

学位論文題名

ユビキチンリガーゼ estrogen responsive finger protein (EFP) の細胞増殖に及ぼす影響と作用機序の解析

学位論文内容の要旨

【背景と目的】ユビキチン化はタンパク質の翻訳後修飾の一つであり、細胞周期制御、シグナル伝達、癌抑制遺伝子の発現調節などのさまざまな生体内の重要な機能を司っている。ユビキチンは、ユビキチン活性化酵素 (E1) に転移され、ユビキチン結合酵素 (E2) を介して最終的にユビキチンリガーゼ (E3) によって認識されている基質タンパク質に付加される。基質タンパク質上に4つ以上のポリユビキチン鎖が形成されるとプロテアソームにより認識され分解される。基質タンパク質を認識・結合する E3 は多数存在しており、そのうちのいくつかは腫瘍の発生機序に深く関係している。

Estrogen-responsive finger protein (EFP) は、その mRNA の 3'非翻訳領域に estrogen receptor (ER) 結合部位である estrogen-responsive element (ERE) を持ち、エストロゲンによりその発現レベルが調節される一次応答タンパク質である。EFP は 630 アミノ酸で構成され、N 末端に RING フィンガードメインを持つ。RING フィンガードメインは環状構造の中に Zn^{2+} を配位した特徴的な構造をしており、ユビキチンリガーゼ活性を示すタンパク質の多くが有するモチーフで、EFP も E3 であることが知られている。EFP はエストロゲン依存性細胞増殖と生殖器官の正常の発生に不可欠と報告されている。EFP は正常乳腺と比較して授乳期乳腺と良性腫瘍で高発現しているが、乳癌では逆に発現は低下しており、乳腺組織の分化に重要な役割を担っていると考えられる。また、正常組織では ER の発現と EFP の発現はよく相関するが、乳癌組織では両者の発現に相関を認めない。これは乳癌細胞では EFP の発現量がエストロゲンのコントロールから外れていることを示しており、EFP が癌化のメカニズムに関与している可能性を示唆している。Urano らは、EFP は 14-3-3 σ をユビキチン化し分解を促進する E3 であり、G2 停止を引き起こす negative regulator であると報告した。同時に EFP をノックダウンした乳癌細胞では増殖が抑制され、EFP の過剰発現した乳癌細胞ではエストロゲン非依存性増殖を示すことも報告している。これは EFP が細胞増殖に対して促進的に働き、エストロゲンによる増殖コントロールを仲介していることを示している。

乳癌はエストロゲン依存性増殖を示す代表的な腫瘍性疾患であり、ER 発現が認められる乳癌患者には、エストロゲンレベルを低下させる、またはエストロゲンに対する競合的阻害薬を投与する内分泌療法が行われるのが一般的である。しかし、その大部分はいずれ内分泌療法に対して耐性を獲得する。したがって EFP の機能解明は腫瘍発生機序の解明のみならず、内分泌療法に対する耐性獲得機序の解明にもつながる可能性がある。

【材料と方法】細胞培養：T-47D 細胞及び HeLa S3 細胞は、10%FCS 含有 DMEM を用いて培養した。エストロゲン不含状態では、Charcoal/Dextran 処理 FCS を含む DMEM (フェノールレッド不含) で 48 時間培養してから使用した。RNAi: EFP の発現抑制には siRNA による RNAi を用いた。EFP cDNA の 711-729 領域を対象とした shRNA をデザインし、PCR 法を行った。遺伝子導入：T-47D 細胞および HeLa S3 細胞への遺伝子導入はレトロウィルスベクターを用いて行った。HEK293T 細胞および免疫蛍光染色の際の HeLa S3 細胞への遺伝子導入はリン酸カルシウム法を用いて行った。SDS-PAGE およびウエスタンブロットティング法：細胞溶解バッファーにより細胞抽出液を調整し、SDS-PAGE を行った。enhanced chemiluminescence system で検出、NIH image により定量化した。細胞増殖アッセイ：96 ウ

エルプレートに細胞を播種し、0, 24, 48 及び 72 時間後に細胞数の計測を行った。コロニーアッセイ:0.53%ボトムアガロースの上に T-47D 細胞混合 0.4%トップアガロースを凝固させて培養を行い、14 日目に長径 100 μ l 以上のコロニーを計数した。免疫蛍光染色:カバーグラスの上で HeLa S3 細胞を培養し、HA-EFP を遺伝子導入した。2%ホルムアルデヒド溶液で固定した後、一次抗体および二次抗体で反応させ、最後に核染色を行った。一次抗体には抗 HA 抗体および抗 p27 抗体を用いた。RT-PCR および qPCR: HeLa S3 細胞より RNA を抽出し RT-PCR および qPCR を行った。

