

論文の内容の要旨

論文題目 TSC-22 は Ras/MAPK の下流で発現上昇し、細胞の増殖を抑制する

指導教員 本間之夫教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 中村真樹

がんは、がん遺伝子やがん抑制遺伝子などの構造異常やエピジェネティックな異常を経て多段階に発生・進展する。さらに、様々な遺伝子発現の変化が、がんの複雑な病態や治療感受性を修飾している。従って、これらの遺伝子群の異常の実態を把握し、その機能を明らかにすることは、がんの診断や治療、そして予防を考える上で重要である。特に、がんの発生から進展で重要となる細胞の異常増殖にはRas経路の活性化が重要な働きをしていることが知られており、がん細胞の細胞増殖機構におけるRas経路の役割を明らかにすることは、がんの基礎研究における重要な課題のひとつである。

TGF- β -stimulated clone-22 (TSC-22)は、当初マウスの骨芽細胞においてTGF- β の刺激により発現が上昇する遺伝子として同定された。ヒトのTSC-22は第13番

染色体 q 14に位置し、18 k Dのタンパクをコードしている。このタンパクにはロイシンジッパー構造とTSC-box構造が含まれるが、DNA結合部位は含まれていない。TSC-22は抗癌剤vesnarinone、TGF- β を含むさまざまな増殖因子、follicle-stimulating ホルモン(FSH)、tumor necrosis factor α (TNF α)、インターフェロン γ 、インターロイキン-1 β 、fibroblast growth factor-2(FGF-2)、プロゲステロン、そしてepidermal growth factor(EGF)などの刺激で発現が上昇することが報告されている。また、乳がん細胞株においてTSC-22はプロゲステロンによって発現上昇し、細胞増殖を抑制する；胃がん細胞株においてはTSC-22の過剰発現がカスパーゼ-3の活性化と細胞のアポトーシスを誘導する；唾液腺がん細胞株において、TSC-22の過剰発現により細胞の増殖が抑制される、といった報告から、TSC-22は腫瘍形成抑制的に働く転写因子であることが示唆されているが、正確な機能についてはまだわかっていない。

我々の研究室における先行研究により、リンパ球系細胞株Ba/F3細胞においてチロシンキナーゼ型レセプターFlt3-ITDの下流でTSC-22の発現が上昇することが示された。白血病、特に急性骨髄性白血病 (AML)、急性Bリンパ球性白血病 (ALL)、急性Tリンパ球性白血病(T-cell ALL)の一部、慢性骨髄性白血病(CML)において、Flt3の高発現が高い頻度で見られる。Flt3の細胞膜直下部分での重複変異 (internal tandem duplication within the juxtamembrane domain of the Flt3 gene (Flt3-ITD)) あるいは、835番目のアスパラギン酸における点変異 (an activating mutation at aspartic acid 835 (D835) in the tyrosine kinase domain of Flt3 (Flt3-TKD))

がそれぞれAMLの20–30%、7%にみられ、AMLにおいて最も高い頻度で見られる遺伝子変異の一つとして知られている。この二つのFlt3遺伝子変異は、共にFlt3の恒常的な活性化を引き起こし血球系細胞株の因子非依存的な増殖につながるが、幾つかの大規模研究によりAMLにおいてFlt3ITDを持つものはより予後が悪いことが分かっている。そこで、Flt3-ITDとFlt3-D835Vを導入した細胞を用いてcDNAマイクロアレイアナリシスを行ったところ、我々はFlt3-D835Vでのみ発現が上昇する遺伝子としてTSC-22を同定するに至った。一方、Flt3の下流にはRas/MAP kinase経路があり、恒常的に活性化したFlt3の下流ではRasおよびMAP kinase経路が恒常的に活性化していることが報告されている。そこで、私はTSC-22がRasおよびMAP kinase経路の下流で発現制御される遺伝子であるか否かに興味を持つに至った。

HRas (v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog)は、1980年代初めに膀胱癌細胞株T24細胞、およびEJ細胞において同定されたヒトにおける初めてのがん原遺伝子であり、KRasやNRasなどのRasファミリーに属し、それがコードするタンパク質はGTPaseとして数多くのシグナル形質導入の初期に活躍し、下流のRaf/MAPKへとリン酸化シグナルを伝達する。遺伝子の点突然変異によりアミノ酸置換が生じることにより、活性化型に変化し、がん化を誘導する性質も報告されている。

本研究ではまず、TGF- β -stimulated clone-22 (TSC-22) のタンパクレベル、RNAレベルの発現がRas経路の活性化によって上昇し、転写レベルでもRasによる制

御を受けていることを確認した。

続いて、TSC-22およびその欠失変異をNIH3T3細胞に過剰発現させて細胞増殖を比較することにより、TSC-22のTSC-boxが細胞増殖抑制において重要な働きをしていることを見出した。これは、ソフトアガーコロニーアッセイ、ならびに免疫不全マウス（NOD/SCIDマウス）を用いたin vivo腫瘍形成実験においても同様の結果であった。

また共焦点顕微鏡によるTSC-22の細胞内局在観察により、定常状態では細胞質に存在するTSC-22がRas経路の活性化に伴って細胞質から核内へ移行していることを確認した。これらの実験によりTSC-22は細胞質から核内へ移行して細胞増殖抑制効果を発揮していることを示した。

次に TSC-22 と H-Ras のタンパクレベルでの会合を、GST 融合タンパクを用いたプルダウンアッセイで示した。TSC-22 と相同性の非常に高い TSC-box ならびにロイシンジッパー構造を持つファミリー遺伝子である Glucocorticoid induced leucine zipper (GILZ) は Ras および Raf と直接会合し、Ras 経路を抑制することが報告されている。そこで TSC-22 についても Ras 経路の抑制効果を検証したが、TSC-22 による明らかな抑制効果はみられず、Ras と TSC-22 の会合の生理的な意味については今後の研究の課題として残された。

さらに我々は TSC-22 欠損マウスを用いて実験を行った。野生型ならびに TSC-22 欠損マウスの胎児繊維芽細胞（Mouse Embryonic Fibroblast : MEF）を用いた実験では、TSC-22 欠損 MEF が野生型に比べて Ras による細胞老化（セネッ

センス) に導入されにくいことを確認した。セネッセンスはアポトーシスに並んで細胞ががん遺伝子によるがん化を免れる一つの機構だと考えられており、TSC-22 が欠損することで MEF 細胞がよりがん化しやすい状態になっていることが示唆された。Ras との関係を明らかにするには至らなかったが、欠損マウスを用いた二つの発がん実験 (DEN 肝がんモデルおよび、BBN 膀胱がんモデル) では、TSC-22 欠損マウスにより多くのがんが形成されることを示した。

以上より、TSC-22 は Ras 下流で発現が上昇し、細胞質から核内に移行することで細胞の増殖を抑制しており、TSC-22 が Ras の負の制御因子として働いていることが示唆された。また、TSC-22 は Ras による細胞のセネッセンスの導入に必要であることが示唆され、TSC-22 欠損マウスには薬剤による肝臓がん、膀胱がんがより発生しやすいことが分かった。これらにより、TSC-22 ががんの発生を抑制する方向に働く遺伝子であることが示唆された。