

学 位 論 文 題 名

アデノウイルス12型 E1A ヒトがん細胞の
浸潤抑制機構における ets がん遺伝子
群転写因子 E1AF の関与

Adenovirus type 12 E1A suppresses the expression of E1AF,
an ets-oncogene family transctiption factor that reduces
the invasion ability of cancer cells

学位論文内容の要旨

アデノウイルス (Ad) は DNA がんウイルスで、げっ歯類細胞に対して腫瘍原性を持つことから、腫瘍発生のモデルとして研究されてきた。アデノウイルスには E1A と E1B の二つのウイルスがん遺伝子があり、E1A と E1B が協調してげっ歯類細胞をがん化させることが知られている。一方、E1A 単独ではアポトーシス誘導や、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 転写抑制を介した浸潤抑制などをもたらす癌抑制遺伝子として働くことも示されている。ただし、Ad E1A 遺伝子の浸潤抑制能に関する研究は、これまで主として細胞を不死化する能力はあるが細胞の移植による動物への造腫瘍能が低い Ad5 型について行われており、高腫瘍原性の Ad12 型における E1A 遺伝子の浸潤抑制能については未だ明らかではない。

今回著者は、Ad5 型 E1A に比べてより高い腫瘍原性を有する Ad12 型 E1A にも腫瘍細胞の浸潤抑制能があるのではないかと考え、Ad12 型 E1A ががん細胞の浸潤活性におよぼす影響、特に MMP と E1AF との関連を中心に検索した。腫瘍の浸潤において、腫瘍周囲の細胞外基質の分解は重要なステップの一つで、MMP のような細胞外基質分解酵素がその一部を担っている。MMP 遺伝子の転写調節領域には、ets がん遺伝子産物の結合部位が存在している。E1AF は ets がん遺伝子群に属するヒト細胞の転写因子で、複数の

MMP の転写を亢進し、口腔扁平上皮がん細胞の浸潤と深く関わっていることが知られている。

高い浸潤活性を持つ口腔扁平上皮がん細胞 HSC3 に Ad12 型 E1A 発現プラスミドを遺伝子導入し、Ad12 型 E1A 遺伝子を安定発現する 12-12S 細胞を樹立した。12-12S での Ad12 型 E1A タンパクの発現を確認するため Western blotting を行ったところ、12-12S には E1A タンパクの発現が認められたが、母細胞 HSC3 には認められなかった。また、蛍光免疫染色においては、12-12S には細胞質および核に E1A タンパクの存在が認められたが、HSC3 には陽性所見は認められなかった。

HSC3 および 12-12S における MMP mRNA の発現を Northern blotting により検索したところ、HSC3 と比べ 12-12S では MMP-1, -9 mRNA の発現が低下していた。またタンパクレベルでも、HSC3 と比べ 12-12S での MMP-1 タンパクの発現が低下していた。

マトリゲルを用いた in vitro invasion assay により HSC3 と 12-12S を比較したところ、基底膜成分をコートしたフィルターを通過した細胞数は、母細胞 HSC3 にくらべ 12-12S ではほぼ半減していた。

Ad12 型 E1A による MMP の発現抑制が転写レベルであるのかどうかを調べるため、MMP-9 遺伝子の転写調節領域を含むレポータープラスミドを用いて CAT assay を行った。HSC3 は肝細胞増殖因子 (HGF) のレセプターである c-Met を発現し、HGF 刺激により E1AF を介した MMP の転写を亢進することが知られている。MMP-9 野生型レポーターを導入した HSC3 では HGF 刺激により転写活性の亢進が認められた。これに対して、ETS 結合配列を削除した変異型レポーターを導入した HSC3 では HGF 刺激による CAT 活性の亢進はみられず、むしろ活性は低下した。12-12S では野生型レポーターを導入したにも関わらず変異型レポーターを導入した HSC3 と同様に HGF 刺激による転写亢進は認められなかった。

HSC3 と 12-12S における E1AF mRNA の発現を Northern blotting で検討した結果では、E1AF mRNA は HSC3 において強く発現していたのに対し、12-12S においてはその発現は低下していた。

本研究結果から、Ad12 型 E1A はヒトがん細胞の浸潤活性を抑制することが明らかになった。この結果は Ad5 型 E1A による結果と一致しており、Ad12 型 E1A は Ad5 型 E1A と同様にがん抑制遺伝子としての性質を持っていることが明らかになった。Ad12 型 E1A による浸潤能抑制には、Northern blotting や CAT assay の結果から MMP の転写レベルおよびタンパクレベルでの発現抑制が関与していることが示された。

Ad5 型における MMP 抑制の機序として、5 型 E1A が転写因子 AP-2 との直接相互作用により MMP-9 の転写を抑制すること、また 5 型 E1A が転写因子 AP-1 を阻害し MMP-1, -3 の転写を抑制することが報告されている。本研究においては Ad12 型 E1A は転写因子 E1AF の発現を抑制することにより MMP の転写レベルでの発現低下を促すことが示された。この Ad12 型 E1A による転写因子 E1AF を介した MMP 抑制経路はこれまでに報告されておらず、新たな経路の存在を示唆している。