【結果】ER α の発現している乳癌細胞 T-47D に、FLAG-EFP を導入し発現させウエスタン解析を行ったところ、内在性 EFP とほぼ同量(93%)の FLAG-EFP の発現が認められた。同様に siRNA を導入した細胞を作製し、EFP の発現量をウエスタン解析したところ、著明な発現量減少(39%)が認められた。次に作製した細胞株を用いて細胞増殖アッセイを行った。その結果、コントロール細胞と比較して、EFP 過剰発現細胞では増殖が抑制され、ノックダウン細胞では増殖促進が認められた。エストロゲン不含状態でも同様に EFP 過剰発現細胞では増殖が抑制され、ノックダウン細胞では増殖促進が認められた。EFP は 14-3-3 σ を分解して細胞増殖を促進することが既に知られているが、本実験では逆の結果となり、EFP の別の機能の存在が予想された。また、この機能にはエストロゲンは関与していない可能性が考えられた。軟寒天培地を用いたコロニーアッセイでは、EFP 過剰発現細胞でコロニー形成が抑制されノックダウン細胞でコロニー形成が促進されており、EFP は anchorage-independent growth に対して抑制的に作用すると考えられた。EFP の細胞周期における作用を調べるためにウエスタン解析を行い、EFP 過剰発現細胞では Myc の発現量減少が認められ、一方、p27 や 14-3-3 σ の発現量増加が認められた。EFP ノックダウン細胞では逆に Myc の発現量増加が認められたが、p27 と 14-3-3 σ の変化を確認することはできなかった。この結果はエストロゲン非存在下でも同様であった。

そこで ER α を発現していない HeLa S3 細胞を用いて解析を行った結果、HeLa S3 の EFP 過剰発現細胞でも同様に細胞増殖は抑制されており、Myc の発現量減少と p27 の発現量増加が認められたが、14-3-3 σ の発現量には変化が認められなかった。したがって、EFP は Myc あるいはその上流のシグナル伝達経路に対して作用していると推測された。またその作用機序にはエストロゲンは関与していない、もしくは関与していても必須ではないと考えられた。

RT-PCR および qPCR を行い、Myc と p27 の mRNA 量を計測したところ mRNA 量に変化を認めなかった。したがって、EFP は Myc 及び p27 の合成量には影響を与えておらず、分解量を変化させていることが示唆された。

【考察】本報告では EFP を過剰発現した細胞では細胞増殖速度が抑制されることを明らかにした。ER α が発現している T-47D 細胞のみならず、ER α が発現していない HeLa S3 細胞でも同様の結果であったことから、この機序に対してエストロゲンは関与していない、あるいは関与はしていても必須ではないと考えられる。この結果は Urano らの報告とは異なるが、乳癌組織では EFP の発現が低下していることから考えると、むしろ合理的と考えられる。しかし一方で、EFP が乳癌 (invasive ductal carcinoma)で高発現しているという報告もあり、一元的に考えることはできない可能性もある。

次に Cyclin C, Cyclin E, Cyclin B をそれぞれ制御している Myc, p27 及び 14-3-3 σ の発現量を調べると、EFP は Myc を減少させ p27 を増加させていることが判明した。これは細胞周期制御のシグナル伝達において EFP の作用点が Myc か、あるいはより上流であることを示している。Myc および p27 の発現量変化には mRNA 量の変化は伴っておらず、タンパク質合成ではなく、分解量の変化を反映していると考えられる。

今後は、EFP が Myc と直接結合しているのか、EFP は Myc をユビキチン化しているか、Myc の減少にプロテアソームが関与しているかなどを検討していく必要がある。最終的には、EFP の細胞周期制御に関する機能を解明することで、乳癌の発生機序、エストロゲン依存性の獲得・消失に関わる新たな知見が期待できるかもしれない。

【結論】ある種の細胞系列においては、EFP は細胞増殖に対して抑制的に作用していることが判明した。EFP は Myc を減少させ、p27 を増加させていたが、両者の mRNA 量には変化を与えておらず、合成ではなく、分解を制御することが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

| | | |
|----|-----|------|
| 主査 | 教授 | 田中伸哉 |
| 副査 | 教授 | 平野聡 |
| 副査 | 教授 | 武富紹信 |
| 副査 | 准教授 | 神山俊哉 |

