

論文内容の要旨

論文題目

APC- β -catenin シグナルに対するヒト正常線維芽細胞の癌抑制機序の解明

指導教員 山本 雅 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

宇野 直輝

様々な発癌ストレスに対して正常細胞は細胞周期停止・細胞老化・細胞死を介して発癌を抑制する機能を有している。Wnt シグナルは大腸癌をはじめとする腫瘍の発症・進展に寄与することが知られているが、Wnt シグナルに対するヒト正常細胞の癌抑制機能はほとんど解明されていない。本研究は癌抑制遺伝子 APC の発現低下に対してヒト正常線維芽細胞が p53 依存的に細胞周期を停止することを明らかにした。またそのシグナル伝達経路が β -catenin-TCF に依存しないことを示唆した。

癌抑制遺伝子 APC の発現抑制あるいは安定型 β -catenin の過剰発現はヒト正常線維芽細胞の細胞増殖を阻害した。このことから、APC- β -catenin シグナルに対してヒト正常線維芽細胞は癌抑制機能を有することが示唆された。そのメカニズムを明らかにするため、細胞周期停止、細胞老化、及びアポトーシスについて検討した。

細胞周期解析の結果、癌抑制遺伝子 APC の発現抑制あるいは安定型 β -catenin の過剰発現はいずれもヒト正常線維芽細胞の細胞周期を G1 期で停止させることが明らかになった。また APC の発現抑制によって、サイクリン依存性リン酸化酵素阻害因子である p16^{INK4A}・p21^{Waf1}・p27^{Kip1} の発現増大、Rb の脱リン酸化、及び E2F1 の標的遺伝子の発現低下が認められた。

癌抑制遺伝子 p53 は細胞周期停止・細胞老化・細胞死を制御することで癌抑制機能を果たすことが知られている。そこで p53 の関与を検討した結果、APC の発現抑制あるいは安定型 β -catenin の過剰発現による細胞増殖抑制は p53 のノックダウンによって回避された。このことから、細胞増殖阻害はいずれも p53

に依存することが明らかになった。p21 は細胞周期停止に寄与する p53 の標的遺伝子として知られているが、p21 のノックダウンは APC のノックダウンによる細胞増殖阻害を回復させなかった。そのため、APC の発現低下による細胞周期停止には p21 以外の遺伝子が機能的に重要であると考えられた。

Oncogene-induced senescence は癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活性化に対する正常細胞の癌抑制機能として知られている。しかしながら、癌抑制遺伝子 APC の発現抑制あるいは安定型 β -catenin を過剰発現させたヒト正常線維芽細胞では細胞老化の表現型は認められなかった。このことは正常細胞の備える癌抑制機能を否定するものではなく、APC- β -catenin シグナルに対して、ヒト正常線維芽細胞は細胞老化ではなく細胞周期停止を介して癌抑制機能を発揮することを示唆している。

アポトーシスの関与については APC を発現抑制させたヒト正常線維芽細胞の培養過程で死細胞がほとんど観察されないことや Annexin(Ⅷ)アッセイによってアポトーシス細胞が認められなかったことから、APC の発現抑制によってアポトーシスは起こらないと判断された。

APC による β -catenin の分解はその癌抑制機能に極めて重要であることから、APC の発現抑制によるヒト正常線維芽細胞の細胞周期停止は β -catenin の安定化とそれに続く TCF4 の活性化を介すると予想された。しかしながら、APC の発現抑制によって β -catenin の安定化と核内移行が認められないことや TCF4 のドミナントネガティブ変異体の過剰発現によって APC による細胞増殖抑制が回復しないことなどから、APC の発現抑制による細胞周期停止は β -catenin/TCF4 に依存しないことが示唆された。 β -catenin に依存しない APC の癌抑制機能はあまり知られていないが、APC は β -catenin 以外の様々な蛋白質と相互作用することで β -catenin 非依存的機能も担っており、 β -catenin 非依存的に細胞周期を制御することが報告されている。APC の発現抑制によるヒト正常線維芽細胞の細胞周期停止が β -catenin-TCF4 に依存しないという発見はその点において新規発見と考えられる。

発癌ストレスに対する正常細胞の生理的応答を評価するにあたって、過剰発現系は内在性遺伝子の機能欠損以上の価値を有さない。APC の発現抑制による細胞周期停止が β -catenin に依存しないことが示唆されたことから、安定型 β -catenin の過剰発現は APC の発現抑制の結果を補強する根拠を失った。しかしながら、 β -catenin の変異は様々な悪性腫瘍で認められており、それに対する正常細胞の防御反応であると考えられることができる。

本研究によって、ヒト正常細胞が APC の発現低下という発癌ストレスに対して p53 依存的かつ β -catenin-TCF4 非依存的に細胞周期を停止させることで癌抑制機能を果たすことが示唆された。