそのシグナル経路として p53 ではなく、ATM - Chk2 経路を介して増殖抑制が制御されていることを示した。癌細胞抑制機構としての細胞老化現象、そして細胞老化現象の解明が一つの癌治療戦略となりうる可能性を示唆している。