

学位論文題名

NFBD1/MDC1 stabilizes oncogenic MDM2 to contribute to cell fate determination in response to DNA damage

(NFBD1/MDC1はMDM2を安定化させDNA損傷における
アポトーシス制御に寄与する)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

NFBD1又はMDC1は、BRCT super-family memberの一つである。FHAドメイン、PSTドメイン、BRCTドメインを持つ。DNA損傷時、損傷部位にMRN複合体をリクルートし、nuclear fociを形成させる。従って、NFBD1はDNA修復の導入にあたって重要な役割を果たしている。

また、NFBD1にはアポトーシスを抑制する機能もある。NFBD1がどのようにアポトーシスに対し抵抗性を強めるのかは不明であったが、最近、NFBD1はDNA損傷の早期においてp53のアミノ末端に結合し、Ser-15のリン酸化を阻害することによってアポトーシスを抑制する事が判明した。また、DNA損傷の晩期には、NFBD1は減少し、p53がアクティブに働くようになる。

今回我々は、NFBD1がMDM2を安定化させる事を初めて見出した。それにより、NFBD1によるMDM2の安定化がDNA損傷に対する細胞の抵抗性を増強させる可能性があると思われた。

【材料と方法】

ヒト骨肉種由来のU2OS細胞、ヒト子宮頸癌由来のHeLa細胞、アフリカミドリザル胎児腎臓由来のCOS7細胞を用いた。培養方法はDulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)にfetal bovine serum(FBS)、ペニシリン、ストレプトマイシンを混入し、37℃のインキュベーター器に入れて培養した。DNA損傷は、アドリアマイシンを各細胞に投与して誘導した。

【結果】

U2OS細胞にアドリアマイシンを投与し、濃度依存性にアポトーシスが増加することを確認した。DNA損傷の早期では、p53とSer-15リン酸化されたp53がそれぞれ増加していることが認められた。p53と密接な関連のあるMDM2も同様に増加していることが認められた。また、NFBD1はDNA損傷の晩期において、蛋白レベルでもmRNAレベルでも著明に減少した。また、同じく晩期においてMDM2はmRNAレベルでは変化がなかったが、蛋白レベルでは減少が見られた。従って、NFBD1とMDM2は、DNA損傷の晩期において、何らかの関連があると思われた。

MDM2を導入したCOS7細胞を用いて、NFBD1を導入したところ、NFBD1の濃度依存性にMDM2は蛋白レベルで増加した。しかし対照的に、mRNAレベルでは変化を認めなかった。従って、NFBD1はMDM2を蛋白レベルで安定化させると考えられた。

NFBD1とMDM2が干渉するかを検討するため、COS7細胞にNFBD1,MDM2

を様々な組み合わせで導入し、NFBD1 抗体で免疫沈降させ、MDM2 抗体で免疫染色を行ったところ、免疫沈降には MDM2 が含まれていた。内在性に相互作用しているかどうかと検討するため、内在性 NFBD1 を多く発現している事が知られている HeLa 細胞を用いたところ、内在性 NFBD1 は内在性 MDM2 と共に免疫沈降されることが分かった。従って、NFBD1 は MDM2 と複合体を形成すると考えられた。

NFBD1 の MDM2 が結合する部位を特定するため、MDM2 を導入させた COS7 細胞に NFBD1 のドメインである FHA、PST、BRCT をそれぞれインキュベートし、MDM2 抗体で免疫沈降させたところ、BRCT ドメインのみが MDM2 と免疫沈降することが分かった。従って、NFBD1 の BRCT ドメインが MDM2 との複合体形成に重要であることが分かった。

内在性 NFBD1 を siRNA でノックダウンさせた細胞は DNA 損傷に対する抵抗性が減弱するとの報告がある。U2OS 細胞に siRNA を用いて NFBD1 をノックダウンさせると、内在性 MDM2 が蛋白レベルで著明に減少し、mRNA レベルでは変化を認めなかった。また、FACS 分析では、アドリマイシンによるアポトーシスは NFBD1 によって抑制された。従って、NFBD1 による MDM2 の安定化作用は、DNA 損傷時のアポトーシスを決定する際に重要な役割を果たしている事が示唆された。

更に DNA 損傷における MDM2 の作用を検討するため、U2OS 細胞に MDM2 を含むプラスミドと含まないプラスミドをそれぞれ導入した。導入が行われていることを確認した後、アドリマイシンを各種濃度で投与したところ、MDM2 はアドリマイシンによるアポトーシスを抑制することを MTT アッセイで確認した。従って、MDM2 は細胞のアドリマイシンに対する耐性獲得に寄与していると思われた。

【考察】

今回我々は、DNA 損傷の晩期に、NFBD1 と MDM2 が共に減少することを発見した。更なる研究により、NFBD1 は MDM2 と結合し、蛋白レベルで安定化させる事を見出した。また、NFBD1 による MDM2 の安定化は DNA 損傷に対する抵抗性を増強する事を見出した。

MDM2 が p53 をユビキチン化し、分解する事は良く知られている。p53 と MDM2 の細胞内でのフィードバック機構によるバランスは、DNA 損傷時に細胞をアポトーシスに向かわせるか否かの決定に関与していると考えられる。実際、siRNA を用いて MDM2 をノックダウンさせた A549 細胞は放射線に対する感受性が高まる。また、MDM2 はユビキチン化によるプロテアソーム経路で分解されることが知られている。MDM2 と p21^{WAF1} がプロテオソームによって分解される際に細胞がアポトーシスを起こす。

