

学位論文題名

NF- κ B-dependent induction of cyclin D1
by retinoblastoma protein (pRB) family proteins
and tumor-derived pRB mutants

(pRB 癌抑制蛋白ファミリーならびに癌細胞由来変異 pRB 分子による
NF- κ B 依存的なサイクリン D1 の転写誘導)

学位論文内容の要旨

緒言

RB 遺伝子は遺伝性小児悪性腫瘍である網膜芽細胞腫 (retinoblastoma)の発症に決定的に関与する遺伝子として Weinberg らにより単離された初のヒト癌抑制遺伝子であり、分子量 105 キロダルトンの pRB 蛋白をコードする。その後、pRB と構造的に相同性を有する2種類の蛋白質、p107 と p130 が同定され、これら3分子種は pRB 癌抑制蛋白ファミリーと総称されている。その遺伝的/機能的不活化が細胞の癌化に直接つながることから、pRB ファミリーは細胞増殖に対し抑制的に機能すると考えられている。事実、これまでの研究から pRB ファミリーは細胞周期における G1 期-S 期移行、特に制限点通過のブレーキ分子として働くことが明らかにされてきた。低リン酸化型の pRB ファミリー分子はポケットと呼ばれるドメイン構造を介して転写因子 E2F と結合し、E2F 特異的な転写を抑制する結果 G1 期-S 期進行に必要な遺伝子群の発現が阻止される。こうした pRB ファミリーの細胞増殖抑制活性は、G1 期後期の制限点における G1 サイクリン (サイクリン D/サイクリン E) -サイクリン依存性キナーゼ (Cdk) 複合体を介するリン酸化の結果不活化され、細胞周期は G1 期から S 期へと進行する。

本研究では細胞周期制御に大きな役割を果たしている pRB ファミリー分子の新たな機能について解析することを通して癌化のメカニズムの解明に貢献することを目的とした。申請者は pRB が自らの細胞増殖抑制活性を不活化するサイクリン D1 を誘導するという現象に注目し、この現象を解析することが pRB ファミリー分子の新たな機能を見出すことにつながる可能性があると考え以下に述べる実験を行った。

実験結果

機能的 *RB* 遺伝子が欠損しているヒト骨肉腫細胞株 SAOS-2 に *RB* 遺伝子および *p107* 遺伝子、*p130* 遺伝子を強制発現させたところ蛋白レベルおよび転写レベルでサイクリン D1 の発現量の増加を認めた。この現象が生理的な細胞内でも起きている事を証明するために *RB* 遺伝子を保持している骨肉腫細胞株 U2-OS の内因性 pRB を siRNA を用いて発現抑制した前後のサイクリン D1 の発現レベルを解析した。U2-OS 細胞は *p16^{INK4A}* を欠損するため、発現する pRB はすべて増殖抑制活性を欠く高リン酸化型であったにもかかわらず、siRNA 特異的に pRB 発現を抑制した細胞におけるサイクリン D1 の発現量は低下し、pRB フ

ファミリー分子が内因性サイクリン D1 の発現・維持に関与していること、またこのサイクリン D1 誘導活性が pRB ファミリーのリン酸化によって不活化されない新規の生物活性であることが明らかとなった。

次に pRB ファミリー分子が、サイクリン D1 のプロモーター上のどのシス領域に作用し転写を活性化するかをレポーターアッセイ等を用いて解析し、転写開始点近傍の NF- κ B 結合部位が重要な役割を果たしていることを明らかにした。また NF- κ B の核移行を阻害する I κ B α を pRB とともに SAOS-2 細胞に共発現させたところサイクリン D1 の発現量が低下したことから、pRB による NF- κ B の機能的活性化によりサイクリン D1 が誘導されていることが明らかにされた。

