

氏名 (本籍)	佐 治 重 衡 (岐阜県)
学位の種類	博 士 (医学)
学位授与番号	甲第 401 号
学位授与日付	平成 11 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	Overexpression of MDM2 in MCF-7 promotes both growth advantage and p53 accumulation in response to estradiol
審査委員	(主査) 教授 佐 治 重 豊 (副査) 教授 野 澤 義 則 教授 玉 舎 輝 彦

論 文 内 容 の 要 旨

癌遺伝子*mdm2*の転写産物であるMDM2蛋白質は、癌抑制遺伝子産物p53の発現により誘導される。MDM2はp53との結合によりp53の転写活性化能を抑制し、さらにp53をユビキチン化して分解を促進することから、p53の自己制御機構を担う分子として従来から注目されてきた。また、MDM2自身の癌化作用もp53の抑制を介しての機能と理解されてきたが、近年MDM2が細胞周期関連因子pRB, E2F1/DP-1, cell fate regulator Numb, 癌抑制遺伝子産物p19^{INK4}など多くの因子と直接相互作用することが報告されており、p53に依存しないMDM2の癌化、細胞増殖への関わりが注目されている。ところで、ヒト悪性腫瘍では、肉腫の30~40%で*mdm2*遺伝子の増幅が報告されているが、乳癌では他の上皮系腫瘍と同じく遺伝子の増幅はまれである。しかし、mRNAおよび蛋白質レベルでの発現増加が乳癌臨床検体の約40%でみられ、悪性度との相関性も指摘されており、乳癌におけるMDM2の機能が注目されている。

そこで、本研究では、乳癌でも特にエストロゲンレセプター (ER) 陽性乳癌の多くで、MDM2発現増加が認められることに注目し、エストロゲン依存性増殖とMDM2との関係について検討を行い、以下の諸結果を得た。

研究方法と結果

(1)ER陽性乳癌細胞株MCF-7に*mdm2* cDNAをセンス方向、アンチセンス方向に組み込んだ発現ベクターを細胞内導入したところ、親株に比較してMDM2蛋白質を高発現する細胞株 (MCF-7/pCmdm2)、発現の低下した細胞株 (MCF-7/pCmdm2as) をそれぞれ樹立することができた。

(2)ER陽性乳癌はエストロゲン添加により増殖能が亢進する。親株、MDM2発現低下株ではエストロゲン無添加時に比較して2.5倍の増殖を示したのに対し、高発現株では10倍と著明なエストロゲン依存性増殖能の亢進を示した。この機序に関して、ER mRNA量の変化をreverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により検討したが、上記3細胞株間での差異は認められず、エストロゲン依存性増殖能の亢進はERの発現増加によるものではないと考えられた。

(3)ER陽性乳癌細胞にエストロゲンを添加すると濃度依存的にp53蛋白質が増加する。p53は細胞周期に間接的に関わる因子であり、またERの機能を用量依存的に抑制することが知られている。過剰発現されたMDM2がp53の分解を促進し、p53の発現量を低下させることで細胞増殖を促進した可能性を考え、3細胞株間でのp53発現量をwestern blotting法で比較検討した。エストロゲン添加24時間後のp53発現は予測に反してMDM2高発現株、親株、MDM2発現低下株の順で有意に増加していた。

(4)上記3種の乳癌細胞株にエストロゲンを添加すると、p53とその転写活性化能により誘導されるサイクリンインヒビター-p21蛋白質が経時的に増加した。また、MDM2も同様に増加した。いずれの蛋白質も(3)と同じくMDM2高発現株、親株、MDM2発現低下株の順で有意に増加していた。これらの結果はエストロゲン存在下ではMDM2発現量に平行して、p53の蛋白質量とともに増減することを示唆するものである。

(5)(3), (4)よりエストロゲン添加後のp53発現量はMDM2の発現量と正の相関を示す事が示唆された。さらに、これらの樹立された細胞株での検討に加え、親株MCF-7のMDM2発現をアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて一過性に抑制する検討を行った。エストロゲンの非存在下では、MDM2の発現量低下とともにp53の発現が増加したのに対して、存在下では逆にp53発現が減少した。従って、一過性のMDM2発現量の変化でも、エストロゲン存在下では、p53発現レベルが正の相関関係を示すことが明らかになった。

(6)p53とMDM2発現量の正の相関が、エストロゲンによるp53誘導時に特有の現象か否かを確認するために、一般的なp53発現誘導に使用される紫外線を上記3種類のMCF-7由来細胞株に照射した。その結果p53蛋白質は経時的に増加し、その発現量はエストロゲンによる誘導時と逆に、MDM2発現低下株、親株、MDM2高発現株の順で有意に増加していた。これらは従来の報告と同じく、高発現したMDM2がp53の分解をより促進することにより、それらの発現量が逆相関を示したためと考えられる。

結 語

以上の結果から、ER陽性乳癌細胞株MCF-7にMDM2を高発現させると、エストロゲン存在下での細胞増殖能が亢進することが明らかにされた。この時のp53発現量は、MDM2高発現細胞で有意に増加しており、エストロゲン存在下では、従来の知見とは異なった機序によりMDM2とp53の発現量が制御されている可能性が示唆された。さらに、MDM2高発現細胞でのp53, p21発現増加からは、エストロゲン依存性増殖能亢進の説明ができないことから、MDM2自身がp53の抑制を介さず、エストロゲンレセプター機能を促進する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 佐治重衡は、ER陽性乳癌細胞株を用いて、エストロゲン添加時の細胞増殖能、細胞増殖関連因子の発現に対して癌遺伝子産物MDM2が及ぼす影響を詳細に解析した。その結果、乳癌におけるエストロゲン依存性増殖にMDM2が促進的な作用を示すこと、またその作用が現在まで報告されていないMDM2自身のもつ新たな機能による可能性を明らかにした。この結果は乳癌におけるMDM2の機能に新しい知見をもたらし、腫瘍生化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]

Overexpression of MDM2 in MCF-7 promotes both growth advantage and p53 accumulation in response to estradiol

Japanese Journal of Cancer Research 90 (2) : 1999 印刷中