

氏 名 (本 籍) 旦 部 幸 博 (長崎県)

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 (論) 第 3 1 7 号

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 6 年 3 月 2 5 日

学 位 論 文 題 目 A Novel Apoptotic Pathway Induced by the *drs* Tumor Suppressor Gene
(がん抑制遺伝子 *drs* が誘導する新規アポトーシス経路に関する研究)

審 査 委 員 主 査 教 授 小 笠 原 一 誠

副 査 教 授 松 浦 博

副 査 教 授 大 久 保 岩 男

論文内容要旨

*整理番号	320	氏名	なへ けい ひろ 旦部 幸博
学位論文題目	A Novel Apoptotic Pathway Induced by the <i>drs</i> Tumor Suppressor Gene (がん抑制遺伝子 <i>drs</i> が誘導する新規アポトーシス経路に関する研究)		
<p>目的</p> <p><i>drs</i> は <i>v-src</i> による細胞癌化を抑制する活性を持つ遺伝子として分離された新規癌抑制遺伝子である。<i>drs</i> は、C 端側に 1 つの膜貫通領域を持ち、N 端側には sushi モチーフと呼ばれる構造を 3 つ有している。Sushi モチーフはセレクトインファミリーや補体結合蛋白などにも存在しており蛋白結合モジュールとして機能すると考えられているが、その詳細はまだ明らかになっていない。<i>drs</i> はさまざまなヒト癌細胞株や大腸腺癌等のヒト癌組織において、癌の悪性化に伴って mRNA レベルで発現が抑制されている。これらの癌細胞株にレトロウイルスベクターを用いて <i>drs</i> 遺伝子を導入すると、足場非依存性増殖などの悪性化形質が抑制され、また非接着状態で G1 期での細胞周期停止およびサイクリン A mRNA の発現抑制が起こる。これらのことからヒト癌の発生過程に関連した重要な機能を持つと考えられる。</p> <p>腫瘍の進行過程において、アポトーシスが密接に関与することが知られている。<i>p53</i>、<i>Bcl-2</i> などのアポトーシス関連遺伝子の異常によりアポトーシスが機能しなくなることが癌の進行に重要だと考えられている。本研究では <i>drs</i> 遺伝子の癌抑制作用を解明するため、ヒト癌細胞株へのアポトーシス誘導活性と、その経路について検討した。</p> <p>方法</p> <p>野生型および変異型の <i>drs</i> 発現プラスミドをリポフェクション法により子宮頸癌細胞株 HeLa、骨肉腫細胞株 Saos-2、膀胱癌細胞株 T-24 に導入し、そのアポトーシス誘導活性を検討した。アポトーシス誘導能はトリパンブルー排除法により細胞生存率を算出して判定した。カスパーゼ-3、-8、-9、-12 の活性化およびミトコンドリアからのチトクロム c の放出は特異抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検討した。</p> <p>結果</p> <p><i>drs</i> はさまざまなヒト癌細胞株に細胞死を誘導した。この細胞死は核の断片化と凝縮、また FACSscan による細胞周期解析で subG1 フラクシオンの増加を伴う、アポトーシスの形態を示した。欠損ミュータントを用いた解析から、この <i>drs</i> によるアポトーシス誘導には 3 つの sushi モチーフと C 端側の細胞内領域の両方が必要であることが判った。</p> <p>次に <i>drs</i> によるアポトーシス誘導経路を明らかにするために、アポトーシス経路において中核的な役割を担っているカスパーゼが <i>drs</i> によって活性化されるかどうかを検討した。ウェスタンブロッテ</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、
2 千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

イングにより、アポトーシスの実行分子であるカスパーゼ-3 の活性化に伴う分解断片化が見られた。*drs* はミトコンドリアを介するアポトーシス経路に関与するカスパーゼ-9 も同様に活性化したが、細胞膜上のデスレセプター経路に関与するカスパーゼ-8 の活性化は誘導しなかった。このことは阻害剤を用いた実験からも確認された。次にカスパーゼ-9 の上流経路について検討したところ、*drs* は既知のアポトーシス誘導経路でカスパーゼ-9 の上流に位置する、ミトコンドリアからのチトクロム c の放出を惹起しなかったことから、新規のアポトーシス経路の関与が示唆された。

