

氏名 (本籍)	奥村直樹 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 509 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	Distinct promoter usage of mdm2 gene in human breast cancer
審査委員	(主査) 教授 佐治重豊 (副査) 教授 中島 茂 教授 玉舎輝彦

論文内容の要旨

乳癌は我が国で急速に罹患率が増加しているが、その発生進展の機序は未だ十分に理解されていない。乳癌症例の約 3 分の 2 はエストロゲンレセプター- α (ER α) が陽性であり、その中には過剰発現を示すものがある。ER α 陽性乳癌において、ER α はエストロゲン依存性増殖に必須の転写因子であり、ER α を標的とした抗エストロゲン製剤を用いたホルモン療法は広く行われているが、ER α の転写因子としての分子レベルでの動態については未解決の部分も多い。一方、MDM2 は癌抑制遺伝子産物 p53 に対してユビキチンリガーゼとして機能し、p53 蛋白質の分解を促進することが知られており、p53 遺伝子異常があまり認められない ER α 陽性乳癌での発生進展への関与が注目されている。ER α 陽性例には野生型 p53 が多く、p53 の阻害因子である MDM2 の過剰発現が ER α 陽性乳癌において高頻度に認められ、ER α 発現の程度とよく相関することから、この三者に機能的相互関係が存在する可能性が高い。そこで、本研究では ER α 陽性乳癌における MDM2 過剰発現の機構を解析する目的で、ヒト乳癌細胞株 MCF-7、T47-D、MDA-MB-231 およびヒト乳癌組織を用いて検討を行った。

研究方法と結果

mdm2 には 2 種類のプロモーターが存在し、P1 プロモーターから long form mdm2 mRNA (L-mdm2) が、P2 プロモーターから short form mdm2 mRNA (S-mdm2) がそれぞれ転写される。特に S-mdm2 はそのプロモーター領域に p53 結合部位が存在し、p53 依存性の転写調節を受けることが知られているが、乳癌における検証はまだ十分なされていない。そこで、MDM2 過剰発現の機構を解析するために、ヒト乳癌細胞株 MCF-7 (野生型 p53, ER α 高発現)、T47-D (変異型 p53, ER α 低発現)、MDA-MB-231 (変異型 p53, ER α 発現陰性) をそれぞれ 10 nM のエストロゲン存在下または非存在下に 24 時間培養後、L-mdm2 と S-mdm2 を RT-PCR を用いて半定量し、L-mdm2 に対する S-mdm2 の比 (S/L mdm2 比) を用いてプロモーター利用状況を検討した。

その結果、① MCF-7 における S/L mdm2 比はエストロゲンの存在に関わらず他の細胞株に比べ有意に増加していた。さらに、その増加はエストロゲン添加により増強された。すなわち、野生型 p53 を有し ER α を高発現する MCF-7 では、MDM2 の過剰発現はエストロゲンにより誘導される P2 プロモーター依存性 S-mdm2 の転写亢進に起因していることが示唆された。② そこで、ヒト乳癌組織 15 検体 (平均年齢 55.2 歳、乳頭腺管癌 3 例、充実腺管癌 6 例、硬癌 5 例、非浸潤性乳管癌 1 例) を用いて *in vivo* における解析を行った。最初に p53 変異の有無を PCR-single-strand-conformation polymorphism (PCR-SSCP) 法にて解析し、Enzyme immuno-assay (EIA) 法にて定量した ER α 発現量と比較検討した結果、ER α 陰性例では変異型 p53 を、ER α 陽性例では野生型 p53 を発現している傾向が顕著であった。③ また、細胞株と同様に L-mdm2 と S-mdm2 を RT-PCR を用いて半定量した結果、S/L mdm2 比と p53 の変異の有無には有意な相関は認められなかったが、S/L mdm2 比は ER α 陽性であった 10 例中 7 例において高値を、ER α 陰性であった 5 例中 4 例で低値を示し、ER α 発現と S-mdm2 の発現が相関する傾向があった。すなわち、*in vivo* においても野生型 p53 を発現する ER α 高発現例では選択的に P2 プロモーターが利用され

ている可能性が示唆された。

考察と結語

核内転写因子としてのER α の機能は注目を集めており、他の核内転写因子や転写共役因子との転写調節制御の解明、さらにER α との相同性を示すER β やその変異体の発現の検討など近年さかんに研究されている。一方、p53-MDM2制御系は、p73, MDMX, p14ARFなどの関連蛋白質を含め、アポトーシス制御に関わる細胞周期の調節機構として重要な役割を担っている。遺伝子変異の少ない早期乳癌において、ER α , p53, MDM2それぞれの発現異常については多数の報告があるが、申請者らは三者間にそれぞれ相互作用が存在する可能性を指摘している。ER α のような核内受容体とp53, MDM2といった癌関連遺伝子との機能的相互作用の報告は少なく、本研究では乳癌において転写と細胞周期という癌化に重要な両者の制御機構の相互的発現調節に焦点を絞り *in vitro*, *in vivo* において解析し、以下の知見を得た。乳癌細胞株を用いた検討では、ER α と野生型p53の両者を発現した場合には、有意にmdm2のP2プロモーター由来mRNA発現が亢進し、エストロゲンによりさらにその発現が増強したことから、P2プロモーター依存的転写亢進には野生型p53のみならずER α の関与が強く示唆された。一方、乳癌組織ではP2プロモーターに依存するMDM2の発現は、機能的p53の発現との間には明らかな関連は認められず、ER α の発現と相関する傾向を示した。乳癌は、大腸癌のような癌化のプロセスと遺伝子変異の対応関係がまだ解明されておらず、他の癌以上に癌関連蛋白質の機能調節の解析は重要である。これらの機能解析により、乳癌の発癌過程、薬物治療耐性獲得メカニズムなどの解明に有用な知見が得られるものと期待できる。

論文審査の結果の要旨

申請者 奥村直樹はヒト乳癌細胞株MCF-7, T47-D, MDA-MB-231およびヒト乳癌組織を用いて、ER α , p53, MDM2の相互関係を解析し、ER α の発現とp53の遺伝子異常には明らかな相関関係があること、乳癌におけるMDM2過剰発現はER α 依存的にP2プロモーター由来転写産物S-mdm2の転写亢進に起因する事を明らかにした。本研究の成果は、乳癌における発癌増殖のメカニズムに新しい知見をもたらし、腫瘍外科学の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Distinct promoter usage of mdm2 gene in human breast cancer
Oncology Reports, 2002; 9: (in press)