

論文内容の要旨 Abstract of Dissertation

氏名Name 丹下 梨穂

癌の罹患者、そして癌により死亡する人は世界的に増加している。日本では死因第1位が癌であり、近年は3人に1人は癌で死亡している。核酸・タンパク質に次ぐ第3の生命鎖である糖鎖は、癌細胞の浸潤、転移、及び腫瘍血管新生に密接に関わっていることが明らかになっている。細胞が癌化すると、細胞表面の糖鎖構造が一変する。この変化は、糖鎖を合成する糖転移酵素の異常発現に起因する。癌で異常発現する糖転移酵素の1種に β 4-ガラクトース転移酵素 (β 4GalT) があり、特に β 4GalT3の発現は、神経芽腫において悪性形質や予後の悪さと正の相関を示す。神経芽腫は、白血病や脳腫瘍に次いで患者数の多い小児癌で、高リスクグループと診断された場合の5年生存率はおよそ30%である。そのため、高リスクグループの神経芽腫に対する効果的な治療薬及び治療法の開発が望まれている。本研究は、未だ有効な治療薬がない神経芽腫に対する薬剤の探索や治療戦略への応用を目指し、ヒト β 4GalT3遺伝子の転写制御メカニズムを解明することを目的とした。

はじめに、 β 4GalT3遺伝子の5'-上流領域を単離し、ルシフェラーゼ遺伝子上流に繋いだレポータープラスミドを作製した。このプラスミドをベースにデリ-ションコンストラクトを作製し、これらのプラスミドを用いてSH-SY5Yヒト神経芽細胞腫におけるプロモーター活性を解析した。その結果、 β 4GalT3遺伝子の転写開始点(+1とする)の5'-上流-69から-6にプロモーター領域が存在することが示された。このプロモーター領域において、転写因子Specific protein (Sp) 1/3結合部位が存在することを見出し、クロマチン免疫沈降法により、SH-SY5Y細胞ではSp3が結合することを明らかにした。また、SH-SY5Y細胞にSp3遺伝子を導入することで、 β 4GalT3遺伝子プロモーターの活性化にSp3が関与することを示した。

Sp3は転写活性化因子・転写抑制因子のどちらとしても機能するが、転写活性化因子としての機能は翻訳後修飾に起因する。次に、神経芽腫における β 4GalT3遺伝子の転写活性化のメカニズムを、代表的な翻訳後修飾であるリン酸化に着目して解析した。ウシ胎児血清 fetal bovine serum (FBS) は、mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル伝達のリン酸化を増加させ、MAPKを活性化する。活性化したMAPKによってSp3がリン酸化されるため、FBS刺激によりSH-SY5Y細胞におけるMAPKのリン酸化及び β 4GalT3遺伝子プロモーター活性への影響を解析した。その結果、FBSはMAPKシグナル伝達及び β 4GalT3遺伝子プロモーターを活性化した。一方、MAPKキナーゼの阻害剤U0126で処理すると、MAPKシグナル伝達及びプロモーター活性は減少した。これらの結果から、SH-SY5Y細胞において、MAPKシグナル伝達によりリン酸化されたSp3が、 β 4GalT3遺伝子プロモーターを活性化する可能性が考えられた。Sp3には、4ヶ所のリン酸化されるSerine (Ser) 残基 (Ser73、Ser563、Ser566、Ser646) を有し、Ser563とSer566は転写活性阻害ドメインに、Ser646はDNA結合ドメインに存在する。

これら 4 ヶ所に変異を導入した Sp3 変異体発現プラスミドをレポータープラスミドと共導入した実験から、Sp3 の転写活性阻害ドメインと DNA 結合ドメインのリン酸化が β 4GalT3 遺伝子プロモーターの活性化に重要であることが示された。

癌治療に効果的な薬剤探索の手段として、ルシフェラーゼ遺伝子を用いたスクリーニングシステムが繁用される。 β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域を繋いだレポータープラスミドが薬剤探索へ応用できないかと考え、Sp3 が DNA へ結合するのを阻害する化合物や、シグナル伝達経路阻害化合物で処理し、各種化合物に対する応答性を解析した。その結果、これらの化合物は U0126 と同様に β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性を減少させた。したがって、 β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域を繋いだレポータープラスミドは、薬剤応答性があることが示された。

本研究で、 β 4GalT3 遺伝子プロモーター領域を特定し、神経芽細胞腫において Sp3 が転写を活性化することを示した。また、 β 4GalT3 遺伝子プロモーターの活性化には Sp3 内の特定の Ser 残基のリン酸化が重要であることを明らかにした。さらに、 β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域を繋いだレポータープラスミドは、Sp3 が DNA へ結合するのを阻害する化合物及び細胞内シグナル伝達を阻害する化合物への応答性を示し、神経芽腫に奏功する薬剤の探索に有用であると考えられる。本研究で明らかにした β 4GalT3 遺伝子の転写制御メカニズムに着目することで、神経芽腫の新たな薬剤の探索や治療戦略をもたらすことが期待される。