

優秀レポート賞

吉田 剛 君(先端医科学研究所 遺伝子制御研究部門/大学院博士課程1年 GCOE RA) 提出レポート

課題

1 Philip A. Beachy 博士ご講演

「Hedgehog 遺伝子の発見とその機能解明および医学的応用」

Beachy 博士が、ショウジョウバエ研究を医学研究にどのように展開していったか？について概説し、Beachy 博士の研究のどのような点が評価できるか？自分の研究にfeedback 出来る点はどこか？彼の研究の今後の課題についてあなたの意見を1000 字程度で述べて下さい。



演者らは *Drosophila* 胚パターン変異体に関与する遺伝子をスクリーニングした結果、分泌タンパク質でありモルフォゲン(morphogen)の一種であるヘッジホッグ(Hh)遺伝子の異常が、*Drosophila* の初期胚パターン形成不全という明瞭な表現型を呈することを見出した。モルフォゲンとは個体の発生段階で組織特異的な分化を誘導するシグナル分子であり、シグナルの発生源となる細胞から拡散して未分化組織中に濃度勾配を生じる。この濃度勾配に対応して、各部位に特異的な細胞分化が起こる。数あるモルフォゲンの中でも Hh 遺伝子に機能喪失型変異を生じた胚の表現型では、特徴的な歯状突起が密集していることから、ヘッジホッグ Hedgehog (意味:ハリネズミ)と命名された。*Drosophila*の初期胚における体節形成をはじめとする、多細胞生物の形態形成および維持において、「秩序ある細胞社会の形成は極めて重要である」と考えた演者らは、発生段階だけでなく再生医療、疾患などの幅広い病態生理においてヒトの Hh 相同遺伝子が深く関与していると考え、Hh の研究対象を進化的に高度な哺乳類にまで発展させていった。

シグナル研究の結果、Hh リガンドが存在しない状態のもとでは、シグナルに対して抑制的に働くレセプターである 12 回膜貫通型蛋白 Patched1 (Ptch1) が、7 回膜貫通型蛋白 Smoothened (Smo) の細胞膜局在を抑制しているために、下流のシグナル分子である Gli へのシグナル伝達は定常状態で阻害されていることが解明された。

孤発性の基底細胞癌や髄芽腫では高率に受容体 Ptch1 の変異が同様に認められる。また、基底細胞癌、髄芽腫、横紋筋肉腫が家族集積性に発生する Gorlin syndrome の責任遺伝子は Ptch1 であり、haplo-insufficiency で発症することが知られている。以上の事実から、腫瘍細胞は分泌タンパクである Hh リガンドを介する細胞外シグナル伝達により制御できる可能性が強く示唆され、Hh シグナル制御が新たな分子標的治療の候補として注目されるようになった。そこで Smo と結合することで Hh シグナル伝達を遮断するサイクロパミン(cyclopamine)などを分子治療薬として応用する試みがなされて久しい。本薬剤は Smo に結合することで Hh シグナルを antagonize する働きがあり、従来の治療に抵抗性の髄芽腫の特効薬として大いに期待されている。

以上のように、進化生物学に保存されたタンパク質を同定するにとどまらず、種の壁を超えたタンパク質の相同性および機能共通性に着目した研究によって、病態解明や新規治療戦略に結びつけた点が最も評価に値すると思う。演者らの今後の研究課題としては、「分子標的治療の限界性」、および「生物種・組織特異性への考察」が特記される。前者に関しては、確かに分子腫瘍学

優秀レポート賞

吉田 剛 君 (先端医科学研究所 遺伝子制御研究部門/大学院博士課程1年 GCOE RA) 提出レポート

的知見に基づく新規治療戦略開発は魅力的であるが、腫瘍の新規分子標的薬の開発に対しては、「しばらく投与すると腫瘍細胞が alternative pathway を活性化することで耐性を獲得してしまうため、結果的に悪性化・難治性を加速させてしまうのではないのか?」という点が危惧される。とりわけ Hh シグナルと Wnt シグナルの crosstalk が明らかにされた昨今、Wnt シグナルを結果的に活性化させてしまうリスクを考慮して、治療に応用する姿勢が必要になってくるだろう。後者に関しては、Gorlin 症候群のモデル動物である Ptch1 ノックアウトマウスは髄芽腫や横紋筋肉腫は発症するものの、Gorlin 症候群患者群で 100% 発症するはずの基底細胞癌は全く発症しない。生物種・組織依存性に Hh シグナル伝達への依存性が異なることを象徴する paradoxical な現象ではあるものの、今後さらなる追求が期待される。

現在、癌幹細胞で特異的に機能する分子である CD44 variant isoform v8-10 (R1)、EpCAM に関してそれぞれ細胞周期、代謝制御の観点から研究している自分としては、正常細胞でも発現している CD44v や EpCAM に対する阻害剤が想定しえない副作用をもたらしてしまう危険性を認識し、臨床応用に結びつく基礎研究に邁進していきたいと考えている次第である。

2 Philip A. Beachy 博士への 質問

A: モルフォゲンに関して共通する疑問点であるが、どの細胞がモルフォゲン分泌細胞となるのかという運命決定はどのような機構でなされるのか? 仮にモルフォゲンの濃度勾配で細胞分化が決定するならば、分泌前に既にどの細胞がモルフォゲン分泌細胞となるのが決定していることは矛盾ではないのか?

