

## 論文の内容の要旨

論文題目 BH3-only タンパク Noxa の機能とその臨床応用法の検討

指導教官 光嶋 勲 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

鈴木 小織

本研究は、BH3-only タンパクであり p53 介在性アポトーシス誘導の実行因子である Noxa と Puma の作用について解析したもので、これにより、細胞に発現させた場合 Puma はどの細胞に対しても強力にアポトーシスを誘導するのに対し、Noxa はがんの形質をそなえた細胞にのみアポトーシス誘導することが明らかとなった。このことから、Noxa がある種のがんにおいては遺伝子治療の対象として有用である可能性が示唆された。

### 培養細胞に対する Noxa および Puma のアポトーシス誘導

まず NIH3T3 細胞にレトロウイルスベクターを用いて Noxa ないし Puma を発現させると、Puma はいずれの細胞にもアポトーシスを誘導したが、Noxa は発現させるだけではアポトーシスを起こさず、がん遺伝子 E1A を発現させた 3T3 細胞 (E1A-3T3 細胞) にのみアポトーシスを誘導した。

次に p53 介在性アポトーシス経路において観察される Bax の多量体化および活性化について検討したところ、E1A-3T3 細胞ではこれらが Noxa の発現がなくとも生じており、Noxa の発現により増強されることが明らかとなった。一方、Puma は E1A 発現の有無に関らず細胞内の Bax の多量体化・活性化をもたらし、強力にアポトーシスを誘導することが示唆された。

## 培養細胞に対する Puma の強力なアポトーシス誘導のメカニズム

前述の Puma によるアポトーシス誘導は、カルシウムキレート剤およびカルパイン阻害剤添加により抑制をうけることが判明した。細胞内カルシウム濃度は主に小胞体(ER)から放出されるカルシウムイオンにより調節されていることが知られているため、ER 上でカルシウムの放出に関与する二つの受容体（イノシトール 3 リン酸受容体(InsP<sub>3</sub>R)、リアノジン受容体)の阻害剤を負荷して Puma によるアポトーシス誘導を検討したところ、InsP<sub>3</sub>R 阻害剤によってのみアポトーシスが一部阻害された。このため、ER より InsP<sub>3</sub>R を介して放出されるカルシウムイオンがカルパインを活性化することが示唆された。さらにカルパインは caspase-12 を活性化することが知られており、この caspase-12 が ER を介したアポトーシス誘導を担うという報告がある。実際、本実験でも Puma の発現により caspase-12 の活性化が見られた。

以上より、ある種の細胞では Puma が ER 上の InsP<sub>3</sub>R からのカルシウム放出を促し、さらにカルパイン活性化、caspase-12 活性化を通じて Bax の多量体化・活性化を強力に引き起こすという今まで未知であった経路を用いてアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。

## ヒト細胞に対する Noxa ないし Puma 発現によるアポトーシス誘導

E1A-3T3 細胞と NIH3T3 細胞をそれぞれがんの形質をもつ細胞と正常細胞のモデルのひとつとみなし、Noxa の選択的なアポトーシス誘導能が実際ヒトがん細胞にも起こりうるかどうかにつき検討した。

乳がん細胞株 6 種と正常乳腺上皮細胞、正常乳腺細胞株の計 8 種の細胞にアデノウイルスベクターを用いて Noxa、Puma を発現させコントロールと比較したところ、コントロールベクターそのものに感受性を示した乳がん細胞株 2 種を除き、残り 6 種全部に Puma はアポトーシスを誘導したのに対し Noxa は 4 種類の乳がん細胞株にのみアポトーシスを誘導することが判明した。

同様に、ヒト線維肉腫とヒト線維芽細胞の比較でも、Puma はいずれに対しても、Noxa は前者のみにアポトーシスを誘導した。

この Noxa に対する感受性の違いは、細胞内の Noxa 発現量には左右されず、また各種 Bcl-2 family タンパクの発現量にも Noxa 感受性を説明できるような明らかな特徴は見られなかった。

## 担がんマウスの作製と Noxa または Puma 遺伝子導入、p53 遺伝子導入との比較

*In vitro*にて Noxa ががん細胞にのみアポトーシスを誘導することが判明したため、次に *in vivo*での Noxa 発現がもたらす腫瘍への効果につき検討した。

Noxa 感受性である乳がん細胞株のひとつ、HBC4 細胞をヌードマウスの左右背部に皮下移植して担がんマウスを作製した。腫瘍が直径 6 mm を越えたところで、担がんマウスを 3 群(①Noxa 投与群、②Puma 投与群③p53 投与群)に分け、 $1 \times 10^8$  pfu/100 $\mu$ LPBS ずつ Noxa・Puma・p53 発現アデノウイルスベクターとコントロールベクターを左右それぞれに腫瘍内注射した。投与は、3 日毎に計 5 回行い、さらに約 10 日間経過観察した。