そこで、近年、小胞体に局在して小胞体ストレス関連細胞死などに関与することが報告されているカスパーゼ-12 に着目し、本分子の活性化を検討したところ、ヒト癌細胞において *drs* がカスパーゼ-9 の活性化に先立って、カスパーゼ 12 を分解活性化していることを見出した。興味深いことに、このとき小胞体ストレスにより誘導される BiP 蛋白の量には変化がなかった。

また *drs* は新規癌抑制・アポトーシス関連遺伝子 *ASY/Nogo-B/RTN-xS* と相乗的にアポトーシス活性を増強した。また免疫沈降法により *drs* と *ASY* が小胞体で相互作用していることが判った。アポトーシス活性を持たない *drs*、*ASY* の欠損ミュータントでは、この相互作用もまた失われており、この相互作用が *drs* や *ASY* のアポトーシス活性に重要だと考えられた。

考察

drs はさまざまな癌細胞株にアポトーシスを誘導したが、このときカスパーゼ-9、-3 の活性化は見られたもののカスパーゼ-8 の活性化とミトコンドリアからのチトクロム c の放出は見られず、*drs* によるアポトーシスは既知のミトコンドリアやデスレセプターを介する経路と異なる新規経路によるものと考えられた。

近年、小胞体に関与する新たなアポトーシス経路が報告されている。小胞体ストレスにより小胞体に局在するカスパーゼ-12 がカスパーゼ-9 を活性化、カスパーゼ-3 の活性化を経てアポトーシスに至る経路である。*drs* はカスパーゼ-9 に先立ってカスパーゼ-12 を活性化したため、この小胞体を介する経路に関与することが示唆された。このとき BiP の誘導が見られなかったことから、小胞体ストレスとは独立にカスパーゼ-12 を活性化する経路に *drs* が関与することが示唆された。

ASY は小胞体に局在する癌抑制活性遺伝子産物であり、近年、*Bcl-2* などのアポトーシス抑制分子を小胞体において抑制し、アポトーシス誘導活性を持つことが報告されている。*drs* は小胞体において *ASY* と相互作用し、そのアポトーシス誘導活性が相乗的に高められたことから、*drs/ASY* 複合体を介する新規の小胞体関連アポトーシス経路の存在が示唆された。

結論

drs はヒト癌細胞株に対してアポトーシスを誘導した。このアポトーシスはカスパーゼ-12、-9、-3 のシーケンシャルな活性化を伴い、アポトーシス誘導遺伝子 *ASY* が関与する、新規の小胞体関連経路によるものと考えられた。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	320	氏名	且部 幸博
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>本論文は、新規癌抑制遺伝子 <i>drs</i> (down regulated by v-src) の癌抑制機構を解析し、<i>drs</i> がヒト癌細胞株へのアポトーシス誘導活性を有することと、このアポトーシス誘導が新規経路によるものであることを解明したものである。結果を以下に示す。</p> <p>(1) <i>drs</i> 遺伝子導入によって種々のヒト癌細胞株にアポトーシスが誘導された。</p> <p>(2) <i>drs</i> は caspase-12、caspase-9、caspase-3 を順次活性化した。</p> <p>(3) 小胞体局在のアポトーシス誘導蛋白 ASY (apoptosis; saibou-shi yudo) と Drs 蛋白の結合が、両分子のアポトーシス誘導活性に重要であった。</p> <p>これらの結果は Drs 蛋白が小胞体で ASY と相互作用し、caspase-12、-9、-3 の順に活性化するという、既知の癌関連アポトーシスとは異なる新規アポトーシス経路を提唱するものであり、この分野での貢献は大きい。従って、博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。</p>			
(平成 16 年 2 月 5 日)			