

学位論文題名

Ubiquitin-conjugating enzyme UBE2Q2
suppresses cell proliferation and is down-regulated in
recurrent head and neck cancer

(ユビキチン結合酵素 UBE2Q2 の細胞増殖抑制能および
再発頭頸部癌における発現低下に関する研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 頭頸部癌はヒトに発生する癌の部位別割合において6番目に発生数の多い癌であり、その発生部位の解剖学的特殊性から早期発見が難しい場合があることや、外科的切除または化学療法、放射線療法などの治療に対しても制限を余儀なくされるために、他領域の発生部位の癌に比しても予後が悪く、世界的にも重要な健康課題の一つとされている。また頭頸部癌は唾液腺や甲状腺など一部の臓器を除いてそのほとんどが扁平上皮癌であり、主に鼻・副鼻腔、口腔、咽頭および喉頭に発生する。その発生の主な要因として喫煙や飲酒などの生活習慣を起因とした発癌性物質への曝露や、パピローマウイルスなどの感染の関与が考えられている。しかし診断や治療に有用な臨床的指標や分子標的治療の対象はいまだ明らかとはなっていない。この頭頸部癌発生のメカニズムを明らかにすることは頭頸部癌に対する治療成績を向上し、治療後の生存率を改善させることに寄与することが期待される。一方悪性新生物を遺伝子で解析した場合、正常の細胞では発現がほとんど見られない遺伝子が過剰に発現する場合がある。最近、UBE2Q2 と命名された遺伝子が頭頸部扁平上皮癌、特に下咽頭癌において高頻度に発現していることが報告された。われわれの研究においても、先に述べたように下咽頭癌のみならず他の頭頸部領域の悪性腫瘍組織においても UBE2Q2 遺伝子が過剰に発現していることが明らかとなった。この事実は UBE2Q2 遺伝子の発現が頭頸部悪性腫瘍と何らかの関わりを持つ可能性を示唆していると考えられた。また UBE2Q2 はユビキチン化に関与する酵素の一つとして考えられている。ユビキチン化はタンパク質の翻訳後修飾に関わる重要な機能を担っており、タンパク質分解を通してタンパク質の品質をコントロールし、保証していると考えられている。このユビキチン化はユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン連結酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) の3種類の酵素によって触媒され、UBE2Q2 はこのうちユビキチン連結酵素 (E2) の一つとして報告されている。UBE2Q2 は 375 アミノ酸残基から成り立ち、RWD、コイルドコイル、ユビキチン結合部の3種類の機能的ドメインから構成される。この UBE2Q2 の不活化は細胞分裂の停止を引き起こし、それが細胞増殖に影響を与えるとされている。この機能は癌細胞の増殖に対し抑制的に働く可能性を有していると考えられる。そこでわれわれは UBE2Q2 遺伝子の発現上昇と頭頸部悪性腫瘍との関わりを分子生化学的手法を用いて明らかにしようとして試みた。

【材料と方法】 頭頸部扁平上皮癌細胞株である HEp2 を始め複数の細胞株および頭頸部扁平上皮癌組織を用いて、UBE2Q2 タンパク質の発現をウエスタン解析法および免疫蛍光染色法により検討した。また UBE2Q2 の野生型とドミナントネガティブ型の発現ベクターを製作し、パルスチェイスアッセイおよび免疫蛍光染色法により比較検討した。抗腫瘍薬である Cisplatin および Docetaxel に対する耐性細胞株および再発頭頸部扁平上皮癌組織における

UBE2Q2 タンパク質の発現をウエスタン解析法および免疫蛍光染色法により比較検討した。また、部位の異なる複数の扁平上皮癌組織における UBE2Q2 の発現を統計学的に検討した。さらに、UBE2Q2 を過剰発現した安定細胞株を用いて細胞の増殖能を検討した。また、その細胞株を用いて細胞周期の各段階における UBE2Q2 の発現をウエスタン解析法およびフローサイトメーターで検討した。さらに、癌遺伝子として活性化型 Src と UBE2Q2 と共発現させた場合におけるフォーカスアッセイおよび足場依存性細胞増殖能を比較検討した。