What determines the cell fate of the morphogen-secreting cell? If the concentration degradation is crucial to the differentiation, is it paradoxical which cell is already committed to the morphogen-secreting one?

B: ヘッジホッグの受容体である Patched1 のノックアウトマウスに関して、ホモ接合体では発生段階で神経管閉塞を起こして胎生致死であったり、ヘテロ接合体では横紋筋肉腫や髄芽腫を高率に発症する。しかしながら、家族性に Patched1 が欠損している母斑様基底細胞腫瘍症候群 (Gorlin's syndrome) でほぼ全例で見られるような基底細胞癌の自然発症は、上記のモデルマウスでは認められない。それは何故か?

The patients of NBCCS, nevoid basal cell carcinoma syndrome, frequently develop basal cell carcinoma due to the absence of Patched 1 expression. However, the Patched1-knockout mice develop medulloblastoma and rhabdomyosarcoma, but not the development of basal cell carcinoma. How can we understand this seemingly paradoxical phenomenon between genetic disease with tumor predisposition and the molecular resembling model mice?

[Patched 変異モデルマウスに関する参考文献]

Science. 1997; 277:1109-13.

Nat Med. 1998; 4: 619-22.

C: 基底細胞癌や髄芽腫などの様々な固形腫瘍において、リガンド産生過剰によるヘッジホッグシグナルの異常な活性化は数多く報告されている。しかしこれらはあくまでリガンド依存性のシグナル

優秀レポート賞

吉田 剛 君(先端医科学研究所 遺伝子制御研究部門/大学院博士課程1年 GCOE RA) 提出レポート

伝達活性化であって、悪性転化に関与する EGFR をはじめとする他のシグナル伝達がりガンド非依存性になる点とは大きく異を呈するといえる。ヘッジホッグでは受容体に異常があったとしても Null 変異にとどまるが、機能獲得型変異が認められない原因はあるのだろうか？

There have been many reports that the overexpression of Hedgehog ligand is mainly responsible for malignant potential in several kinds of solid tumors such as basal cell carcinoma and medulloblastoma. On the other hand, as far as I know, there is no tumor with the mutation of Shh signal resulting in the ligand-independent manner. Could you tell me the absence of gain-of-functional mutation in the receptor is also observed in other signal transduction in cancers?

【ヘッジホッグ受容体変異に関する参考文献】

Exp Cell Res. 2004; 296: 285-93.

J Pathol. 2001; 194: 473-7.

3 田中啓二博士ご講演

「蛋白質分解酵素複合体プロテアソームの発見と作動機構の解明」

田中博士が、どのようにしてプロテアソームの発見に結びついたのか？そしてその発見をどのように医学へ応用していったのか？その道筋を概説し、田中博士の研究のどのような点が評価できるか？自分の研究にfeedback 出来る点はどこか？

彼の研究の今後の課題についてあなたの意見を1000 字程度で述べて下さい。

4 田中啓二博士への 質問

演者は細胞内のタンパク合成系のみではエントロピー(熱力学的に無秩序な状態)が高まり収束できなくなるという概念のもと、タンパク分解系も同様に重要であると仮説だてて研究を始めた。しかしながら、30 年近く前までは、「遺伝情報が核酸(DNA)から核酸(RNA)に伝達(転写; transcription)されて、さらにタンパク質の形に変換(翻訳; translation)されることで、遺伝子発現が起こる」という概念である「セントラルドグマ」が生化学研究の領域を占拠していたため、タンパク分解への研究への注目度は低かった。一方で演者らは、日進月歩を遂げていた遺伝子工学の最先端技術を応用して分子量が巨大であり、なおかつ立体構造が複雑なプロテアソーム(proteasome)の立体構造および構造解析に成功した。その結果、26S プロテアソームの Rpn10,13 はユビキチン受容体として機能する一方で、Rpt1-6 は ATPase サブユニットとして機能することを明らかにした。アミノ酸の再利用とタンパク質の品質管理はゲノムには刻印されていない情報であるが、演者らは、細胞が分解標的タンパクへのユビキチン鎖結合と実際の分解の2段階が ATP 依存性に制御されていることを明らかにした。

演者らは自己・非自己の認識という免疫機構の根幹において必須である、抗原提示細胞(antigen-presenting cells; APC)におけるタンパク分解を司る immunoproteasome(すなわち内在性抗原のプロセッシング酵素)に着目した。樹状細胞、マクロファージを代表とする APC の細胞質で分解されたペプチドは TAP (transporter associated with antigen processing) という ATP 依存性の ABC トランスポーターによって小胞体に輸送されることで非自己として認識されるようになる。TAP は IFN γ によって誘導される分子であり、TAP が欠失すると MHC-I 分子は抗原提示できなくなる

