

学位論文題名

細胞増殖シグナル伝達における
マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) の役割

学位論文内容の要旨

背景

多くの細胞増殖因子はチロシンキナーゼタイプのレセプターに結合しレセプターをリン酸化し下流へとシグナル伝達していく。シグナル伝達物質のなかでも Ras 蛋白は細胞周期シグナル伝達において中心的な役割をはたしており Extracellular signal-regulated kinase (Erk) や phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) などの下流シグナル伝達物質を活性化する。Ras の活性化は Cyclin D1 蛋白の発現を増加させ、CyclinD1 は cyclin-dependent kinase (CDK)4 または 6 と結合し細胞周期の制御蛋白である retinoblastoma (Rb) 蛋白をリン酸化する。Rb 蛋白がリン酸化されると外部の刺激に関係なく細胞は G1 期から M 期まで完了することになる。

G0 期の細胞が細胞増殖因子の刺激を受けて増殖するには Rb 蛋白がリン酸化されるまでに 2 回別々のシグナル伝達が必要である。初回のシグナル伝達は Erk の活性化と転写因子である c-myc の誘導であり、2 回目は cyclinD1 の誘導に必要な PI3K の活性化であることが報告されているが、この二つのシグナルの活性化がどのように関連しているかは明らかにされていない。

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) は敗血症、炎症、細胞増殖などの場において重要な働きをしている蛋白であることが報告されているが、その機能は十分に解明されていない。細胞内の MIF が p53 の機能を抑制することや MIF ノックアウトマウスから分離した線維芽細胞では CyclinD1 の発現が抑制されていることから細胞増殖には促進的な作用を有することが示唆されている。一方、MIF は Jab1 依存的にサイクリン依存性キナーゼ抑制蛋白である p27Kip1 を安定化し細胞増殖を抑制しているという相反する報告もみられる。

細胞増殖因子による刺激に対して細胞内 MIF が細胞増殖に促進的に働くのか抑制的に働くのか明らかにするために、MIF アンチセンスアデノウイルスベクターを用いて MIF の発現を抑制し、NIH3T3 細胞の血清刺激におけるシグナル伝達、細胞周期進展に関する検討を行った。MIF が late G1 期におけるシグナル伝達に重要な働きをしていることを本研究で明らかにした。

対象および方法

マウスアンチセンス MIF をコードしたアデノウイルスベクター (AxCA-MIFAS) を用いて以下の実験を行った。コントロールとして β -ガラクトシダーゼ遺伝子をコードしたアデノウイルスベクター (AxCA-LacZ) を使用した。AxCA-MIFAS による MIF 蛋白発現の抑制効果は Western blotting 法にて行った。NIH3T3 細胞に AxCA-MIFAS と AxCA-LacZ をトランスフェクションし無血清培地で 36 時間培養後、10%FBS 含有の培養液と交換し経時的に細胞を回収し以下の解析を行った。細胞周期は Digitonin 処理した細胞を PI (propidium iodide) で染色し FACS

Calibur で解析した。経時的に回収した細胞を溶解し Cyclin D1, p-tyrosine, p-Akt の発現量を immunoblotting 法にて解析した。Ras の活性化状態は Raf-1 Ras binding domain (RBD)/GST 融合蛋白を用い、結合した GTP-Ras をグルタチオンアガロースで回収し immunoblot 法にて検出した。細胞表面と細胞内に発現する PDGF レセプター β の状態はフローサイトメトリーと免疫蛍光染色にて解析した。

