

Cdt1を分子標的とした癌細胞増殖抑制の検討

学位論文内容の要旨

【緒言】

細胞には一細胞周期に一度のみ DNA 複製が起こるように制御する機構が備わっており、複製の「ライセンス化」制御と呼ばれる。つまり S 期の DNA 複製に先立ち、G1 期に複数の蛋白質からなる複製前複合体 pre-replication complex(pre-RC)がゲノム上に形成されることが必須となる。Cdt1 は G1 期に発現し DNA 上の origin recognition complex(ORC)と呼ばれる蛋白質に結合し、同じく pre-RC 構成蛋白である Cdc6 と協同して mini-chromosome protein (MCM)complex を DNA 上に結合させ、pre-RC を完成させる働きをもつ。このように Cdt1 の機能は G1 期に作用するが、S 期においては再複製が生じないように二つの経路で制御を受けている。その一つが S 期での SCF 複合体によるユビキチン化、プロテアソームでの分解であり、もう一つは S 期から M 期において Cdt1 のインヒビター蛋白である geminin が発現し、Cdt1 の ORC への結合を阻害する経路である。本研究では安定化させた geminin 変異体、すなわち destruction box を欠損させ、細胞周期に依存して分解されない geminin Δ D を HIV 由来の TAT 蛋白の下流に配したリコンビナント蛋白を製作し、細胞へ効率良く導入することで Cdt1 の機能に与える影響と癌の分子標的治療への応用の可能性を検討した。

【方法】

1. TAT リコンビナント蛋白の作成と精製

ヒト geminin cDNA より polymerase chain reaction (PCR)法にて geminin 全長、すなわち野生型 gemininWT および geminin cDNA より geminin の分解モチーフである destruction box (22~30 アミノ酸)を欠損させた geminin Δ D、コントロールとして green fluorescent protein cDNA の全長を PCR で増幅した。得られた PCR 産物を各々適切な制限酵素で切断し、pTAT-HA にクローニングした。次にこれら3種類のプラスミドで *E.coli*/BL21 を形質転換させ蛋白を合成させた。精製した TAT リコンビナント蛋白は、以後 TAT-gemininWT、TAT-geminin Δ D および TAT-GFP と記載する。

2. 癌細胞株における TAT リコンビナント蛋白の導入と細胞内での Cdt1 との会合、安定性の確認

細胞内への導入:TAT リコンビナント蛋白添加培養液(10 μ g/ml)で子宮頸癌細胞株(HeLa)を 2 時間培養し、抗 HA 抗体を一次抗体、二次抗体として FITC-conjugated 抗マウス抗体(Santa Cruz Biochemistry)を用いて免疫染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察した。Cdt1 との会合:同様に培養した HeLa 細胞の whole cell lysate を抗 HA 抗体で免疫沈降し、SDS-PAGE で分離泳動しニトロセルロース膜に転写した。抗 Cdt1 抗体を一次抗体としてウエスタンブロッティングを施行した。TAT リコンビナント蛋白の安定性:同様に培養した HeLa 細胞の培養液を交換後、経時的に whole cell lysate を回収し、抗 HA 抗体を一次抗体としてウエスタンブロッティングを施行した。

3. TAT-Geminin Δ D による pre-RC 形成抑制の検討

HeLa 細胞を M 期に同調後、リリースと同時に TAT リコンビナント蛋白を加え 12 時間培養した。

各々の細胞を回収し、細胞質蛋白、核結合蛋白を分離回収した。Pre-RC 構成蛋白の抗体すなわち抗 MCM7 抗体(Santa Cruz Biochemistry), 抗 ORC2 抗体(CALBOCHEM)および当研究室で作成した抗 geminin 抗体を一次抗体としてウエスタンブロッティングを施行した。

4. 細胞増殖曲線と FACS

細胞増殖曲線を得るために、各細胞株(HeLa, HL60, K562, DLD1, HCT116)を 10 μ g/ml の濃度で蛋白を加えた培養液で培養した。生細胞の数を経時的に測定した。アポトーシスの検討のために、上記と同様に培養した細胞を Annexin V-FITC(BECKMAN COULTER)と propidium iodide を用いて二重染色を行った。また、分裂期の細胞の測定のために、抗ヒストン H3(Ser10)抗体(Cell Signaling Technology)および propidium iodide で二重染色をした。また、細胞に含まれる DNA 含有量の測定のために、各々の細胞を培養 5 日目に回収し propidium iodide で染色した。これらの処理を加えた細胞は、FACS Calibur flow cytometer (program CELLQUEST, Boston Dickinson) を用いて測定し、FlowJo program (Digital Biology)で解析した。

5. 正常線維芽細胞株(WI38)での検討

WI38 に対して、癌細胞株と同様に TAT リコンビナント蛋白を加えて、細胞増殖に与える影響とアポトーシスの変化を検討した。

【結果と考察】

HeLa 細胞において 3 種類の TAT リコンビナント蛋白は速やかに細胞内に取り込まれ、TAT-gemininWT および TAT-geminin Δ D は細胞内の Cdt1 と会合した。また、細胞内で TAT-geminin Δ D は TAT-gemininWT に比べて明らかに安定であることが証明された。