優秀レポート賞

吉田 剛 君 (先端医科学研究所 遺伝子制御研究部門/大学院博士課程1年 GCOE RA) 提出レポート

ことが明らかにされた。また原因不明の結節性紅斑や脂肪組織萎縮を呈する免疫異常疾患 Nakajo-Nishimura 症候群が、実は immunoproteasome 5i の遺伝子変異によるプロテアソーム集合体形成不全に起因することを見出した。また T リンパ球の教育を行う胸腺において特異的に発現しているプロテアソームでは 5t が発現しており、5t ノックアウトマウスでは野生型マウスと形態学的に同様の胸腺が形成されるものの、細胞性免疫に重要な CD8 陽性 T リンパ球の誘導不全が起こることを見出した。

遺伝子工学の技術を駆使して立体構造解析を推し進めた当時も尚、タンパク分解の重要性に懐疑的な研究者が多かったが、電子顕微鏡によるプロテアソームの画像はまさに「百聞は一見に如かず」を象徴するインパクトがあったといえるだろう。かつ先駆者的にタンパク質が如何に「迅速に」、「秩序だって」、「不可逆的に」分解されるかということこそが、細胞にとって非常に重要な位置づけにあることを認識し、外部からの批判にもめげずにその研究軸を保持し続けた点が最も尊敬に値すると感じた。

5 「Hedgehog シグナルの発生・疾患・再生における役割」または、「プロテアソームの発見・解明から期待すること」についてご自身の意見を述べてください。

A: 周知のように、ユビキチン-プロテアソームシステムによるタンパク分解がユビキチン鎖修飾によって非常に綿密に制御されているのに対して、オートファジーは非選択的なタンパク分解とそれによって得られたアミノ酸の再利用が特徴的である。この2つのダイナミックなタンパク分解のうちどちらが優位であるかどうかは主に何によって制御されていると考えるのが妥当だろうか？

Whereas ubiquitin-proteasome dependent protein degradation system is tightly regulated by the recognition with the ubiquitin chain, autophagy-dependent protein degradation system occurs in the non-selective manner. What kind of molecule or signal transduction is the most likely to determine which of these two systems is dominant in the cell context?

B: 自験例では、腫瘍細胞で過酸化水素処理などの酸化ストレス負荷をかけると、26S プロテアソームに依存したユビキチン分解が阻害されることが多々認められる。この現象と細胞外ストレスに応答したプロテアソーム核内移行は関連している可能性はあるのだろうか？

The exposure of tumor cells to oxidative stress often results in the inhibition of 26S-proteasome dependent ubiquitination. Besides, some researchers have reported that extracellular stress causes the nuclear translocation of proteasome. Is there any possibility that accumulation of the proteasome in the nucleus is responsible for the decreased protein degradation under oxidative stress?

5 研究内容に関するレポート

5-1 慶應医学賞の社会的意義について ~ ノーベル賞からのメッセージ ~

自然免疫の活性化の仕組みと樹状細胞の機能解明を果たした3名の研究者、B. A. ボイトラー博士、J. A. ホフマン博士、R. スタインマン博士が2011年度ノーベル生理学医学賞の榮譽に輝くことに決定した。ノーベル賞選考委員らは声明で「本年度のノーベル賞受賞者らは、免疫システムの活動の基本

優秀レポート賞

吉田 剛 君(先端医科学研究所 遺伝子制御研究部門/大学院博士課程1年 GCOE RA) 提出レポート

原理を解明し、免疫システムの理解に革命をもたらした」と述べており、癌や自己免疫疾患の治療への新たな扉を開いたと指摘した。日本国内でも大阪大学免疫学フロンティア研究センター拠点長の審良静男博士は受賞者の一人、J. A. ホフマン博士とともに「自然免疫システムと Toll 受容体の発見、微生物認識・応答の解明」という受賞テーマで、2010 年度の慶應医学賞を受賞した経緯がある。

脊髄損傷、網膜再生などの再生医療に役立つ iPS 細胞を開発した京都大学の山中伸弥博士がノーベル賞最有力候補として注目されていたため、今回の受賞者とその研究内容にはむしろ意外であり新鮮であるという印象を受けた。また、最近の日本国内の生命科学研究への姿勢は慶應医学賞やノーベル賞選考委員の価値観に比べて、なんとも目先の臨床的成果にばかり重きを置いているのかと思ってしまう。

そもそも生命科学に限らず研究というもの、「ヒト(生物としてのホモサピエンス)が介在せずに存在して緻密に制御されている未知のもの」を「人(研究者)が自分たちの創り出した価値観や仮説のもとに検証していく純粋な好奇心に基づく行為」だと思っている。今後、日本国内からより素晴らしい研究とそれに随伴する臨床成果が発信されるためにも、敢えて原点回帰が必要なのではないだろうか？

