

氏名(本籍)	齋藤 総一郎 (兵庫県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第3555号		
学位授与年月日	平成16年7月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	MYCN gene induces to override cell cycle arrest through the accumulation of tumor suppressor protein p53 (MYCN 遺伝子は腫瘍抑制遺伝子タンパク質 p53 を蓄積させ細胞周期の停止機構を破綻させる)		
主査	筑波大学教授	医学博士	金子道夫
副査	筑波大学教授	理学博士	石井哲郎
副査	筑波大学助教授	医学博士	須磨崎 亮
副査	筑波大学講師	博士(理学)	三輪佳宏

論文の内容の要旨

目的: 神経芽細胞腫は幼児期の悪性固形腫瘍として知られている。その臨床像は多様であり、致死的な腫瘍である一方で自然退縮を起こす腫瘍もある。多くの予後因子が知られているが、MYCN 遺伝子の増幅は有力な予後不良因子として挙げられる。MYCN 遺伝子は、がん遺伝子である MYC ファミリーに属し、MYC ファミリーは細胞増殖やアポトーシスに深く関与していると考えられている。これまでに MYCN 過剰発現は、細胞周期を早め、細胞周期の S 期進入を促進させる、また S 期において p53 による細胞周期抑制を破綻させる、などの報告がある。多くのがんで p53 遺伝子の突然変異や欠失が報告されているが、神経芽細胞腫においてのその報告は少ない。むしろ神経芽細胞腫ではその機能や局在が異なるとの報告がある。そこでわれわれは、MYCN が過剰発現していない神経芽細胞腫の細胞株に MYCN 遺伝子を導入し、MYCN タンパク質が細胞周期にどのような影響を及ぼすかを、細胞生物学的に検討した。

対象と方法: MYCN 非増幅細胞である神経芽細胞腫細胞株 SHEP 細胞に MYCN 遺伝子を強制発現させ、また DNA 損傷薬剤である doxorubicin(DOX) 処理によっておこる細胞動態の変化をウェスタンブロット法、ノーザンブロット法、FACS による細胞周期の解析、免疫染色法を用いて解析した。

結果: SHEP 細胞に MYCN 遺伝子を導入し、FACS により細胞周期の解析を行った。MYCN 発現細胞では、対照群と比較して S/G1 値が増加していた。また、ウェスタンブロット法による解析では、MYCN 導入細胞において p53 タンパク質量が増加していた。そこで p53 タンパク質が蓄積する機構を明らかにするために、p53mRNA 量、p53 タンパク質の局在変化、p53 タンパク質のリン酸化状態について検証を行った。その結果、ノーザンブロット法による解析では、p53 の mRNA 量に変化は見られなかった。また MYCN 導入細胞の p53 タンパク質に対する免疫染色像は対照群との違いは見られず、p53 タンパク質は共に核に局在していた。p53 タンパク質のリン酸化状態は、そのタンパク質中のアミノ酸である 15 番目のセリンや 20 番目のセリンがそれぞれリン酸化を受けていたが、46 番目のセリンはリン酸化を受けていなかった。次に MYCN 導

入細胞を DOX 処理し、FACS を用いた細胞周期解析を行った。対照群では細胞周期が停止していたにもかかわらず、MYCN 導入細胞では細胞周期を停止せず、アポトーシスを起こしている細胞が出現した。さらにウエスタンブロットによる解析では、細胞周期を停止させる p21 タンパク質の発現が、DOX 処理後も増加していた。

考察: 神経芽細胞腫細胞株 SHEP 細胞に MYCN 遺伝子を導入することにより、細胞周期の進行を促進すること、p53 タンパク質が蓄積すること、をそれぞれ見出した。DOX 処理した MYCN 導入細胞では、細胞周期停止に働く p21 タンパク質の発現が起きているにもかかわらず細胞周期停止が見られないことから、MYCN は p21 の局在変化やその修飾変化、もしくはその下流の Cyclin E/CDK2 や Cyclin A/CDK2, Cyclin D/CDK4/6 や RB などの細胞周期停止シグナルに働きかけ、そのシグナルを抑制しているものと考えられた。また、MYCN 導入細胞で p53 タンパク質が蓄積していた。その p53 の 15 番目のアミノ酸であるセリンや 20 番目のセリンがそれぞれリン酸化を受けていたことから、それらをリン酸化する因子として知られている ATM や ATR, DNA-PK などを MYCN が活性化させている可能性があり、また p53 タンパク質の蓄積によりアポトーシスを起こす細胞が出現することも考えられる。以上のことから、MYCN タンパク質の発現をもたらす細胞への影響として、MYCN タンパク質は、p21 による細胞周期停止機構を破綻させて細胞周期を進行させ、同時に p53 タンパク質を増加させる。その結果、細胞周期の進行促進と p53 蓄積によるアポトーシスによって、より悪性度の高い細胞の出現を引き起こすことが考えられた。

結論: MYCN タンパク質の機能解析を目的として、神経芽細胞腫細胞株 SHEP に MYCN 遺伝子を導入し、MYCN タンパク質を発現させた。MYCN タンパク質の発現は、p21 による細胞周期停止機構を破綻させて細胞周期を進行させた。同時に、p53 タンパク質が安定化し蓄積を起こすことを見出した。その結果から、MYCN タンパク質が発現している神経芽細胞腫では、抗がん剤による DNA 損傷効果により蓄積した p53 が効率的に細胞をアポトーシスへと導くが、同時に細胞周期の進行を促進させていることによって、より悪性度の高い細胞の出現を引き起こすことが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

MYCN は神経芽腫の進展に関与する悪性度の重要な予後因子である。斉藤氏は MYCN 非増幅の神経芽腫細胞株 SHEP に MYCN を遺伝子導入し、その細胞株の性状を調べた。遺伝子導入後 p53 の蛋白発現の明らかな増加を見だし、FACS にて MYCN 導入神経芽腫細胞での細胞周期解析を行ったところ対照群と比較して S/G1 細胞の比率が増加していることを明らかにした。蛋白レベルは増加が見られたが p53 のメッセンジャーレベルでは増加がなく、p53 が安定化していることにより蛋白量が増加していることが判明した。さらに研究を進め p53 の安定化は 15, 20 のセリンがリン酸化されていることによることを明らかにした。ただし、46 番目のセリンのリン酸化はなかった。神経芽腫ではこれまでに p53 の変異が詳しく調べられ、その変異は殆どなく、神経芽腫での p53 の意義は大きくないと従来考えられていた。斉藤氏はこの p53 に再び光をあて、神経芽腫での p53 の意義を見出したことが新しいことと評価した。しかし、MYCN の導入することによりどのようなメカニズムで p53 の蛋白量が増加するかに関して明らかにすることが MYCN の働きを知る上で最も重要であるが、その点は全く研究が進められていなかったは残念であった。ただし、安定化のメカニズムとしてリン酸化がもっとも考えられることを明らかにし、さらに doxorubicin 処理で、細胞周期の停止が起こらなくなったことを見出したことは一定の評価が与えられる。審査の過程でいくつかの提言がなされ、これを基に早急に論文を publish できるようにすることが求められた。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。