

論文の内容の要旨

論文題目 細胞増殖抑制ファミリータンパク質 ANA の発現と機能解析

指導教員 山本 雅 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

米田 光宏

TGF- β (transforming growth factor-beta) シグナルは肺癌を含む癌の発生および進展に関与していることが明らかとなっている。TGF- β は、腫瘍発生の初期には腫瘍細胞の増殖を抑制し、ある程度進行した癌細胞になると増殖抑制作用が失われ、浸潤・転移を促進する。実際に、ある種の腫瘍細胞においては、TGF- β 受容体はしばしば発現が抑制されるか、もしくは TGF- β 受容体自身に遺伝子変異が起きており、TGF- β による細胞増殖制御に異常が生じている例がある。TGF- β で伝達されるシグナルの多くは Smad と呼ばれる分子を介する。特異型 Smad である Smad2, Smad3 は活性化された I 型受容体に結合し、I 型受容体によって直接リン酸化を受ける。リン酸化された Smad2, Smad3 は I 型受容体から離れ、共有型 Smad である Smad4 と複合体を形成し核内に移行する。この複合体は核内で種々の転写因子や p300 などの転写共役因子と結合することによって、標的遺伝子の転写を調節する。

ANA/BTG3 は、Tob, Tob2, BTG1, PC3/TIS21/BTG2, PC3B/BTG4 と細胞増殖抑制タンパク質ファミリー (Tob/BTG ファミリー) を形成している。ANA/BTG3 は、Tob/BTG ファミリーに相同性のある分子として同定され、胎生期の脳の neuroepithelial area によく発現していることから、ANA (Abundant in Neuroepithelium Area) とも呼ばれている (以降は ANA と呼ぶ)。Tob/BTG ファミリータンパク質は、以下に示す 3 つの類似点を有している。(I) N 末端側約 110 アミノ酸からなる領域がファミリー間で高い相同性を示し、各分子の細胞増殖抑制活性に必須な領域である。(II) 培養細胞に強制発現させると細胞増殖を抑制する。(III) Smad, Cnot7, HoxB9 などの転写因子、及び転写調節因子と相互作用する。特に ANA, Tob, Tob2, PC3B/BTG4 に関しては、細胞周期の G0/G1 期から S 期への進行を阻害することが示されている。これまでに Tob/BTG ファミリータンパク質の機能が細胞の増殖・癌化に与える影響について、いくつかの

知見が得られている。PC3/TIS21/BTG2 は癌抑制遺伝子 *Rb* や *p53* と協調しあうことで、活性化型 *Ras* による細胞の形質転換を抑制することが示された。Tob については Erk1, 2 による Tob のリン酸化が Tob の増殖抑制活性を制御し、*tob* 遺伝子欠損マウスは高頻度に腫瘍を形成するという報告がなされている。このような Tob/BTG ファミリータンパク質の分子機能の異常は、実際にヒト癌の発症においても関与している可能性が示唆されている。Tob は肺癌で発現低下が認められ、予後の悪い甲状腺乳頭癌や肺腺癌では不活性化した Tob に相当するリン酸化の亢進が確認され、甲状腺未分化癌では Tob の発現が検出できない程度にまで低下していた。BTG2 の発現低下も乳癌、腎細胞癌や腎細胞癌由来細胞株などで観察されている。このように Tob/BTG ファミリー分子は、細胞増殖・腫瘍形成・癌と密接に関係していると考えられるが、その分子メカニズムやヒト癌の発症への具体的な影響については、まだ不明な点が多い。

日本人の肺癌による年間死者数は約 6 万 2 千人であり（癌で亡くなった方は約 33 万人）、1993 年からは肺癌は男性の臓器別癌死亡数の第 1 位となり、女性では胃癌に次いで第 2 位となっている。肺癌は、組織学的に小細胞癌と非小細胞癌の 2 つの型に大きく分類される。非小細胞肺癌は、さらに腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌、腺扁平上皮癌などの組織型に分類される。中でも、腺癌は我が国で最も発生頻度が高く、男性の肺癌の 40%、女性の肺癌の 70%以上を占めている。世界的にも肺癌を発症する人は増加傾向にあり、従来の外科手術や化学療法および放射線治療に加え、分子標的治療薬が新たに開発されたにもかかわらず、肺癌患者の 5 年生存率は 25～30%といわれている。喫煙は、*K-ras*, *p53* などの遺伝子変異をもたらすため、肺癌との関連がいわれているものの、喫煙者のせいぜい 15%くらいにのみ肺癌は発症する。また、発癌には *Rb* タンパク質や *p53* タンパク質の活性調節機構の破綻が重要であり、肺癌においても *p53* 遺伝子の変異は小細胞癌のおよそ 90%、非小細胞癌の約半数に、*Rb* 遺伝子の不活性化は小細胞癌の 90%、非小細胞癌の 15%にみられ、*Rb* 経路の一つと考えられる *p16* 遺伝子の不活性化は小細胞癌では稀だが、非小細胞癌ではおよそ 70%に認められる。しかし、これら *p53*・*Rb* 経路の不活性化が全ての肺癌検体で認められるわけではない。このように、肺癌発症の分子機構は未だ不明な点が多く、新たな治療法の確立が待望されている。