5-2 Philip A. Beachy 博士

米国スタンフォード大学教授、ハワード・ヒューズ・メディカル・インスティテュート研究員

受賞研究テーマ「Hedgehog 遺伝子の発見とその機能解明および医学的応用」

「Hedgehog シグナルの発生・疾患・再生における役割」

= Hedgehog 遺伝子の機能と発生生物学 =

HH(ヘッジホッグ; hedgehog)遺伝子の機能喪失型変異体を有する表現型の胚は小さな歯のような突起物に覆われ、ヘッジホッグ(ハリネズミ)と呼ばれる所以である。hedgehog 遺伝子の形態形成における役割の 1 つは、「発生過程での境界、左右軸」を設定することであると考えられている。高等生物においても Shh はニワトリ初期胚のシグナルセンターであるヘンゼン結節の左側に特異的に発現しており、Shh が発現している領域が左となり、発現していない領域が右となる。また Shh 遺伝子の機能喪失型変異は、腹側正中線の欠失に起因する全前脳胞遺残症 (HPE) を引き起こす。近年の研究によって、皮膚正常組織幹細胞では神経細胞ニッチ(perineural niche)において Shh シグナルが伝達されることが、毛包成長期(anagen)に upper bulge で Gli1(+), Sox9(+), CD34(-), Lgr5(-)の幹細胞の多分化能発揮に重要であることが示されている(Cell Stem Cell. 2011;8:552-65.)。

例えばショウジョウバエの翅の成虫原基に関しては原基には前部と後部があり、その後部にのみ hedgehog 遺伝子が発現している。hedgehog が発現している領域と発現していない領域の境界が設定され、その境界が形態形成の中心になって、引き続きさらなる形態形成をしてゆくのではないかと考えられる。ヘッジホッグは分泌タンパク質であり、形態形成過程における前後背腹軸および左右軸の決定にも働いている。したがって、ヘッジホッグ自体の遺伝子異常では、大脳が左右に分離できない全前脳胞症(holoprosencephaly)や単眼症を発症する。ヘッジホッグは分泌細胞内で C 末端にコレステロール修飾を受けて細胞外に放出されるが、コレステロール合成障害により発症する Smith-Lemli-Opitz 症候群ではヘッジホッグのコレステロール修飾が不完全になり、多指症や口蓋裂等の形態形成異常を生じる。

Shh シグナルと神経分化に関して補足

優秀レポート賞

吉田 剛 君(先端医科学研究所 遺伝子制御研究部門/大学院博士課程1年 GCOE RA) 提出レポート

神経発生において重要なモルフォゲンである Sonic hedgehog (Shh) シグナルもニューロン新生に深く関与する。Shh シグナルの阻害剤や SVZ アストロサイト (Type B cell)、一過性増殖細胞 (Type C cell) における Shh KO マウスを用いた実験によって、Shh はアストロサイトおよび一過性増殖細胞の増殖を促進する機能があることが明らかになった (Nature, 437:894 - 897, 2005)。逆に Shh シグナル伝達である受容体 Smoothend を脳室下帯において conditional KO させたマウスモデルではアストロサイトおよび一過性増殖細胞の増殖が低下する現象が認められる (J. Neurosci 27:5936 - 5947, 2007)。Shh シグナルが機能しなくなると、腹側正中線の欠失に起因する全前脳胞症 (holoprosencephaly: HPE) を発症する。

全前脳胞症は、妊娠 5~6 週における前脳 (prosencephalon) の左右半球への分裂 (半球の萌芽) と、間脳 (diencephalon)・終脳 (telencephalon) への分化が障害されることによって生じる先天性奇形疾患である。脳形態は左右大脳半球の非分離がみられ、holosphere とよばれる左右一体化した終脳が画像診断学上、特徴的である。灰白質の左右連続性が確認できれば全前脳胞症と診断できる。終脳の背側に偽脳梁 (pseudocalosum) とよばれる白質束を認めることがあるが、本来の脳梁は欠損する。

= ヘッジホッグシグナルを標的とする腫瘍治療戦略 =

Hedgehog (Hh) シグナルは、胎生期の臓器形成において重要な因子として同定された経緯があり、発生段階と類似した転写因子活性化を tumorigenesis の過程で辿る癌腫では重要なシグナル伝達である。例えば Hh シグナル上に属する伝達因子の変異であり、Gorlin syndrome に代表されるように、基底細胞癌、髄芽腫、横紋筋肉腫が家族集積性に発生することが明らかになった (Cell 1996; 85 : 841-851., Science 1996; 272: 1668-1671.)。これらの癌細胞は Hedgehog リガンドを介する細胞外シグナル伝達により制御できる可能性を示しており、Hh シグナル制御が新たな分子標的治療の候補となってきている。Hh リガンドが存在しない状態のもとでは、シグナルに対し抑制的に働くレセプターである 12 回膜貫通型蛋白 Patched1 (Ptch1) が、7 回膜貫通型蛋白 Smoothened (Smo) の細胞膜局在を抑制しているために、下流のシグナル分子である Gli へのシグナル伝達は定常状態で阻害されている。つまり Smo の下流での転写因子 Gli ファミリー (Gli, Gli2, Gli3 の 3 つのサブタイプが存在する) に Hh シグナルが伝わらず標的遺伝子の転写が活性化しない。しかしながら、基底細胞癌や髄芽腫の多くの症例では、Patched 1 の体細胞レベル (mosaic-type) の機能喪失型変異を呈するために、恒常的に Smo を介して転写因子 Gli の活性化が惹起されることで悪性化に関与している (Clin Cancer Res 2006; 12: 5924-5928.)。腫瘍細胞やそれを微小環境中で取り囲む腫瘍随伴性マクロファージ、線維芽細胞 (cancer-associated macrophage and fibroblasts; TAM and CAF) などが Hh リガンドを autocrine, paracrine 的に過剰分泌することで増殖を促進している。また興味深いことに、Hh シグナルは中枢神経系、乳腺、造血系における幹細胞増殖に関与することも報告されている。Hh signaling と NF κ B シグナルが正相関することもその原因の一つと考えられる (Cancer Res 2006; 66: 7041-7049.)。また、乳癌の癌性幹細胞分画である CD44 (high), CD24 (low) 分画で高発現していることが確認されている (Cancer Res 2006; 66: 6063-6071.)。これらの事実から想像するに、多くの固形癌腫の癌幹細胞の維持において、Hh シグナル伝達が強く関与していることが考えられる。