結果

AxCA-MIFAS をトランスフェクションした細胞は血清刺激に反応を示さず S 期に入ることができなかった。AxCA-MIFAS をトランスフェクションした細胞が S 期に入らない理由を明らかにするために G0 期から S 期に進むために必要な Cyclin D1 の発現を行った。AxCA-LacZ では十分な Cyclin D1 の発現増強が見られたが AxCA-MIFAS では全く発現増強がされなかった。Cy 増殖因子による Cyclin D1 の発現は late G1 期における Ras-PI3K の活性が重要なことから Ras の活性化状態である GTP-Ras の発現量、また PI3K の活性化でリン酸化される Akt の解析を行った。late G1 期にあたる血清刺激後 4 時間以降で AxCA-MIFAS をトランスフェクションした細胞は Ras および Akt の活性化が抑制されていた。また PDGF, FGF, EGF など多くの増殖因子受容体であるチロシンキナーゼタイプの受容体の分子量は 170-200 kDa でありこの分子量での total cell lysate のチロシンリン酸化状態の解析も同時に行った。Ras, Akt の結果と同様にチロシンのリン酸化も血清刺激 4 時間以降で AxCA-MIFAS をトランスフェクションした細胞では抑制されていた。以上のデータは MIF が late G1 期において増殖因子レセプターリン酸化の上流に関与していることを示唆していると考えられアデノウイルスの E3 蛋白の影響を受けないとされる PDGF レセプター β の trafficking の変化を解析した。フローサイトメトリーの解析では AxCA-LacZ では PDGF レセプター β は血清刺激 2 時間までに細胞内へ internalize し, late G1 期の Ras の活性化時間と一致して 3-4 時間で細胞表面へ recycling する現象が観察された。一方で AxCA-MIFAS では 2 時間までコントロール同様に internalize したが 3-4 時間での recycling の現象は認められなかった。Confocal study でも同様の現象が観察された。このことは late G1 期における Ras の再活性化がチロシンキナーゼレセプターの recycling に依存している可能性を示唆している。Cytofix/Cytoperm solution にて処理を行い細胞表面と細胞内を合わせた total の PDGF レセプター量を測定すると AxCA-MIFAS と AxCA-LacZ では差が見られなかった。これらの結果から MIF は PDGF レセプターの trafficking に作用して late G1 期における Ras の再活性化に重要な役割を果たしているものと考えられた。

考察

MIF は腫瘍増殖、腫瘍による血管増成にも重要な蛋白であることが報告されている。最近では MIF と p53 のダブルノックアウトマウスの解析から、MIF が癌抑制遺伝子である p53 の機能を抑制することが報告されている。これらの知見は MIF が細胞増殖に重要な役割を演じている可能性を示唆している。しかしながら細胞増殖という点において MIF の分子生物学的なメカニズムは明らかにされていない。本研究において得られた結果により MIF の病理生物学的機能、また細胞内シグナル伝達機能、特に細胞増殖と言う点に関してより深い知見が得られた。

細胞周期におけるシグナル伝達の働きは複雑であり、数時間にわたっていくつかのシグナル伝達が相互に作用していると考えられている。本研究において、AxCA-MIFAS でトランスフェクトした NIH3T3 細胞が血清刺激に反応せず、Cyclin D1 の発現が抑制され細胞が S 期へ進めないことが初めて示された。AxCA-MIFAS でトランスフェクトした細胞は early phase で血清刺激後 3 時間までは Ras の活性化が起こるが、late phase に相当する 4 時間以降はシグナルが伝わっていないことが明らかとなった。細胞表面の PDGF レセプター β の解析ではコントロールの細胞で最初の刺激による internalization の後に 3-4 時間で PDGF レセプター β の recycling が起こっていることが新たに判明した。また AxCA-MIFAS でトラン

スフェクトした細胞では3-4時間後にPDGFレセプター β のrecyclingが見られず、チロシンキナーゼタイプのレセプターのlate G1 phaseでのrecyclingによるシグナル伝達にMIFが関与していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 石 橋 輝 夫
副 査 教 授 田 中 一 馬