学位論文題名

ユビキチンリガーゼ estrogen responsive finger protein (EFP) の細胞増殖に及ぼす影響と作用機序の解析

Estrogen-responsive finger protein (EFP) は、エストロゲンによりその発現レベルが調節される一次応答分子である。EFP は 14-3-3 σ をユビキチン化し分解を促進するユビキチンリガーゼであり、細胞増殖を促進し、EFP の過剰発現した乳癌細胞ではエストロゲン非依存性増殖を示すと報告されている。これは EFP がエストロゲンによる増殖コントロールを仲介していることを示している。一方、乳癌組織での EFP の発現量、Estrogen-receptor(ER)や 14-3-3 σ の発現との相関は一定の結果となっておらず、一元的には説明困難である。そこで EFP の他の機能の探索、および細胞増殖における EFP の位置づけを明らかにするため、今回の研究を行った。

まず ER 陽性乳癌細胞 T-47D にレトロウイルスベクターを用いて EFP および siRNA を遺伝子導入し過剰発現(193%)およびノックダウン(39%)の安定変異株を作成した。細胞増殖アッセイの結果、EFP 過剰発現細胞では増殖が抑制され、ノックダウン細胞では増殖促進が認められた。コロニーアッセイでは、EFP 過剰発現細胞でコロニー形成が抑制されノックダウン細胞でコロニー形成が促進されており、EFP は anchorage-independent growth に対しても抑制的に作用すると考えられた。ウエスタン法による解析では、EFP 過剰発現細胞で Myc の発現量減少が認められ、p27 および 14-3-3 σ の発現量増加が認められた。EFP ノックダウン細胞では逆に Myc の発現量増加が認められたが、p27 と 14-3-3 σ の変化を確認することはできなかった。以上の結果はエストロゲン非存在下でも同様であり、この機能にはエストロゲンは関与していないか、必須ではないと考えられた。この結果は既知の知見とは異なるが、乳癌組織で EFP の発現が低下しているという報告もあり、むしろ EFP が増殖を抑制する方が合理的とも考えられる。ER を発現していない HeLa S3 細胞でも同様に EFP 過剰発現細胞を作成しアッセイを行ったところ、細胞増殖が抑制され、Myc の発現量減少と p27 の発現量増加が認められたが、14-3-3 σ の発現量には変化が認められなかった。EFP は Myc あるいはその上流のシグナル伝達経路に対して作用していると推測された。RT-PCR および qPCR を行い、Myc と p27 の mRNA 量を計測したところ mRNA 量に変化を認めなかった。したがって、EFP は Myc 及び p27 の合成量には影響を与えておらず、分解量を変化させていることが示唆された。EFP と Myc の in vivo binding assay を行い、EFP と Myc が結合していることを明らかにした。

ある種の細胞系列においては、EFP は細胞増殖に対して抑制的に作用していることが判明した。EFP は Myc を減少させ、p27 を増加させていたが、両者の mRNA 量には変化を与えておらず、合成ではなく分解を制御していることが示唆された。EFP は Myc と結合することが明らかとなり、今後、Myc をユビキチン化しているかどうかを明らかにすることが期待された。

公開発表後、副査の平野教授より 1)ユビキチンリガーゼの種類、2)乳癌と ER との関連、3)乳癌と EFP との関連、4)ユビキチンと癌化との関連、5)今回の結果が既知の報告と異なったことの原因についての質問があった。それに対して 1)正確にはわからないが数百種類、2)80%陽性だがホルモン療法無効例もある、3)臨床の報告は一定しておらず関連は不明、5)癌種により異なる、5)細胞種の違いによると考えている等の回答があった。主査の田中教授からは 1)Myc と p27 に注目した理由、2)複数の細胞株で調べたか、3)EFP と Myc の結合はユビキチン化に必要なのか、4)使用した細胞の ER の発現は確認したか、5)survival assay など他のアッセイは行ったか、6)臨床検体で EFP の発現を確認したかについての質問があった。それに対して 1)まず大まかな当たりをつけるために選択したが偶然結合が認められた、2)T47D と HeLa の 2 種類で確認した、3)複合体を形成し直接結合でないこともあるが結合は必要、4)5)今回は行っていない、6)今後行いたい等の回答があった。また、副査の武富教授より 1)導入した EFP 遺伝子には ERE をプロモーターとして用いたのかとの質問に、1)用いていないとの回答がなされ、ER の有無による違いを検証したことにはならないのではないかと指摘があった。

この報告は EFP が細胞増殖を抑制し、Myc と結合することを示した初めての報告であり、EFP の細胞増殖における位置づけの解明に寄与するものと思われた。

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単位取得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。