腫瘍細胞でのシグナル伝達研究が日進月歩に進んでいくにつれて、臨床応用として特定の master regulator molecule をターゲットとした治療、いわゆる「腫瘍分子標的薬」の開発が盛んに行なわれてい

優秀レポート賞

吉田 剛 君 (先端医科学研究所 遺伝子制御研究部門/大学院博士課程1年 GCOE RA) 提出レポート

る。例えば Shh シグナルを遮断する Cur-61414 という化合物は、aminoproline 誘導体であり、Smo に直接結合することでヘッジホッグシグナル伝達経路を阻害する。現在、Cur-61414は、基底細胞癌の患者群に対して、臨床治験が行われている。また、Cur-61414以外にも様々なヘッジホッグシグナル伝達経路の低分子アンタゴニストが報告されており、ヘッジホッグシグナル伝達経路を阻害する薬剤の研究や開発が盛んに行われている。(Nature Reviews, 2006; 5: 1026-1033.)

確かに分子腫瘍学的知見に基づく新規治療戦略開発は魅力的である。しかしながら、腫瘍の新規分子標的薬の開発に対して僕は、以下の2つの理由からずっと疑問を抱いている。

理由A: しばらく投与すると腫瘍細胞が alternative pathway を活性化することで耐性を獲得してしまうため、結果的に悪性化・難治性を加速させてしまうのではないのか?

理由B: 外科的切除や放射線治療を含めた集学的治療 (multidisciplinary therapy) の方が医療経済学的に優れているのではないのか?

特に理由Aに関しては Shh シグナルと Wnt シグナルの crosstalk (相互作用) が様々な基礎研究論文で報告されており、Shh シグナルを遮断したことで代償性に Wnt シグナルなどの他の生存・増殖シグナルが活性化することが危惧される。

= 癌幹細胞への特効薬になるか? そして発生と発癌の共通性による想定しうる副作用 =

「腫瘍とは傷の治らない創傷治療である。(Cancer is a persistent wound-healing.)」とは、ワインバーグ博士の名著からの引用であるが、いい得て妙である。

確かにサイクロパミンをはじめとする Shh の antagonist は新規腫瘍戦略として期待される面が多々ある。とりわけ髄芽腫での Shh の antagonist 臨床応用は注目度が高い。しかしながら、サイクロパミンの長期投与は、成体中でも存在する未分化な細胞集団に影響を与えることで、組織リモデリングや再生能力に想定しえぬ悪影響を及ぼす可能性が考えられる。発生段階の未分化な細胞が commit する際に働く分子やシグナル伝達と、発癌する際に脱分化 (de-differentiation) や trans-differentiation を遂げる際に働く分子やシグナル伝達とが大いに共通している。実際に、Shh は幹細胞因子として知られており、小脳の発生段階において高く発現し分裂を促進する因子でもある。癌幹細胞とは同様の経路に依存して、自己再生 (self-renewal) と多分化能 (multi-lineage differentiation) を発揮していることが大いに考えられる。髄芽腫の細胞では神経幹細胞のマーカーの一つであるネスチン (nestin) が多量に発現していることから、この推測は裏付けられる。

発生段階の正常幹細胞と発癌の癌幹細胞のシグナル伝達を考慮すると、癌幹細胞を標的とする治療薬は、催奇形性をはじめとする思わぬ副作用をもたらす危険性を常に認識しなければならない。実際に頭蓋咽頭腫や胃異所性迷入腺などの器官発生段階で ectopic に残存してしまった未熟な細胞集団が、成人発症性の発癌を呈することが臨床的に認められている。

5-3 田中 啓二 博士

財団法人東京都医学総合研究所 所長

授賞研究テーマ「蛋白質分解酵素複合体プロテアソームの発見と作動機構の解明」

「プロテアソームの発見・解明から期待すること」

= プロテアソームの基本的機能と臨床的応用 =

優秀レポート賞

吉田 剛 君(先端医科学研究所 遺伝子制御研究部門/大学院博士課程1年 GCOE RA) 提出レポート

細胞内のタンパク質は恒常性維持のために秩序だった分解を受けている。これに関与する分解系がユビキチン依存性プロテアソーム系である。プロテアソームで分解されるためには、標的タンパク質に特定のタグが付けなければならない。この目印の代表がユビキチンである。ユビキチンはアミノ酸 76 個から成るポリペプチドであり、標的タンパク質の Lys 残基にイソペプチド結合で結合する。ユビキチンは種を超えて進化的に極めて保存性の高いタンパク質である。

