

## 論文の内容の要旨

論文題目 : Induction of Anchorage-Independent Proliferation of Rat Embryonic Fibroblasts by Overexpression of Two G1 Cell Cycle Components Combined with mTORC1 Activation and its Mechanistic Basis

和訳 : mTORC1 の活性化と 2 つの G1 期細胞周期因子の高発現によるラット胎性線胎性線維芽細胞の足場非依存性増殖の誘導とその機構

指導教官 : 岡山 博人 教授

東京大学大学院医学系研究科 医学博士課程 分子細胞生物学専攻  
平成 19 年 4 月 入学  
氏名 : バーサンジャブ ウランビレグ

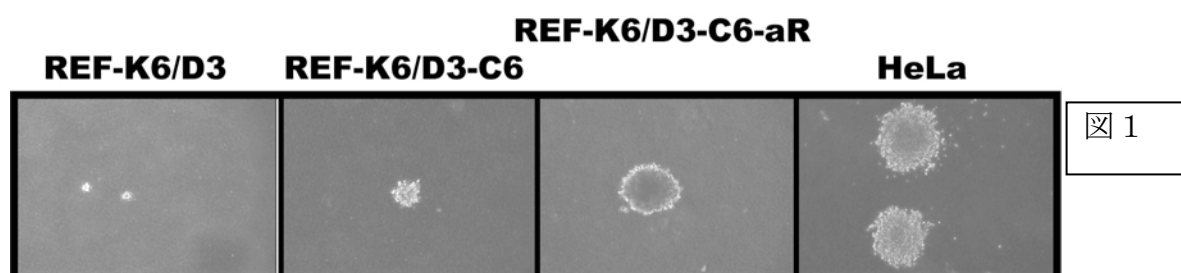
造血細胞を除くほとんどすべての細胞は、細胞外マトリックタンパクを足場にして増える。足場をなくすると、細胞は G1 期に停止し、死に至る。しかしながら、癌化した細胞では、足場がない状態で増殖できるようになり、この機能の獲得が癌細胞の造腫瘍能、転移・浸潤能の根底にあると考えられている。

細胞外マトリックスタンパクを認識する細胞膜のインテグリンから発せられた足場シグナルが、どの様なシグナル経路を伝わって、どの様な機構で細胞周期の G1 から S 期の進行を制御しているかに関しては、長年の研究にもかかわらず全く不明のままであった。最近当研究室でこの問題解明の突破口となる二つの発見がなされた。一つは、染色体 DNA の複製に必須で、染色体上の複製開始点に複製前複合体を形成する因子である Cdc6 が、Cdk 阻害因子の一つである p21<sup>Cip1</sup> が結合し不活性化された Cdk2 から ATP の加水分解エネルギーを利用して p21 を剥がし、Cdk2 を活性化する機能を有すること、二つ目は、酵母からヒトまで保存され増殖、エネルギー代謝およびアミノ酸貧富などのシグナルを伝達し mRNA の翻訳制御を行っている Tsc-Rheb-mTOR 経路が、直接 Cdk4/Cdk6 の活性を制御し細胞周期を制御する足場シグナルの主たる部分を伝達していること、更に RhoA によって足場依存性に活性化されるタンパクリン酸化酵素 Rock によって足場シグナルが直接 Tsc2 に伝達され

mTOR 経路を活性化していることが明らかになったことである。しかしながら、この経路の活性化のみでは、足場がない状態では Cdk2 の活性化が起これば細胞は増殖できず G1 期に停止したままで S 期を開始できない。