【結果】 ヒト悪性腫瘍由来細胞株である HEP2、Ishikawa、HT1080 および U251 細胞株において UBE2Q2 が高発現していた。また免疫蛍光染色において、UBE2Q2 は核内に局在することが明らかとなった。頭頸部悪性腫瘍組織における UBE2Q2 の発現の比較では咽頭および喉頭癌における発現が上昇していた。頭頸部扁平上皮癌組織の抗 UBE2Q2 抗体による組織染色においては、核における UBE2Q2 の高発現が顕著であった。また UBE2Q2 の野生型とドミナントネガティブ型との間に細胞内発現部位の差異は見られなかった。抗腫瘍薬耐性細胞株および再発頭頸部扁平上皮癌組織における UBE2Q2 の発現は明らかに低下していた。比較したパラメーターのうち、年齢、性別、腫瘍分化度、臨床的進展度別の比較においては UBE2Q2 発現の差は認められなかった。しかし、原発部位別の比較においては中、下咽頭および喉頭における UBE2Q2 の核染色性が高かった。また抗腫瘍薬未治療の切除組織例において核の高い染色性が認められた。UBE2Q2 を過剰発現した細胞は細胞増殖が抑制された。UBE2Q2 と活性化型 Src を共発現させた細胞において、UBE2Q2 の発現した細胞においては細胞集塊の形成や足場依存性の colony 増殖が抑制された。

【考察】 癌関連遺伝子の発癌におけるメカニズムとして、oncogene の活性化または tumor suppressor gene の不活化が重要であることが知られている。今回われわれの研究において示された頭頸部扁平上皮癌細胞株や頭頸部扁平上皮癌組織で UBE2Q2 の発現上昇という結果は、通常であれば UBE2Q2 が oncogene としての性質を有しているものと考えることが可能である。しかしながら、Cisplatin や Docetaxel などの抗腫瘍薬に対し耐性を獲得した頭頸部扁平上皮癌細胞株や再発頭頸部扁平上皮癌組織において UBE2Q2 の発現の減少が認められた。また UBE2Q2 を過剰発現した頭頸部扁平上皮癌細胞株では細胞増殖が抑制され、さらに UBE2Q2 を過剰発現させた線維芽細胞株においては、細胞集塊の形成や足場依存性の細胞増殖の抑制が確認された。この事実からは UBE2Q2 が癌抑制遺伝子的な働きをしていることが推察された。一方、ユビキチン-プロテアソームシステムは生体内のタンパク質分解系に関与する重要なシステムであることが知られている。今回の研究対象である UBE2Q2 はユビキチン連結酵素 (E2) の一種であると報告されている。タンパク質分解に関与する UBE2Q2 が癌抑制遺伝子的な働きをすることから考えると、ある種の癌遺伝子産物の分解制御に関与する可能性がある。癌化した細胞においては UBE2Q2 遺伝子が変異することで酵素として不活化され、その正常機能が破綻している可能性も考えられる。

【結論】 本研究で癌細胞増殖制御に UBE2Q2 が関与する可能性が示された。UBE2Q2 遺伝子およびその遺伝子産物の研究は、癌化制御に関与するタンパク質を解明するための端緒となり得ると考えられ、さらには頭頸部扁平上皮癌発生の臨床学的指標および新規抗癌剤開発における一助として寄与する可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 佐 邊 壽 孝
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 福 田 諭

学 位 論 文 題 名

Ubiquitin-conjugating enzyme UBE2Q2 suppresses cell proliferation and is down-regulated in recurrent head and neck cancer

(ユビキチン結合酵素 UBE2Q2 の細胞増殖抑制能および
再発頭頸部癌における発現低下に関する研究)

正常の細胞では発現が低い遺伝子が悪性新生物において過剰に発現する場合がある。最近、UBE2Q2 と命名された遺伝子も頭頸部扁平上皮癌、特に下咽頭癌において高頻度に高い発現をすることが明らかとなった。そこで UBE2Q2 遺伝子の発現が頭頸部悪性腫瘍と何らかの関わりを持つ可能性を示唆していると考えられた。本論文においては、特に UBE2Q2 遺伝子の発現上昇と頭頸部悪性腫瘍との関係が病理組織学的手法及び分子生化学的手法を用いて解析された。