ユビキチン化されたタンパク質を分解するのがプロテアソームで次の 3 つがある。

- 1: ATP 依存型 26S プロテアソーム
- 2: ATP 非依存型 20S プロテアソーム
- 3: フットボール型プロテアソーム

活性型の 26S プロテアソームは巨大で複雑な分子複合体(分子量 250 万、総サブユニット数約 100 個から構成)であり、タンパク質分解を実行する 20S プロテアソームの両端に 19S 複合体が会合した。その 20S プロテアソームは各々 7 種類のサブユニットがリング状に集まった リングと リングが の順で会合した円筒型粒子であり、酸性、塩基性、疎水性アミノ酸のいずれからも切断できる活性を有している多機能性のプロテアーゼ複合体である。

(参考文献:『タンパク質科学イラストレイテッド』羊土社 68-73 頁)

細胞質だけでなく核でもユビキチンプロテアソーム分解が起きる。PA200 と PA28 は核内に存在する 20S プロテアソーム活性化因子であり、ともに PA700 とヘテロ結合することで活性化する。言い換えると、ユビキチンの起きる「場」はペプチダーゼ活性を有する PA28 のサブタイプに依存する。細胞質では PA28 が存在するのに対して、PA28 は核内でホモ 7 量体を形成している。PA28 は進化的に保存されたタンパクであり、ホモ欠損マウス胎児では細胞増殖が遅くなり、線維芽細胞では G1 期の細胞が増加する。またアポトーシスシグナルに対する感受性も増加する(EMBO J. 2002; 21: 3516-25.、EMBO J. 2008; 27: 852-64.)。

このようなユビキチン-プロテアソーム分解システムを利用して、腫瘍細胞内のプロテアソームの働きを阻害することにより、異常タンパク質を蓄積させて腫瘍細胞を死滅させるような薬剤が開発されている。その結果、2003 年にアメリカにおいてはプロテアソーム阻害剤である Bortezomib(ボルテゾミブ;商品名ベルケイド)が認可され、現在は国内で多発性骨髄腫に対する治療薬として汎用されている。骨髄腫細胞をはじめとする腫瘍細胞は、細胞周期に関連したこのプロテアソームにも何らかの異常があり、正常細胞よりもプロテアソーム阻害薬に対する感受性が高いのではないかと考えられている。

= 胸腺プロテアソームに関する詳述 =

胸腺ストローマと称される細胞群によって提示される主要組織適合抗原(major histocompatibility complex: MHC)と自己ペプチド複合体との相互作用によって、T 細胞の運命が決定される。MHC-自己ペプチド複合体と「適度」な親和性を有する受容体を有する T 細胞は「正の選択」を受けることによって生存するが、MHC-自己ペプチド複合体と強く反応する TCR を有する細胞は「負の選択」により死滅する。それぞれの T 細胞が正負の選択のどちらに運命づけられるかについては、TCR と MHC-自己ペプチド複合体との親和性の総和の程度に応じて引き起こされる T 細胞内のシグナル伝達の違いによって振り分けられていると考えられている。正の選択は胸腺の皮質領域に局在している胸腺皮質上皮細胞

優秀レポート賞

吉田 剛 君(先端医科学研究所 遺伝子制御研究部門/大学院博士課程1年 GCOE RA) 提出レポート

胞(cortical thymic epithelial cell = cTEC)で局在的に行われ、負の選択は髄質に局在する胸腺髄質上皮細胞(medullary thymic epithelial cell:mTEC)という特殊に分化したストローマ細胞によって実行される。MHC を獲得した脊椎動物ではプロテアソームは MHC クラス I 結合ペプチド産生の必須酵素でもあり、細胞性免疫で重要な CD8 陽性 T 細胞を介した免疫応答に不可欠な役割を果たす。

胸腺プロテアソームの役割を明らかにするべく、5t ノックアウトマウスを作製し、胸腺における T 細胞分化を観察したところ、5t 欠損マウスは胸腺の大きさや胸腺の皮質・髄質構造は正常であった。本事実から、5t は cTEC の分化・生存維持に必須というわけではなく、5t 欠損 cTEC では 5 や 5i が代償的に機能すると考えられる。胸腺内の未熟 T 細胞は CD8 と CD4 の両方を発現するダブルポジティブ(DP)細胞の段階で cTEC 上の MHC クラス I または MHC クラス II との「適切」な相互作用により正の選択を受けた細胞が、それぞれ CD8 または CD4 シングルポジティブ(SP)細胞に分化する。SP 細胞は胸腺の髄質に移行して mTEC による負の選択をさらに受けることになる。5t 欠損マウスでは DP、CD4 陽性 SP の細胞数は正常である一方で、CD8 陽性 SP 細胞が著明に減少していた(Science, 2007; 316:1349 - 1353.)。本事実、5t 欠損によって、cTEC 上の MHC クラス I - 自己ペプチド複合体と TCR との相互作用による正の選択が特異的に障害されていることを強く示唆していると考えられる。

