

氏名 (本籍)	足立 政治 (岐阜県)		
学位の種類	博士 (医学)		
学位授与番号	甲第 491 号		
学位授与日付	平成 14 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	Phosphorylation of retinoid X receptor suppresses its ubiquitination in human hepatocellular carcinoma		
審査委員	(主査) 教授 森 脇 久 隆		
	(副査) 教授 岡 野 幸 雄	教授 柴 田 敏 之	

論文内容の要旨

当教室では、これまでにヒト肝細胞癌でレチノイドXレセプター α (RXR α)の分解が遅延、さらに転写活性が低下していることを報告してきた。またこの分解の遅延はMAP kinaseのコンセンサスサイトである260番目のセリン残基がリン酸化を受けているためであることもあわせて報告してきた。また当教室で独自に開発した非環式レチノイドが肝癌の再発を有意に抑制することから、そのレセプターであるRXR α の分解遅延が、肝発癌の重要な鍵を握るものと考えている。一方、最近ユビキチン-プロテアソームによる細胞内蛋白分解が、細胞周期や転写調節などの生物学上重要な現象の制御に寄与していると言われている。そこで我々は肝細胞癌におけるRXR α の分解遅延とユビキチン-プロテアソーム系との関連について検討を行った。

研究方法と結果

(1) ヒト肝細胞癌の手術標本から抽出した蛋白を用い、RXR α のユビキチン化について検討を行った。その結果、正常肝および、非癌部において、RXR α のユビキチン化が見られたのに対し、癌部において有意にユビキチン化が抑制されていた。またfull lengthの54kDa RXR α 自身をみると非癌部および正常肝ではほとんど検出されないが、プロテアソームインヒビター(MG132)を添加するとRXR α が検出できた。また癌部では強くセリン残基のリン酸化が見られ、また非癌部、正常肝では見られないことより、セリン残基のリン酸化がユビキチン化に関与している可能性が示唆された。

(2) ヒト肝癌由来細胞株であるHuH7と正常肝細胞由来株であるHcを用い、各種検討を行った。HuH7ではRXR α のリガンドである9-cisレチノイン酸(9cRA)の単独投与でRXR α の分解は見られないが、MAPKK(MEK)インヒビター(PD98059)を同時に添加すると著しい分解の亢進が見られた。この分解はMG132で抑制されることより、RXR α がプロテアソームによる分解を受け、またMAPKによるリン酸化がこの分解を阻害している可能性が示唆された。一方、Hcでは静止期と増殖相で事象が異なっていた。静止期で54kDa RXR α がほとんど認められないのは、Erkの活性が低く、RXR α は非リン酸化状態であり内在性にあるわずかなligandで分解が進んでいるものと思われた。一方増殖相にあるHc細胞ではErkの活性が亢進しているためRXR α もリン酸化状態となり、54kDa RXR α が強く見られた。しかしHuH7と違い、9cRA単独添加で分解の亢進が認められた。またこれらの現象はRXR α のserine残基のリン酸化とほぼparallelに動いていた。

(3) RXR α のユビキチン化をHuH7とHcで検討した。HuH7ではPD98059の容量依存性にユビキチン化の回復が認められた。Hcでは静止期では54kDa RXR α はほとんど認められず、これと一致してRXR α のユビキチン化が認められた。一方、増殖相にあるHcでは、ligandのない状態ではユビキチン化がみられないものの、HuH7と違い9cRAの単独添加によりユビキチン化の亢進が認められた。またMEKインヒビターを添加しておく、おそ

らく静止期と同様、内在性のligandでユビキチン化が亢進するものと考えられた。

またHcにMEKを強制発現させるとユビキチン化の減弱が認められた。これらの結果、HuH7ではMAPKが亢進しているため、RXR α のユビキチン化はみられず、さらに9cRAによってもMAPKは抑えられないが、Hcでは、9cRAがMAPKを抑えることで、9cRA依存性にユビキチン化が亢進するものと考えられた。

(4)MAP kinaseのコンセンサスサイトである260番目のセリン残基を変異させたmutant RXR α を作製し、ユビキチン化について検討した。HuH7ではwild type RXR α のユビキチン化はほとんど認められないが、非リン酸化型RXR α mutantで強いユビキチン化が、またリン酸化型RXR α mutantでのユビキチン化の減弱が認められた。一方静止期にあるHcでは、wild typeに比しリン酸化型RXR α のユビキチン化は減弱していた。また増殖相にあるHcでは、非リン酸化型RXR α のユビキチン化の亢進とリン酸化型RXR α のユビキチン化の減弱を認めた。

(5)ubiquitin-conjugating enzyme(E2)の一つであるUBE2E2の役割について検討を行った。肝細胞ではRXR α のユビキチン化がwild-type UBE2E2で亢進し、dominant-negativeなUBE2E2で減弱がみられ、UBE2E2がRXR α のE2として作用することが示唆された。

結語

肝細胞癌ではRXR α はser260がMAPKによりリン酸化されることで、ユビキチン-プロテアソームによる分解から免れており、このためfull length RXR α が蓄積していた。また肝細胞癌では正常肝細胞でみられた9cRAによるErkのregulationが破綻していた。

論文審査の結果の要旨

申請者 足立政治は、肝細胞癌におけるRXR α の分解遅延はMAP kinaseによるser260のリン酸化のため、ユビキチン-プロテアソームでのRXR α の分解阻害に起因すること、またレチノイドによるMAP kinaseのregulationが肝細胞癌と正常肝で相違することを証明した。これらの知見は今後、肝細胞癌の発症機序を解明し、消化器病学の進展をはかる上で少なからず寄与するものとする。

[主論文公表誌]

Phosphorylation of retinoid X receptor suppresses its ubiquitination in human hepatocellular carcinoma.

Hepatology 2002 ; 35 : 332~340