サイクリン D1 の誘導に必要な pRB の分子内責任領域についての解析を進めた。ポケット構造は A-box、B-box とその間のスペーサー領域、および C 端領域から構成されており、いずれに変異ないし欠失があっても E2F との結合能を失う。pRB-E2F 複合体形成を競合的に阻害するアデノウイルス癌遺伝子産物 E1A を pRB とともに SAOS-2 細胞に共発現させたところサイクリン D1 の発現は完全に阻害された。さらに、ポケット構造を全く持たない N 端領域のみの pRB 欠失変異体分子がサイクリン D1 を誘導できなかったことから、この現象はポケット構造に依存していることが結論づけられた。一連の pRB 欠失変異体分子を用いた解析から、サイクリン D1 の誘導においてポケット構造内の A-box と B-box の両方に結合する部位と、C 端領域に結合する部位の少なくとも 2 つの独立したポケット結合部位を有する分子の存在が示唆された。また癌細胞に由来する pRB Δ 22、pRB706CF という二つの変異 pRB 分子もサイクリン D1 を誘導することが見出された。

これらの実験結果より pRB ファミリー分子には、NF- κ B のアクチベーターとしてサイクリン D1 をポケット構造依存的に誘導するという新たな生物活性があり、その活性はリン酸化によって不活化されないことが明らかにされた。

考察

本研究を通して、pRB、p107 ならびに p130 からなる pRB ファミリー分子がサイクリン D1 を誘導する能力を有することが明らかになった。サイクリン D1 は Cdk4 あるいは Cdk6 と複合体を形成し、pRB の細胞増殖抑制能を不活化することから両者の間には複雑な機能的相互作用があると考えられ、本研究結果は pRB ファミリー-NF- κ B-サイクリン D1 経路の存在を示すものである。pRB の強制発現ならびにノックダウン実験から、同分子がサイクリン D1 の発現レベル維持に積極的に関与していることが明らかとなった。このことは pRB を欠損している細胞においてサイクリン D1 の発現量が抑制されているという現象に分子レベルでの根拠を与えるものと推察される。本研究ではさらに、pRB ファミリー分子によるサイクリン D1 の発現増大は *cyclin D1* 遺伝子の転写活性化により起こり、この活性化に転写因子 NF- κ B が関わることを示した。現時点で pRB ファミリー分子がどのような分子メカニズムで NF- κ B を活性化するのことは不明である。しかしながらアデノウイルス E1A が pRB によるサイクリン D1 の発現誘導を阻害したことから、サイクリン D1 誘導には pRB ファミリーが共有するポケットドメインと物理的に相互作用する何らかの細胞性分子の存在が示唆される。

U2-OS 細胞における高リン酸化型 pRB のノックダウン実験および癌細胞に由来する変異 pRB 分子が

サイクリン D1 誘導能を保持しているという実験結果から、pRB ファミリー分子 のサイクリン D1 誘導活性は、従来から知られている細胞増殖抑制活性とは全く独立した活性と考えるべきものである。本研究成果は、pRB ファミリー分子が細胞周期制御において低リン酸化状態では細胞周期抑制分子として働き、一旦リン酸化を受けると細胞周期促進へと変換されるというきわめて興味深い可能性を示唆する。この可能性が正しいならば、細胞癌化に関わる変異 pRB 分子は細胞増殖抑制能を欠くばかりでなく、サイクリン D1 を発現誘導することにより細胞癌化に二重に促進的に働いている可能性が推察される。本研究は癌化のメカニズムの解明にまったく新たな知見を提供するものであり、新たな癌の治療法開発に大きく貢献することが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 畠 山 昌 則
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

NF- κ B-dependent induction of cyclin D1 by retinoblastoma protein (pRB) family proteins and tumor-derived pRB mutants

(pRB 癌抑制蛋白ファミリーならびに癌細胞由来変異 pRB 分子による
NF- κ B 依存的なサイクリン D1 の転写誘導)

RB 遺伝子は網膜芽細胞腫の発症に決定的に関与する遺伝子として単離された初のヒト癌抑制遺伝子であり、分子量 105kDa の pRB 蛋白をコードする。pRB と構造的に相同性を有する p107 と p130 を含めた pRB 癌抑制蛋白ファミリーは、その遺伝的/機能的不活化が細胞の癌化に直接つながることから細胞増殖に対し抑制的に機能すると考えられている。これまでの研究から pRB ファミリーは細胞周期における G1 期-S 期移行、特に制限点通過のブレーキ分子として働くことが明らかにされてきた。低リン酸化型の pRB ファミリーはポケットと呼ばれるドメイン構造を介して転写因子 E2F と結合し、E2F 特異的な転写を抑制する結果 G1 期-S 期進行に必要な遺伝子群の発現が阻止される。こうした pRB ファミリーの細胞増殖抑制活性は、G1 期後期の制限点における G1 サイクリン (サイクリン D/サイクリン E) -サイクリン依存性キナーゼ (Cdk) 複合体を介するリン酸化の結果不活化され、細胞周期は G1 期から S 期へと進行する。