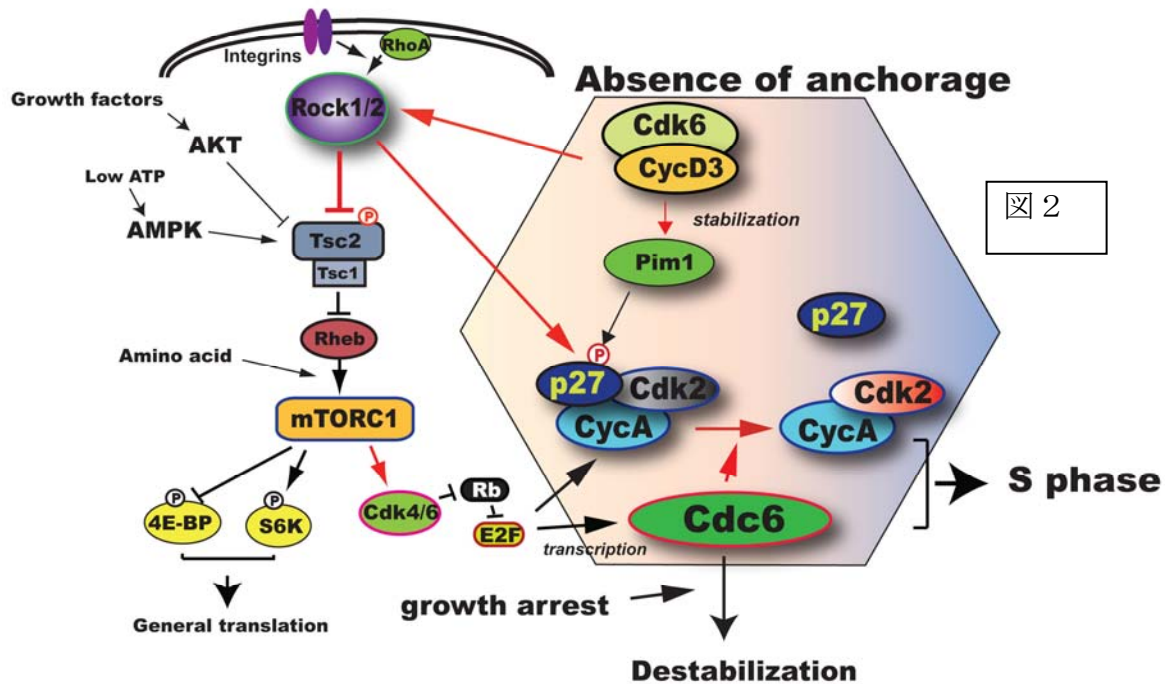
一方、発癌に伴う足場非依存性増殖能の獲得機構の解明を目指す一つのアプローチとして、G1 期細胞周期因子およびその関連因子の発現の人為的な操作によって持続的に足場非依存性増殖を誘導できる当該因子の組み合わせを見つけ出すことがある。もし成功すれば、組み合わせに用いた各因子の操作の有無の間で細胞周期進行状況を比較すれば、比較的容易に足場非依存性増殖が起きる機構を解明できるはずである。私は、この信念に基づき当該研究を進めた結果、CDK 阻害因子に耐性を示す Cdk6 とサイクリン D3 複合体と Cdc6 の高発現と mTOR 経路の活性化によって、軟寒天培地中でヒト癌細胞株の HeLa 細胞と遜色ない速さでラット胎性線維芽細胞を増殖させることができることを突き止めた (図 1)。Cdk6 とサイクリン D3 のみの高発現では、細胞 (REF-K6/D3) は軟寒天培地中では増殖できず単一細胞のままで留まる。それに Cdc6 を高発現させると、細胞 (REF-K6/D3-C6) は増殖できるようになる。さらに活性化 Rheb を高発現させると (REF-K6/D3-C6-aR)、HeLa 細胞とほぼ同じ速度で持続的に増える。

#### 軟寒天培地、3 週間培養



そこで、3 因子による足場非依存性増殖の分子機構を詳細に探った結果、これまで想定すらされていなかった三つの新しい機構が関与していることが判明した (図 2)。

## Presence of anchorage



1. 高発現された Cdk6-サイクリン D3 複合体が、増殖抑制下にも係わらず Rb をリン酸化し E2F 転写因子を活性化して、Cdc6, サイクリン A, Emi1 遺伝子の転写を上げる。Emi1 の発現誘導によって APC/C<sup>Cdh1</sup> ユビキチンリガーゼを抑制し、その結果 Cdc6 およびサイクリン A の分解が抑制される。一方、高発現された Cdk6-サイクリン D3 複合体は、足場が無い状態でも Rock1/2 を活性化する。その機構に関しては現在不明である。
2. 活性化された Rock1/2 は、mTOR 経路を弱く活性化すると共に、もう一つの Cdk 阻害因子である p27<sup>Kip1</sup> の C 末端のスレオニン基をリン酸化する。
3. Cdk2 に結合し不活化した p27<sup>Kip1</sup> の C 末端がリン酸化されると、高発現された Cdc6 が p27 を剥がし Cdk2 を活性化する。
4. 活性化型 Rheb を高発現させることによって mTOR 経路が十分に活性化し、mRNA の翻訳を高めて増殖に必要なタンパクが十分に作られる。加えて、Cdk4 および Cdk6 の活性化が維持される。

なお、足場がある場合は、Rock1/2 は足場依存性に RhoA により活性化を受け、p27 のリン酸化と mTOR 経路の活性化を行なう。

以上のように、Cdk6-D3, Cdc6 および活性化型 Rheb の高発現によって、足場が無い状態でも S 基開始に必須なすべての因子の発現ならびに Cdk4/6 および Cdk2 の活性化が起こり、それによって癌細胞と遜色ないほどの速度で足場非依存性増殖を誘導することができるようにあったと考えられた。mTOR 経路の活性化と共に Cdk6-D3 および Cdc6 の高発現は多くの自然癌で見られることから、今回判明した足場非依存性増殖機構がこれらの癌細胞で働いている可能性が浮かび上がった。