本研究では、Tob/BTG 増殖抑制因子ファミリーに属する ANA の個体、細胞レベルでの解析を行った。個体レベルでの解析のために、ANA 遺伝子座の Tob/BTG ファミリータンパク質に相同性の高い領域をコードするエクソンを *NLS-LacZ* 遺伝子およびネオマイシン耐性遺伝子と置換することにより、ANA 遺伝子欠損 (*ANA*^{-/-}) マウスを作製した。*ANA*^{-/-} マウスは、メンデルの法則に従った割合で生まれ、見かけ上、正常に生育する。このマウスについて、野生型マウスとの

全身組織構造の比較検討を網羅的に行なったが、*ANA*^{-/-}マウスにおいて、肺を含む種々の組織に特に目立った異常は見られなかつた。しかし、長期飼育した*ANA*^{-/-}マウスでは、高頻度に腫瘍形成が観察され、肺の腫瘍については組織学的に腺腫および腺癌であると診断された。肺において、BTG2, Tob, Tob2 が気管支上皮細胞に限局、もしくは気管支上皮細胞優位に発現していた。一方でANAは、I型肺胞上皮細胞や気管支上皮細胞には発現は認められず、腺癌の主な由来と考えられている、II型肺胞上皮細胞に特異的に発現していることが明らかになつた。*ANA*の発現量と肺癌の関連を調べるために発現解析を行つたところ、*ANA*遺伝子は正常肺組織に高い発現を示す一方で、ヒト肺癌由来細胞株および肺癌組織、特に肺腺癌組織において、発現が低下していることが分かつた。これらのこととは ANA がマウス個体において腫瘍、及び腫瘍形成を抑制する作用を持っていることを示しており、ヒトの癌発症にも関わる可能性を示唆している。肺癌以外でも *ANA* 遺伝子そのものが発現低下している例が口腔の扁平上皮癌由来細胞株の 88.9% (8/9)、口腔の扁平上皮癌の 60.0% (12/20) すでに確認されている。*ANA* 遺伝子のホモ欠失の例も、本研究で用いた肺癌由来 2 細胞株 (Ma17 細胞と HCC366 細胞) および、口腔の扁平上皮癌の 1 症例で同定されている。以上のように、*ANA* 遺伝子の発現低下は肺癌を含む複数の癌で認められており、実際に腫瘍形成や癌発症の原因となっていることを明らかにしていくことが重要と考えられる。

TGF-β刺激後に誘導される、サイクリン依存性キナーゼ阻害分子である

21^{CPI}

や

15^{INK4B}

の発現には、Smad2が主要な役割を果たしており、Smad2変異と癌細胞の異常増殖との関わりが深いことを示す報告が数多く存在する。一方、TGF-βによる腫瘍進展を有利にする働き、すなわち細胞外マトリックス・プロテアーゼなどの発現誘導はSmad3依存性であり、Smad2の関与は小さい。本研究により、ANAはSmad2とは結合せず、Smad3と特異的に結合することが明らかになつた。また、TGF-β response elementでの転写活性をみるLuciferase assayにおいて、Smad3を共発現させた場合でも、転写の活性化を抑制していた。さらに、肺癌由来細胞株にANAを強制発現させると、増殖にはあまり大きな影響はないにもかかわらず、浸潤・転移に関わると考えられているTGF-β標的分子のMMP2やPAI-1の発現量が減少することを見いだした。従つて、ANAは癌細胞の増殖には大きく関与せず、Smad3と結合することにより、選択的に癌の浸潤・転移に関わるTGF-βシグナルを制御している可能性が強く示唆された。PAI-1は、TGF-β刺激後の転写活性化や発現の制御は、Smad2に比してSmad3により依存的であることが知られており、ANAによるPAI-1発現制御は、さらにその可能性を支持している。Smad3の制御に影響を与えるような異常は癌細胞の浸潤・転移と関わりが深いと考えられるが、現在までにヒトの腫瘍においてSmad3自身の遺伝子変異は報告さ

れていない。ANAがSmad3の制御の候補分子になるかどうか検討するのは大変興味深い。

ANAはSmad3と結合し、TGF- β シグナルを抑制することによって、肺腺癌を含む腫瘍の進展、とりわけ浸潤・転移に関与する可能性が示唆された。本研究による知見は、ANAの発現低下と肺腺癌の浸潤、転移能の獲得に深い関わりを想像させるものであり、今後の癌研究にとっても重要な指標になると考えられる。*ANA*^{-/-}マウスにおいて肺腺癌を含む腫瘍の形成が高頻度に観察されたが、肺以外の腫瘍についても実際にそれらが腫瘍であるかどうか、そしてその場合の悪性度を解析していくことで、ANAが癌細胞の浸潤、転移の制御に関わっているのかを確認する必要がある。また、ANAと癌、特に肺腺癌の進展との関連性の追求から、今後癌の診断や治療法を探る上で重要な知見が得られるものと期待される。