学 位 論 文 題 名

細胞増殖シグナル伝達における マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) の役割

G0 期の細胞が細胞増殖因子の刺激を受けて増殖するには Rb 蛋白がリン酸化されるまでに Ras を中心として 2 回別々のシグナル伝達が必要である。初回のシグナル伝達は Erk の活性化と転写因子である c-myc の誘導であり、2 回目は cyclinD1 の誘導に必要な PI3K の活性化であることが報告されているが、この二つのシグナルの活性化がどのように関連しているかは明らかにされていない。Macrophage migration inhibitory factor (MIF) は敗血症、炎症、細胞増殖などの場において重要な働きをしている蛋白であることが報告されている、その機能は十分に解明されていない。細胞増殖因子による刺激に対して細胞内 MIF が細胞増殖に促進的に働くのか抑制的に働くのか明らかにするために、MIF アンチセンスアデノウイルスベクターを用いて MIF の発現を抑制し、NIH3T3 細胞の血清刺激におけるシグナル伝達、細胞周期進展に関する検討を行った。マウスアンチセンス MIF をコードしたアデノウイルスベクター (AxCA-MIFAS) を用いて以下の実験を行った。コントロールとして β -ガラクトシダーゼ遺伝子をコードしたアデノウイルスベクター (AxCA-LacZ) を使用した。NIH3T3 細胞に AxCA-MIFAS と AxCA-LacZ をトランスフェクションし無血清培地で 36 時間培養後、10%FBS 含有の培養液と交換し経時的に細胞を回収しコントロールとの比較解析を行った。AxCA-MIFAS をトランスフェクションした細胞は血清刺激に反応を示さず S 期に入ることができなかった。AxCA-MIFAS をトランスフェクションした細胞が S 期に入らない理由を明らかにするために G0 期から S 期に進むために必要な Cyclin D1 の発現を行った。AxCA-LacZ では十分な Cyclin D1 の発現増強が見られたが AxCA-MIFAS では全く発現増強がされなかった。細胞増殖因子による Cyclin D1 の発現は late G1 期における Ras-PI3K の活性が重要なことから Ras の活性化状態である GTP-Ras の発現量、また PI3K の活性化でリン酸化される Akt の解析を行った。late G1 期にあたる血清刺激後 4 時間以降で AxCA-MIFAS をトランスフェクションした細胞は Ras および Akt の活性化が抑制されていた。また PDGF, FGF, EGF など多くの増殖因子受容体であるチロシンキナーゼタイプの受容体の分子量は 170-200 kDa でありこの分子量での total cell lysate のチロシンリン酸化状態の解析も同時に行った。Ras, Akt の結果と同様にチロシンのリン酸化も血清刺激 4 時間以降で AxCA-MIFAS をトランスフェクションした細胞では抑制されていた。以上のデータは MIF が late G1 期において増殖

因子レセプターリン酸化の上流に関与していることを示唆していると考えられアデノウイルスの E3 蛋白の影響を受けないとされる PDGF レセプターβの trafficking の変化を解析した。フローサイトメトリーの解析では AxCA-LacZ では PDGF レセプターβは血清刺激 2 時間までに細胞内へ internalize し, late G1 期の Ras の活性化時間と一致して 3-4 時間で細胞表面へ recycling する現象が観察された。一方で AxCA-MIFAS では 2 時間までコントロール同様に internalize したが 3-4 時間での recycling の現象は認められなかった。Confocal study でも同様の現象が観察された。このことは late G1 期における Ras の再活性化がチロシンキナーゼレセプターの recycling に依存している可能性を示唆している。Cytotfix/Cytoperm solution にて処理を行い細胞表面と細胞内を合わせた total の PDGF レセプター量を測定すると AxCA-MIFAS と AxCA-LacZ では差が見られなかった。これらの結果から MIF は PDGF レセプターの trafficking に作用して late G1 期における Ras の再活性化に重要な役割を果たしているものと考えられた。AxCA-MIFAS をトランスフェクトした NIH3T3 細胞が血清刺激に反応せず, Cyclin D1 の発現が抑制され細胞が S 期へ進めないことが初めて示された。AxCA-MIFAS をトランスフェクトした細胞は early phase で血清刺激後 3 時間までは Ras の活性化が起こるが, late phase に相当する 4 時間以降はシグナルが伝わっていないことが明らかとなった。細胞表面の PDGF レセプターβの解析ではコントロールの細胞で最初の刺激による internalization の後に 3-4 時間で PDGF レセプターβの recycling が起こっていることが新たに判明した。また AxCA-MIFAS をトランスフェクトした細胞では 3-4 時間後に PDGF レセプターβの recycling が見られず, チロシンキナーゼタイプのレセプターの late G1 phase での recycling によるシグナル伝達に MIF が関与していることが示唆された。

公開発表に際し, 副査の石橋教授より PDGF レセプター以外のレセプターと MIF との関連の考察, また副査の田中一馬教授からレセプターの trafficking に対して機能していると考えられる MIF の局在性の考察, 主査の小林教授から trafficking に影響する他の既知蛋白と MIF の関連性についての質問があり, いずれの質問に対しても申請者は過去の文献報告や自身の研究結果をもとに概ね妥当に回答した。

本研究は、増殖因子依存性の細胞周期進展において MIF がチロシンキナーゼ型レセプターの細胞内 recycling に関わることをはじめて見出した点で評価され、今後のこの分野の研究に寄与するものと期待される。

審査一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。