今回の検討において、アドリマイシンを用いた DNA 損傷において、MDM2 は mRNA レベルでは早期晩期に関わらず増強していたが、蛋白レベルでは晩期において減少していた。しかもその減少は NFBD1 の減少と強く関わっていると思われた。

NFBD1 による MDM2 の安定化についての詳細はまだ不明であるが、NFBD1 は MDM2 を安定化させ、DNA 損傷を受けた細胞がアポトーシスを抑制することが分かった。

プルダウンアッセイでは、MDM2 は NFBD1 の BRCT ドメインと関連している事が分かった。BRCT ドメインは蛋白・蛋白結合モジュールの一つとして機能しているとされている。例えば、p53 は BRCA1 や 53BP1 の BRCT ドメインと結合する事が知られている。また、NFBD1 は BRCT ドメインを介して p53 に結合し、アドリマイシンによる p53 の Ser-15 リン酸化を抑制することが判明している。更に、NFBD1 の過剰発現は p53 を不安定化させる。従って、NFBD1 の BRCT ドメインは、p53 と MDM2 の物理的及び機能的な作用の場として働いていると思われた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

NFBD1/MDC1 stabilizes oncogenic MDM2 to contribute
to cell fate determination in response to DNA damage

(NFBD1/MDC1はMDM2を安定化させDNA損傷における
アポトーシス制御に寄与する)

細胞のDNA損傷において、p53とそのユビキチン・リガーゼであるMDM2が重要な役割を果たしている。またNFBD1は、DNA損傷において重要な役割を果たしている。今回の研究に先立ち、DNA損傷の初期応答過程においてNFBD1がp53のリン酸化を抑制し、アポトーシスを抑制していることを見出した。そこで、NFBD1がMDM2に対しどのように関連しているのか検証した。

アドリマイシンによるDNA損傷後、NFBD1及びMDM2は、蛋白レベルではDNA損傷の晩期に共に減少する事、mRNAレベルではMDM2には変化がないことから、NFBD1とMDM2とはDNA損傷の晩期に蛋白レベルでの関連が示唆された。また、NFBD1を過剰発現させると、MDM2が蛋白レベルで増加する事が分かった。従って、NFBD1はMDM2を蛋白レベルで安定化させる事が分かった。

免疫沈降反応を施行したところ、NFBD1とMDM2が直接結合し、複合体を形成することで安定化させていることが分かった。しかも、in vitroでのpull-down assayではNFBD1のBRCTドメインがMDM2と直接結合する事が分かった。

同様に、NFBD1を発現抑制したところ、MDM2も蛋白レベルで減少した。

NFBD1やMDM2をそれぞれ過剰発現させた細胞にアドリマイシンを投与したところ、アポトーシスが抑制され、NFBD1はMDM2を介してアポトーシスを抑制していることが分かった。

まとめとして、NFBD1とMDM2が複合体を形成することで自己ユビキチン化を阻害しMDM2を蛋白レベルで安定化させ、その結果としてp53の分解を促進する事によりアポトーシスを抑制させる一連の機序が考えられた。

質疑応答では、副査の畠山教授より、①NFBD1を過剰発現させた系でp53の発現をみる実験はしているか、②p53がある程度発現している細胞としてどのような細胞を用いたか、③グリオーマでNFBD1を殆ど発現していない細胞があるがこれを使用したか、という質問を受けた。これらに対し、①アドリマイシンを用いた系ではp53やリン酸化されたp53が増加している事は確認したが、NFBD1を過剰発現させた系での実験はしていない、②U2OSをメインとして、COS7も使用しており、どちらもp53を発現している、③使用していないと回答した。

次に、副査の秋田教授より、④患者由来の検体において NFBD1 の増幅などの報告はあるか、⑤NFBD1 が MDM2 以外と結合するという報告はあるか⑥MDM2 と p53 の結合に関係する物質はあるか⑦NFBD1 ないし MDM2 をターゲットとした治療はあるかという質問を受けた。これらに対し、④臨床データとしては報告はないが、NFBD1 をノック・ダウンすると放射線に対する感度が増大するという報告はある、⑤今のところはない、⑥正の方向としては p300 がある、⑦癌細胞に特異的に NFBD1 をノックダウンさせると放射線に対する感受性が高まるので、治療効果が期待できると思われる。また、MDM2 と p53 の結合を抑制する Nutlin-3 があり、これが p53 を活性化させ、癌抑制機能を活性化させるという報告があると回答した。

次に主査の浅香教授より、⑧HeLa が NFBD1 rich である理由、⑨HeLa 内では、NFBD1 と MDM2 とは複合体を形成するか、⑩この複合体はアポトーシスを抑制する方向に働くのなら発癌の方向に持っていくのか、⑪外科としての臨床応用、⑫mutant p53 に対してはどう働かなどを質問された。これらに対し、⑧調べた範囲内では報告はない、⑨先ほど提示した内在性の NFBD1 と MDM2 の直接結合を実験したデータは HeLa を用いている、⑩DNA 損傷の場においてはその通り、⑪前述の放射線感受性や Nutlin-3 が将来臨床応用できることを期待していること、例として乳癌の骨転移において、放射線療法を行う際に、腫瘍の放射線に対する感度を増強させられれば治療効果があがると思われる、⑫MDM2 と結合されない、と回答した。

最後に、副査である藤堂教授より、この研究は意義があり続けること、将来の自分進む道にも役立っていくよう激励を受けた。

この論文は、NFBD1 が p53 のユビキチン・リガーゼである MDM2 と複合体を形成することを初めて証明した論文であり、今後の NFBD1 の抗アポトーシス機能を応用した抗腫瘍効果を臨床応用する上で非常に重要な研究であると期待される。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。