



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on Cancer Inducible Mechanism via Abnormal Nucleolar Formation by Overexpression of Protein Phosphatase PPM1D [an abstract of entire text]
Author(s)	小境, 夕紀
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第11916号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59003
Type	doctoral thesis
File Information	Yuuki_Kozakai_summary.pdf



学 位 論 文 内 容 の 要 約

博士の専攻分野の名称 博士（理学）

氏名 小 境 夕 紀

学 位 論 文 題 名

Study on Cancer Inducible Mechanism via Abnormal Nucleolar Formation by Overexpression of Protein Phosphatase PPM1D

(脱リン酸化酵素 PPM1D 過剰発現による核小体形成異常を介した細胞癌化メカニズムに関する研究)

癌細胞では、リボソーム合成の中心的な器官である核小体の形成に異常が見られることが知られている。特に核小体のサイズや数の増加は細胞診で使用される重要な項目の1つである。しかしながら、核小体の構造を制御する詳細な分子メカニズムは未だ明らかとなっていない。核小体タンパク質である Nucleophosmin (NPM) は、多数のリン酸化修飾部位を有しており、核小体形成やリボソーム合成に関与する多機能タンパク質である。

核小体および核質に局在する脱リン酸化酵素 PPM1D は、乳癌や卵巣癌など様々な癌細胞において、その遺伝子増幅や過剰発現が報告されている。PPM1D は、多くの癌細胞で遺伝子変化が報告される 17 番染色体の 17q23.2 に位置し、605 アミノ酸残基から構成され N 末端の触媒ドメインおよび C 末端の調節ドメインを有している。正常細胞における PPM1D605 の機能の1つは、DNA 損傷に応答してリン酸化および活性化した p53 のネガティブフィードバック機構を介した細胞周期制御である。一方で、遺伝子増幅により PPM1D の過剰発現が起こっている細胞では、p53 の活性制御に関わるタンパク質の活性を過剰に負に制御してしまうことや未知の分子メカニズムにより、細胞癌化を促進していることが示唆されている。また、PPM1D 遺伝子増幅に加えて、近年では PPM1D の変異も多く癌細胞で報告されている。特に調節ドメインである C 末端領域にナンセンス変異やフレームシフト変異が多く報告されており、その結果、切断型 PPM1D を発現していることが知られている。また、この C 末端切断型の PPM1D は自身のタンパク質レベルや活性を増加させることが明らかとなっており、PPM1D 過剰発現と同様に癌治療の標的分子として注目されている。SPI-001 は、PPM1D の強力な特異的な低分子化合物である。現在までに、SPI-001 は PPM1D605 が過剰発現している癌細胞の増殖割合を劇的に減少させることが明らかとなっている。

そこで本研究では、PPM1D を過剰発現した癌細胞に対する抗癌治療の発展および癌細胞で異常形成が見られる核小体形成に及ぼす分子メカニズムの解明のため、(1) PPM1D 阻害剤 SPI-001 の C 末端切断型 PPM1D 過剰発現細胞の生存率に及ぼす効果および (2) PPM1D 過剰発現が核小体形成や核小体タンパク質 NPM に及ぼす影響を解析し、細胞癌化の分子メカニズムを解明する研究を実施した。

本学位論文は、全5章より構成されている。第一章では総括的な序論として研究の背景および目的を述べている。第二章では、野生型 PPM1D605 と変異型の PPM1D の両方の遺伝子を有するヒト結腸腺癌由来の細胞株 HCT-116 に対する PPM1D 阻害剤の効果を解析した。HCT-116 は通常レベルの野生型 PPM1D605 と過剰発現した C 末端切断型 PPM1D を有しており、化学療法剤として広く用いられている Doxorubicin に対して抵抗性を示すこ

とを明らかにした。また、興味深いことに SPI-001 と Doxorubicin を共に添加した際、Doxorubicin 単独添加したときと比較して、細胞生存率を減少させることを明らかとした。また、Doxorubicin 単独添加と比較して、SPI-001 と Doxorubicin を共に添加した際、p53 のリン酸化レベルが顕著に増加し、p53 の下流のタンパク質で細胞周期停止に関与する p21 の量も増加した。以上の結果より、C 末端欠損型 PPM1D が過剰発現している細胞では、化学療法剤による p53 の活性化を妨げられていると考えられる。一方、PPM1D 阻害剤の添加により、p53 が活性化するメカニズムが示唆された。