= プロテアソームと小胞体ストレスとの関連性 =

小胞体は細胞内の分泌型、膜貫通型を問わずほとんどのタンパク質の立体構造(conformation)を規定するフォールディング(folding)に重要な細胞内小器官である。言い換えると、分泌経路を通るほとんどのタンパク質は、小胞体で様々な修飾を受け成熟して機能を獲得する。小胞体内で行われるタンパク質の修飾を阻害する細胞内外からの刺激は、タンパク質の折り畳み(folding)異常あるいは構造異常のタンパク質(unfolded protein)を小胞体内に蓄積させることがよく知られている。これがいわゆる小胞体ストレスと呼ばれる状態である。つまり小胞体内のホメオスタシスが保たれず、細胞内のタンパク質の quality が正常に保たれないことこそが小胞体ストレスを引き起こすのである。

この小胞体ストレスに適応する生体システムは「Unfolded Protein Response(UPR)」別名、「小胞体ストレスシグナリング」と提唱されている。UPR には具体的に以下の 3 つの機構があると考えられている。

(1)翻訳を抑制して、新しく翻訳後修飾されるはずのタンパク質がそれ以上は小胞体内へ送り込まれないようにすることで、小胞体内の負荷を軽減する(Attenuation: 翻訳抑制)。

(2)小胞体シャペロンを誘導して小胞体内のフォールディング容量を増大させ、不良品タンパク質の修復能を増強させる(Induction: 転写誘導による巻き戻し促進)。

(3)misfolding された不良品のタンパク質を小胞体から引き抜く装置を転写誘導し、引き出されたタンパク質を細胞質でユビキチン化し、26S プロテアソームによりプロテアソーム分解を促進する(Degradation: 転写誘導による分解促進)。UPR が正常に機能しない場合や小胞体ストレスが非常に強く慢性的に持続する場合は、アポトーシス促進分子の機能が優勢になり、細胞死が誘導される。小胞体ストレスシグナリングは、IRE1・PERK・ATF6 という 3 つの酵素によって制御されている。小胞体ストレスが負荷されると、小胞体ストレスセンサーである膜タンパクドメインから GRP78/BiP が解離し、IRE1 はホモダイマーを、PERK はオリゴマーをそれぞれ形成して活性化する。ATF6 の場合はゴルジ装置に輸送された後に、S1P および S2P によって膜内切断を受け、切断断片が核内に移行する。IRE1 はその C 末端側に存在

優秀レポート賞

吉田 剛 君 (先端医科学研究所 遺伝子制御研究部門/大学院博士課程1年 GCOE RA) 提出レポート

する RNaseL ドメインによって転写因子 XBP-1 の pre - mRNA を切断し活性型の XBP-1 をコードする成熟型 mRNA に変換する。活性化型 XBP-1 は核に輸送され、ERSE あるいは ATF6site に結合して分子シャペロンの転写を促進する。また、IRE1 の C 末端側には TRAF2 および Ask1 がリクルートされ、引き続いて JNK pathway を活性化する。PERK は eIF2 をリン酸化してタンパク質翻訳を抑制する。この PERK-eIF2 系の活性化は、転写因子 ATF4 の翻訳を促進する。誘導された ATF4 は CRE (cyclic-AMP response element) に結合し分子シャペロンの転写を誘導する。ATF6 切断断片は直接 ERSE に結合し、分子シャペロンの転写を促進する。(Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108: 7832-7., Exp Cell Res. 2008; 314: 1667-82.)

言い換えると、確かに小胞体ストレスシグナリングは細胞内タンパク質の quality を担保する上で小胞体内のホメオスタシスに重要であるが、ストレスが慢性的である場合は逆に細胞死を誘導する「諸刃の刃(double-edged sword for cell survival)」となりうる。また、小胞体膜上に存在する3つの1回膜貫通型タンパク質(IRE1, PERK,ATF6)が小胞体ストレスセンサーとして異常タンパク質の蓄積を感知し、細胞質あるいは核内にシグナルを伝えることで、UPR が起こることが明らかにされていることはユビキチン - プロテアソーム依存性タンパク分解の異常による疾患の病態解明において非常に重要と思われる。最近のトピックとして挙げると、浦野博士(STEMCELL SEMINAR #54)らによる WFS1 の HRD1 タンパク質安定化機構の解明が代表的と言える。HRD1 は小胞体膜上に存在する E3 ユビキチンリガーゼである。WFS1 は HRD1 とともに、 ATF6 をユビキチン プロテアソームシステムに運ぶことで、ATF6 の分解を促進していることが明らかになった。臨床サンプルによる研究でも、Wolfram 症候群の患者において、WFS1 の欠如によって ATF6 の強い活性化が慢性的に起こり、膵細胞や視神経細胞の細胞死が誘導される。言い換えると、ATF6 を持続的に強制発現することが膵細胞死を引き起こす(Clin Genet. 2011; 79: 103-17., Mol Biol Cell. 2011; 22: 4390-405.)。車のペダルに喩えるならば、ATF6 はストレスシグナリングのアクセルの役割を果たしているが、これが常にオンであると、細胞にとって不利益が生じる。