E1AF はアデノウイルス E1A 遺伝子の転写調節領域に結合するヒト細胞の転写因子として分離同定され、E1AF が E1A の転写を亢進することは明らかである。一方、本研究の結果は Ad12 型 E1A が E1AF の発現を抑制することを示した。Ad E1A の mRNA 量はアデノウイルスの宿主細胞への感染後に急速かつ多量に増えるが、Ad DNA 複製が始まった後の E1A mRNA 量の上昇は穏やかなことが知られている。さらに、Ad5 型でトランスフォームしたヒト腎細胞株 293 細胞では E1AF が発現していないことが報告されている。

同様な機構の存在が p53 において報告されている。がん抑制遺伝子 p53 は転写因子であり、細胞に種々のストレスが加わった際に発現し、細胞周期の停止、アポトーシスの誘導などの機能を持つ様々な遺伝子の転写を亢進することが知られている。その p53 の転写産物の一つである MDM2 は逆に p53 の転写を抑制することから、p53-MDM2 間でネガティブフィードバック機構を作り p53 の過剰な産生を抑制していると考えられている。本研究の結果は、Ad E1A による E1AF の発現抑制のメカニズムには p53 と MDM2 にみられたものと同様のネガティブフィードバック機構が存在することを示唆するものと思われた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 向 後 隆 男

副 査 教 授 松 本 章

学 位 論 文 題 名

アデノウイルス12型 E1A ヒトがん細胞の 浸潤抑制機構における ets がん遺伝子 群転写因子 E1AF の関与

Adenovirus type 12 E1A suppresses the expression of E1AF,
an ets-oncogene family transctiption factor that reduces
the invasion ability of cancer cells

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は、以下の通りである。

本研究は、高腫瘍原性を有するアデノウイルス（以下、Ad）12型におけるE1A遺伝子の浸潤抑制能を明らかにする目的で、Ad12型E1Aが他のがん細胞の浸潤活性におよぼす影響、特に細胞外基質分解酵素（以下MMP）とets がん遺伝子群転写因子E1AFとの関連について検索したものである。

まず、高い浸潤活性を持つ口腔扁平上皮がん細胞HSC3にAd12型E1A発現プラスミドを遺伝子導入し、Ad12型E1A遺伝子を安定して発現する12-12S細胞を樹立した。Ad12型E1Aタンパクの発現を確認するために行ったWestern blottingにおいて、12-12SではE1Aタンパクの発現が認められたが、母細胞HSC3では発現は認められなかった。蛍光免疫染色においても、12-12Sでは細胞質および核にE1Aタンパクの存在が認められたが、HSC3では認められなかった。次いで、MMP mRNAの発現をNorthern blottingにより検索したところ、HSC3と比べ12-12SではMMP-1, -9 mRNAの発現が低下していた。またタンパクレベルでも、HSC3と比べ12-12SではMMP-1タンパクの発現が低下していた。さらにマトリゲルを用いたin vitro invasion assayによる比較したところ、フィルター通過細胞数は12-12Sでは母細胞HSC3に比べてほぼ半減していた。

次に、Ad12型E1AによるMMPの発現抑制が転写レベルで生じているか否かを調べるため、MMP-9遺伝子の転写調節領域を含むレポータープラスミドを用いてCAT assayを行った。HSC3は肝細胞増殖因子（HGF）のレセプターであるc-Metを発現しており、HGF刺激によりE1AFを介してMMPの転写を亢進することが知られている。MMP-9野生型レポーターを導入したHSC3では、HGF刺激により転写活性の亢進が認められた。これに対して、*ets* 結合配列を削除した変異型レポーターを導入したHSC3では、HGF刺激によるCAT活性の亢進はみられず、活性はむしろ低下した。一方、12-12Sでは野生型ならびに変異型レポーター導入のいずれにおいても、HGF刺激による転写亢進は認められなかった。Northern blottingにおいて、E1AF mRNAはHSC3において強く発現していたが、12-12Sではその発現は低下していた。

これらの結果は、Ad12型E1Aはヒトがん細胞の浸潤活性を抑制すること、ならびに浸潤能の抑制にはMMPの転写レベルおよびタンパクレベルでの発現抑制が関与していることを示している。

従来から、低腫瘍原性を有するアデノウイルスAd5型E1Aはがん抑制遺伝子としての性質を持つことが知られている。Ad5型におけるがんの抑制機序としては、Ad5型E1Aが転写因子AP-2との直接相互作用によりMMP-9の転写を抑制すること、ならびにAd5型E1Aが転写因子AP-1を阻害しMMP-1, -3の転写を抑制することが報告されている。一方、本研究でえられた結果は、Ad12型E1Aは転写因子E1AFの発現抑制を介してMMPの転写レベルでの発現を低下させることを示した。このAd12型E1Aによる転写因子E1AFを介したMMP抑制経路はこれまでに報告されておらず、新たな経路の存在を示唆するものである。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、Ad12型E1AはAd5型E1Aと同様にがん抑制遺伝子としての性質を有すること、ならびにAd12型E1Aは転写因子E1AFの発現抑制を介してMMPの転写レベルでの発現を低下させることによりがん細胞の浸潤能を抑制することを明らかにした点が高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。