まず頭頸部扁平上皮癌細胞株である HEp2 を始め複数の細胞株および頭頸部扁平上皮癌組織を用いて、UBE2Q2 タンパク質の発現をウエスタン解析法および免疫蛍光染色法により検討した。その結果、HEp2、Ishikawa、HT1080 および U251 細胞株において UBE2Q2 が高発現していた。また免疫蛍光染色において、UBE2Q2 は核内に局在することが明らかとなった。頭頸部悪性腫瘍組織における UBE2Q2 の発現の比較では咽頭癌及び喉頭癌における発現が上昇していた。そして頭頸部扁平上皮癌組織においては、核における UBE2Q2 の高発現が顕著であった。次いで UBE2Q2 の野生型とドミナントネガティブ型の発現ベクターを作製し、パルスチェイスアッセイおよび免疫蛍光染色法により比較検討したが、両者の間に細胞内発現部位の差異は見られなかった。また Cisplatin および Docetaxel に対する耐性細胞株および再発頭頸部扁平上皮癌組織における UBE2Q2 タンパク質の発現を検討した。その結果、抗腫瘍薬耐性細胞株および再発頭頸部扁平上皮癌組織における UBE2Q2 の発現は明らかに低下していた。また原発部位別の比較においては中咽頭癌、下咽頭癌および喉頭癌における UBE2Q2 の核内染色性が高いことが判明し、各種治療後の比較においては抗腫瘍薬未治療の切除組織例において UBE2Q2 の高い核内染色性が認められた。さらに、

UBE2Q2 を過剰発現した安定細胞株を用いて、細胞増殖能及び細胞周期の各段階における UBE2Q2 の発現を検討した。その結果、UBE2Q2 を過剰発現した細胞は細胞増殖が抑制されていた。さらに癌遺伝子として活性化型 Src と UBE2Q2 と共発現させた場合におけるフォーカスアッセイおよび足場依存性細胞増殖能を比較検討した結果、共発現させた細胞においてフォーカス形成能や足場依存性コロニー形成能が抑制された。

今回の研究において示された頭頸部扁平上皮癌細胞株や頭頸部扁平上皮癌組織で UBE2Q2 の発現上昇という結果は、通常であれば UBE2Q2 が癌遺伝子としての性質を有しているものと考えることが可能である。しかしながら、Cisplatin や Docetaxel などの抗腫瘍薬に対し耐性を獲得した頭頸部扁平上皮癌細胞株や再発頭頸部扁平上皮癌組織において UBE2Q2 の発現の減少が認められた。また UBE2Q2 を過剰発現した頭頸部扁平上皮癌細胞株では細胞増殖が抑制され、さらに UBE2Q2 を過剰発現させた線維芽細胞株においては、細胞集塊の形成や足場依存性の細胞増殖の抑制が確認された。これらのことから UBE2Q2 が癌抑制遺伝子的な働きをしていることが推察された。タンパク質分解に関与する UBE2Q2 が癌抑制遺伝子的な働きをすることから考えると、ある種の癌遺伝子産物の分解制御に関する可能性がある。また、癌化した細胞においては UBE2Q2 遺伝子に変異することで不活化され、その正常機能が破綻している可能性も考えられた。UBE2Q2 遺伝子およびその遺伝子産物の研究は、癌化制御に関与するタンパク質を解明するための端緒となり得ると考えられ、さらには頭頸部扁平上皮癌発生の臨床学的指標および新規抗癌剤開発における一助として寄与する可能性が示唆された。

口頭発表後、副査の佐邊教授からは UBE2Q2 の癌抑制遺伝子としての特質、および UBE2Q2 の関与する微小管の特異性の有無について、副査の福田教授からは再発頭頸部癌における UBE2Q2 発現低下の機序、UBE2Q2 の臓器特異的発現の理由、および今後の治療や検査への応用の可能性についての質問があった。次いで、主査の秋田教授からは UBE2Q2 の癌抑制遺伝子としての特質、UBE2Q2 の微小管重合に及ぼす影響とユビキチン結合酵素としての機能との関係、および UBE2Q2 の細胞内局在について、副査の畠山教授からは UBE2Q2 の発現が頭頸部癌で上昇していることの妥当性、ユビキチン-プロテアソーム系における E2 としての UBE2Q2 の酵素学的意味合い、SUMO などユビキチン以外のタンパク質分解系の関与の可能性、および UBE2Q2 結合タンパク質の同定に関する実験内容などについての質問があった。いずれの質問に対しても申請者は自身の研究結果や文献的知識に基づき適切に回答した。

この論文は下咽頭癌で高発現するとされる UBE2Q2 の頭頸部癌における臓器特異的発現性を検討し、またその発現が細胞増殖や発癌の抑制に関与し、さらに UBE2Q2 の発現と抗癌剤耐性組織との関係を検討した点で高く評価され、今後の頭頸部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。