= 新規腫瘍治療戦略「G0 期追い出し、閉じ込め療法」との関連 =

癌幹細胞 (Cancer stem cell; CSC) は細胞周期では G0 arrest と呼ばれる状態で増殖が抑制されている dormant status にあると考えられてきた。分化した腫瘍細胞が供給される前駆段階として、dormant CSC から前駆細胞 (transit-amplifying cells: TA 細胞とも呼ぶ) が産生されるが、その旺盛な増殖分化能を維持するために、ニッチにおいては一部の癌幹細胞は細胞周期を G0 期に保持していると考えられている。さもないと全ての幹細胞が分化増殖の方向に commit してしまい、幹細胞の枯渇に伴う組織構築不全が生じる。この CSC の生物学的特性によって、細胞分裂を阻害剤する抗癌剤であるトポイソメラーゼ阻害剤 (アントラサイクリン系抗癌剤など) や微小管重合阻害剤 (アルカロイド系抗癌剤) は細胞分裂が盛んな細胞に対してのみ作用するのに対して、そのために、癌幹細胞は細胞周期依存性の抗癌剤に抵抗性を示すと考えられている。「G0 期追い出し療法」とは、dormant state にある癌幹細胞を含むもともとは増殖能などにおいてヘテロ不均一性を示す「CSC 集団」を、何らかの刺激でホモ均一性な増殖性細胞に誘導することで、薬剤感受性を高めようという戦略である。対照的に、「G0 期閉じ込め療法」とは、遅発性転移や再発の主因となる癌幹細胞を完全に dormant status にしてしまうことで体内に癌細

優秀レポート賞

吉田 剛 君(先端医科学研究所 遺伝子制御研究部門/大学院博士課程1年 GCOE RA) 提出レポート

胞は残存するも臨床的に悪性度を発揮しないという治療戦略である。未だ、どちらの治療が現実的かつ有効かということに関しては、科学的根拠に乏しいと言わざるを得ない。

Fbw7 はサイクリン E、c-Myc、c-Jun、Notch などの細胞周期を回転させる方向に働くアクセル分子(発癌における driver molecules)を分解することによって増殖を負に制御する癌抑制遺伝子である。一方で、Skp2 の主な基質は CDK 阻害因子 p27 である。増殖サイクル(細胞周期)への再進入には p27 を Skp2 がユビキチン化する必要がある、一方、増殖サイクルから静止期(G0 期)へ脱出する際には、MYC を Fbw7 がユビキチン化することが必要である(Cancer Sci. 2009;100:1374-81.)。こういった細胞周期制御は、ニッチで dormant な形質を呈する場合と増殖が盛んである形質である場合という癌幹細胞の二面性を追求する上で有用であると期待されている。

Fbw7 欠損モデルマウスの造血幹細胞において C-MYC が異常に蓄積していたことから、Fbxw7 は造血幹細胞が G0 期に留まり自己複製能を持ち続けるのに必要不可欠な因子であることが示唆された。加えて、Fbw7 を欠損することで C-MYC の分解が障害され C-MYC の異常蓄積が起り、造血幹細胞は G0 期に留まることが出来ずに細胞周期に進出し増殖サイクルに入ってしまう(Genes Dev. 2008; 22 : 986-991.)。すなわち、一過性に過剰増殖を認めるが最終的に造血幹細胞が枯渇してしまうことで汎血球減少を認める。理由は定かではないが、CyclinE の異常蓄積は認められず、ユビキチン化標的分子を認識する E3 である Fbw7 は場所・時期依存的に基質を選択的にポリユビキチン化していることを示唆している。

C-MYC のユビキチン - プロテアソーム分解に関して興味深い研究論文が九州大学生体防御研究所中山教授のラボから発信された(J Clin Invest. 2011;121:342-54.)。本論文では、Cre-loxP システムを用いて成体マウスの肝臓で特異的に Fbw7 の発現を消去すると増殖能が増して過誤腫(hamartoma)は発症するものの、p53 チェックポイントも同時に活性化されるせいか、肝癌は一例も発生しなかった。過誤腫性疾患で高率に認められる TSC1,TSC2 遺伝子の機能喪失型突然変異はこのモデルマウスでは認められなかった。一方で脂肪酸代謝に関わる転写因子 SREBP のユビキチン - プロテアソーム分解が抑制されるために、メタボリックシンドロームで臨床的に注目されている、顕著な脂質蓄積を伴う病態である非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)が発症するらしい。ヒトでの NASH は長期間の insulin resistance status では酸化ストレスなどによる肝癌の発症のハイリスク病態であるが、マウスではなぜか悪性転化したものはなかった点は Discussion にも明記しておらず敢えて著者らが温めていると思われ非常に興味深い。Notch1 と SREBP c の異常蓄積が認められるものの、他のポリユビキチン化されるはずの基質の発現度は正常である点は、固形組織において Fbw7 が時期・組織依存的に“巧妙かつ厳密に”ユビキチン化される基質が規定されるかを示唆している。

以上のように ROS とユビキチンの関連、ユビキチンとオートファジーの相互作用と制御機構、そしてユビキチンの時間・臓器組織依存性の解明こそが、プロテアソーム・ユビキチン経路の臨床への応用につながると思われている。