第三章では、乳癌由来 MCF7 細胞 (PPM1D 過剰発現、p53 wt) において、PPM1D 阻害剤が核小体数の減少を誘導することを見出した。そこで、PPM1D が過剰発現している細胞での癌化機構の解明を目的とし、PPM1D 過剰発現が及ぼす核小体形成異常における効果を解析した。MCF7 細胞において、PPM1D 発現量の抑制が核小体数を減少させることを示した。さらに、PPM1D の発現量が異なる 2 種の肺癌由来 H1299 細胞 clone (p53 null) において、PPM1D の発現量に依存した核小体数の変化が観察され、PPM1D 過剰発現による核小体数の増加が p53 には依存しないことが示唆された。また、PPM1D の過剰発現が核小体のサイズも増加させることを明らかとした。

第四章では、PPM1D の過剰発現が担う核小体数を制御する分子メカニズムを明らかにすることを目的として、MCF7 における PPM1D ノックダウンが、核小体タンパク質 NPM に及ぼす影響を解析した。その結果、PPM1D の発現量の抑制は、NPM の 199 位 Thr および 4 位 Ser のリン酸化を減少させることが明らかとした。また、これらの NPM のリン酸化部位は核小体数の増加に重要であることを見出した。NPM の 199 位の Thr および 4 位の Ser は、それぞれ G2/M チェックポイント制御因子の CDK1 および分裂関連キナーゼの PLK1 により、M 期で特異的にリン酸化修飾を受けることが報告されている。in vitro kinase assay および NPM 変異体を用いた免疫沈降の結果、CDK1 が NPM の 199 位 Thr をリン酸化し、逐次的に PLK1 が 4 位 Ser のリン酸化を行うカスケードモデルが示唆された。また、脱リン酸化酵素 CDC25C は、CDK1 を脱リン酸化し活性化することが報告されている。そのため、PPM1D が CDC25C に及ぼす影響を解析するため、p53 野生型の MCF7 細胞および p53 欠損型 H1299 細胞において、PPM1D の発現量の違いによる CDC25C のタンパク質レベルおよびリン酸化レベルを解析した。その結果、p53 野生型の癌細胞では、PPM1D は p53 を抑制することで CDC25C のタンパク質レベルを安定化し活性を保持していることが示唆された (図 1)。一方、p53 欠損型の癌細胞において、PPM1D の過剰発現は、CDC25C の 216 位の Ser を脱リン酸化することが示唆された。CDC25C の 216 位の Ser は、リン酸化されると活性が低下することが知られている。そのため、PPM1D 過剰発現は、p53 の有無に関わらず CDC25C の活性を正に制御し、過剰な NPM のリン酸化による核小体数の増加を介して細胞癌化を誘導していることが明らかとなった (図 1)。

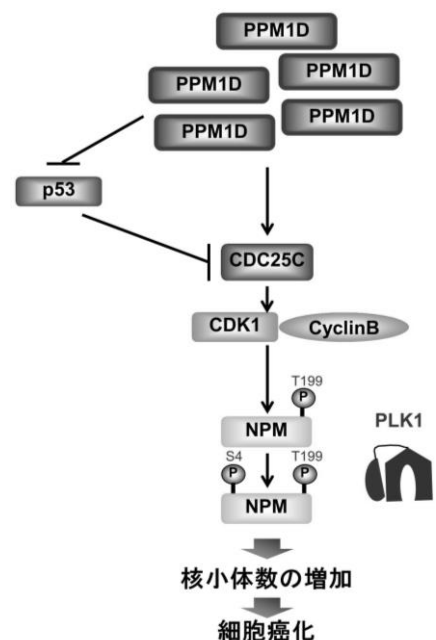


図 1 PPM1D 過剰発現による細胞癌化メカニズム

以上、本研究により、(1) 切断型 PPM1D に対する PPM1D 阻害剤の効果から、PPM1D 阻害剤および Doxorubicin の併用投与の有用性および (2) PPM1D 過剰発現による CDC25C-CDK1-PLK1 カスケードを介した NPM のリン酸化およびそれが誘導する核小体数の増加を介した新規細胞癌化モデルを提案した。これらは PPM1D 遺伝子異常の癌細胞に対する新規治療法の開発や核小体形成メカニズムの解明に大いに貢献することが期待される (2412 字)。