形成される pre-RC を核分画に存在する MCM7 を指標として評価すると、TAT-geminin Δ D を加えた細胞において、核結合蛋白分画で MCM7 の発現が明らかに低下しており、Cdt1 の機能阻害が pre-RC 形成阻害につながることを確認された。また、TAT-geminin Δ D を加えることで、HeLa 細胞のみならず他の癌細胞株(大腸癌および白血病)でも著明な細胞増殖の抑制とアポトーシスの増加が認められた。一方で細胞分裂に対しては TAT-geminin Δ D は影響を与えず、細胞の DNA 含有量では低下が認められた。この二つの事象からは TAT-geminin Δ D により pre-RC 形成阻害が起こり DNA 複製が抑制されるものの、細胞分裂は抑制しないために pre-mature mitosis が出じ、アポトーシスが誘導されると考えられた。

一方、正常線維芽細胞株における同様の検討では、細胞増殖スピードは軽度低下するもののアポトーシスの誘導は見られなかった。

【結語】

TAT-geminin Δ D は癌細胞株に選択的に細胞増殖抑制とアポトーシスを誘導した。このことより Cdt1 の機能阻害は癌の分子標的治療への応用を期待させると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 畠 山 鎮 次

学位論文題名

Cdt1を分子標的とした癌細胞増殖抑制の検討

Cdt1 は細胞増殖の過程で、DNA 複製のライセンス化制御に関わる蛋白で、pre-replication complex (pre-RC) の構成蛋白と報告されている。近年この蛋白の癌組織での過剰発現などの報告もあり、本研究ではこの Cdt1 のインヒビター蛋白 *geminin* を恒常的に細胞内に発現させることで、癌細胞の増殖を抑制し細胞死の誘導が可能ではないかと考えた。インヒビターである *geminin* の発現量は細胞周期において Cdt1 と逆相関に制御を受けているため、*geminin* の APC/C による分解を防ぐために分解モチーフ (D-box) を欠損させ、かつ細胞内へ高率に導入する目的で、HIV 由来の TAT 配列を融合させた TAT-*geminin* Δ D を作製した。このリコンビナント蛋白を各種癌細胞株およびヒト線維芽細胞株の培養液に加えて、細胞増殖に与える影響を生細胞数の測定、アポトーシス細胞の割合の変化、pre-RC の形成に与える影響、DNA 量の変化、細胞分裂に与える影響を解析した。作製したリコンビナント蛋白は 10 μ g/ml の濃度で培養液に隔日投与した。癌細胞およびヒト線維芽細胞において、リコンビナント蛋白は速やかに細胞内に取り込まれ、endogenous Cdt1 と会合した。癌細胞では pre-RC の形成抑制、DNA 量の減少、アポトーシスの増加が確認されたが、ヒト正常線維芽細胞ではわずかに増殖抑制が観察されたが、アポトーシスは来たさないことが示された。以上から、TAT-*geminin* Δ D は癌細胞に選択的に細胞増殖抑制と細胞死を誘導する可能性が示された。

口頭発表に際し、副査の畠山教授より *geminin* の APC/C による分解以外の分解メカニズムの有無、および APC 認識モチーフ KEN-box の検討がなされたか、*geminin* の神経の発生・分化に与える影響への検討がなされているか質問があった。また、マウス細胞株での検討が有益である可能性を示唆していただいた。これに対して申請者は、KEN-box に関しては今後の検討を要すること、また *geminin* のもう一つの機能である HOX 遺伝子やポリコム遺伝子群の転写調節に関わる機能に関連した細胞周期制御とは別の制御機構が存在するかど

うか、また今回作製したリコンビナント蛋白が神経の発生と分化、増殖に与える影響の検討は、今後の課題であると回答した。ついで、副査の秋田教授から本研究の次のステップは何を検討しているか、また、ヒトでの治療への応用にはどのような可能性があるか、正常細胞および癌細胞での Cdt1 および *geminin* の発現に差があるかどうかに関して質問があった。これに対して申請者は、癌細胞選択的に細胞死が誘導されるメカニズムの解析、*in vivo* 実験を加える必要があること、ヒトへの臨床応用のためには正常細胞への導入を防ぐために *drug delivery system* に検討を加える必要があること、および癌細胞においては Cdt1 と *geminin* の発現量が増加している報告があると回答した。さらに、主査の浅香教授より正常細胞でアポトーシスが生じない理由への考察、正常細胞に関して WI38 以外での検討の有無、本研究の今後の展開に関して質問があった。これに対して申請者は、正常細胞では、細胞周期を停止するチェックポイント機構が機能している可能性が考えられたが、今回の検討では明らかに出来なかったこと、正常細胞は WI38 のみの検討となったが、NIH3T3 での検討では細胞死が誘導されないことを回答した。また、今後は *in vivo* 実験を行うことで、*geminin* の細胞増殖への影響のみならず神経系への影響の有無などの生体での効果を詳細に検討する必要があると回答した。

本研究は、安定型 *geminin* を TAT モチーフに融合させて細胞内へ誘導し、癌細胞に選択的に増殖を抑制して細胞死を誘導させることが可能であることを明らかにした。本研究を足掛かりとして今後の更なる *geminin* および Cdt1 の機能解析と癌治療への応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、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。