本研究では pRB が自らの細胞増殖抑制活性を不活化するサイクリン D1 を誘導するという現象に注目し、pRB ファミリーによるサイクリン D1 蛋白の発現および *cyclin D1* 遺伝子の転写活性化機構について解析し、pRB ファミリーの新たな機能を見出すことを目的とした。

実験結果

機能的 *RB* 遺伝子が欠損しているヒト骨肉腫細胞株 SAOS-2 に pRB ファミリーを発現さ

せたところ蛋白レベルおよび転写レベルでサイクリン D1 の発現量の増加を認めた。RB 遺伝子を保持している骨肉腫細胞株 U2-OS の内因性 pRB を siRNA を用いて特異的に発現を抑制した前後のサイクリン D1 の発現レベルを解析し、この現象が生理的な細胞内でも起きており、pRB が内因性サイクリン D1 の発現・維持に関与している事を証明した。また高リン酸化型 pRB もサイクリン D1 を誘導し、このサイクリン D1 誘導活性が pRB のリン酸化非依存的な新規の生物活性であることが明らかとなった。次に *cyclin D1* プロモーター上の責任領域について解析し、転写開始点近傍の NF- κ B 結合部位が重要な役割を果たしていること、また NF- κ B の核移行を阻害する I κ B α を pRB とともに SAOS-2 細胞に共発現させたところサイクリン D1 の発現量が低下したことから、pRB による NF- κ B の機能的活性化によりサイクリン D1 が誘導されていることが明らかにされた。

サイクリン D1 の誘導に必要な pRB の分子内責任領域についての解析を行い、この現象はポケット構造に依存していることが結論づけられた。一連の pRB 欠失変異体分子を用いた解析から、サイクリン D1 の誘導においてポケット構造内の A-box と B-box の両方に結合する部位と、C 端領域に結合する部位の少なくとも 2 つの独立したポケット結合部位を有する分子の存在が示唆された。また癌患者に由来する pRB Δ 22、pRB706CF という二つの変異 pRB もサイクリン D1 を誘導した。これらの実験結果より pRB ファミリーは、NF- κ B のアクチベーターとしてサイクリン D1 をポケット領域依存的に誘導するというリン酸化非依存的な新たな生物活性を有していることが明らかにされた。また pRB ファミリーは低リン酸化状態では細胞周期抑制分子として働き、一旦リン酸化を受けると細胞周期促進分子へと変換されるという可能性が示唆された。さらに変異 pRB は細胞増殖抑制能を欠くばかりでなく、サイクリン D1 の発現を誘導することにより細胞癌化に二重に促進的に働いている可能性が推察され、本研究は癌化のメカニズム解明に新たな知見を提供した。

口頭発表において、吉木教授より NF- κ B とサイクリン D1 の相互作用について質問があった。ついで秋田教授より pRB と NF- κ B の相互作用について、および変異 pRB の発癌への影響について質問があった。ついで加藤教授より当研究結果の遺伝子治療への応用に関する質問があった。また畠山教授より、pRB 欠損細胞と変異 pRB 保持細胞の悪性度の違いについて質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。

本研究は pRB ファミリーに NF- κ B のアクチベーターとしてサイクリン D1 をポケット領域依存的に誘導するというリン酸化非依存的な新たな生物活性があること、さらに細胞癌化に関わる変異 pRB は細胞増殖抑制能を欠くばかりでなく、サイクリン D1 の発現を誘導することにより細胞癌化に二重に促進的に働いている可能性を示唆したものであり、癌化のメカニズムの解明などに対する貢献は大きく、審査員一同協議の結果、本論文は博士（医学）の学位授与に値するものと判定した。