その結果、Noxa 投与群と Puma 投与群ではいずれもコントロールと比較して有意な腫瘍の退縮が観察された(いずれも  $p < 0.005$ )。p53 投与群では、コントロールと比べ p53 投与側で腫瘍体積比の変化に有意差がみられたものの( $p < 0.05$ )、Noxa や Puma を投与したものよりその差が小さかった。また、最初の約 2 週間はコントロールと同様に腫瘍が増大し、それ以降は腫瘍の成長が抑制されていた。

これらの腫瘍組織につき組織免疫学的検索を行ったところ、Noxa または Puma を発現させた腫瘍の組織では、アデノウイルスベクターが感染した細胞の大部分がアポトーシスを起こしている(それぞれ 81.0%、92.6%)ことが判明したが、p53 を投与した腫瘍組織では、必ずしも p53 が発現してもアポトーシスを生じていない(アポトーシスを生じている細胞は 49.6%)ことが明らかとなった。

以上より、Noxa および Puma は p53 と比較してより効率よく *in vivo* においてがん細胞にアポトーシスを誘導させることが判明した。

### ***In vivo* における Noxa の正常細胞に対するアポトーシス誘導**

HBC4 細胞で作製されたマウス皮下腫瘍は被膜に覆われており、腫瘍内投与したアデノウイルスベクターが被膜外に漏れ出すことがなかったことから、周囲正常組織への影響を調べるため、担がんさせていないヌードマウスの乳腺組織近傍に各アデノウイルスベクターを皮下注射して、Noxa および Puma 発現による影響を検討した。

その結果、Puma は皮下組織に顕著にアポトーシスを誘導する(感染細胞の 74.2%)のに対し、Noxa はほとんどアポトーシスを誘導しない(アポトーシスを生じた細胞は感染細胞の 3.5%)ことが明らかとなった。これは、*in vitro* で得られた Noxa のがん細胞特異的なアポトーシス誘導の結果と一致すると考えられた。

### **ミトコンドリアを介したアポトーシス誘導に対する Noxa の腫瘍特異的機構**

以上より、ヒト由来細胞においても Noxa ががん細胞に選択的にアポトーシスを誘導することが示唆されたため、そのメカニズムについて検討した。

前述の NIH3T3 細胞と E1A-3T3 細胞に関する考察から、がんの形質をもつ細胞では Bax の多量体化と活性化があらかじめ生じている可能性が見出されていた。このため、乳がん細胞株と乳腺上皮細胞（株）においても同様の現象が観察されるか調べた。

その結果、Noxa に感受性を示した乳がん細胞株のうち 2 種では、E1A-3T3 細胞と同様に Bax の多量体化と活性化が Noxa の発現が無くともいくらか生じており、Noxa の発現がこれらを増強させることが判明した。しかし、このメカニズムに合致しない乳がん細胞株も例外として存在し、また正常乳腺上皮細胞株では Noxa に非感受性であるにも関わらず Bax の多量体化・活性化が Noxa の発現により観察されたことから、必ずしも Bax の活性化の量だけでは Noxa に対する感受性が説明できない細胞種の存在も示唆された。

本研究から、まず NIH3T3 細胞において、活性化した p53 の下流で働く BH3-only タンパクのなかでも、ER の InsP<sub>3</sub>R を介したカルシウムの放出を促すことによりカルパイン、次いで Caspase-12 が活性化され、Bax の多量体化・活性化を増幅して強力にアポトーシスを誘導する Puma と違い、Noxa はある種の細胞において、もともといくらか生じている Bax の多量体化・活性化を増強させることによりゆるやかに細胞にアポトーシスを誘導させることが見出された。実際、E1A-3T3 細胞および複数の乳がん細胞株においてこの Bax の活性化があらかじめ生じており、がんの形質を獲得する過程にある細胞が、変異した自分自身をアポトーシスに向かわせるような正常の反応を示そうとしているように思われた。この残存する生理的な排除機構を促進させるように働くのが Noxa であり、Puma の誘導するアポトーシスとの違いであると考えられた。

しかしながら、細胞の Bax の活性化の量に依存して Noxa 感受性が規定されるという仮説では反応が説明できないがん細胞も存在し、また Noxa 非感受性である正常細胞でも Noxa の発現により Bax の活性化が観察されたため、Noxa が誘導するアポトーシスががん化した細胞の別の側面にも働きかけている可能性も示唆され、今後の更なる研究を要すると思われた。

さらなるメカニズムの解析など課題となる部分も多いが、Noxa が腫瘍細胞のみに選択的にアポトーシスを誘導させうる事が明らかとなり、その効果が p53 よりも効率的で、Puma と比較して正常細胞へ影響を及ぼさないと考えられることから、Noxa ががんの遺伝子治療のよい対象となる可能性が見出された。がん細胞に残存する正常な生体防御反応、すなわちがん細胞特有の弱点を突くという Noxa の性質を生かすためどのような遺伝子治療のベクターが望ましいか、についても今後検討すべき課題と考えられる。