

単一細胞解析から捉える癌と動脈硬化を結ぶ p53 による老化制御システムの新たな役割

田中知明

千葉大学大学院医学研究院

【研究の背景】

癌と老化の関わりについては、加齢性変化が関与するだけでなく、動脈硬化のリスク因子となる糖尿病や肥満が密接に関わっていることが、疫学データや最近のシグナル解析から明らかになっている。その根底には、癌と動脈硬化を結ぶ分子病態のひとつとして、細胞老化とその key regulator である癌抑制遺伝子 p53 がとても重要な役割を果たすことがわかっている。内皮や平滑筋細胞、局所マクロファージは機能や役割が大きく異なると同時に、細胞老化も heterogenous に存在する。これらの問題を克服するために、p53 の老化制御機能と癌や動脈硬化に関わる DNA 損傷応答シグナルに着目した。DNA 損傷シグナルは、DNA 修復機構と協調してゲノムの恒常性維持に重要な役割を担うが、その破綻は癌化と密接に関連することが知られている。DNA 損傷シグナルを織り成す一連の分子群の中で、ATM のシグナルを仲介する Chk2 キナーゼは、癌抑制遺伝子産物 p53 を代表とした多くの基質タンパクをリン酸化するだけでなく、最近では自身が多彩なリン酸化やユビキチン (Ub) 化を介した複雑な調節を受けることで、細胞周期チェックポイントとアポトーシス制御において多面的な役割を果たすことが明らかにされつつある。実際に、乳癌や副腎皮質癌などを家族性に生じる Li-Fraumeni 症候群における p53 や Chk2 の germline mutation 報告は、その生物学的重要性を裏付けている。一方、肥満組織や動脈硬化巣においても、高インスリン血症に伴う酸化ストレスや慢性炎症がトリガーとなって DNA 損傷シグナルの活性化が生じることが報告され、癌のみならず生活習慣病における役割も注目されている。

【目 的】

そこで、本研究提案では、癌や動脈硬化に関わる DNA 損傷シグナル Chk2-p53 に着目し、生化学的手法と CRISPR/Cas9 システムを用いてその制御機構を検討した。さらに、単一細胞レベルでの DNA 損傷応答シグナルがもたらす影響を検討することを目的とした。

【方 法】

ヒト癌細胞株を用いて、DNA 傷害依存的な Chk2 リン酸化状態の変化を観察した。LC-MS/MS によって、Chk2 の新規リン酸化部位の同定し、結合タンパク解析を行った。Chk2 発現制御におけるユビキチン化の役割を検討するため、ユビキチン化アッセイを行い、FUCCI システムを用いて細胞周期制御との関連を評価した。病態生理学的な検討のため、乳癌患者のデータベース解析とヒト動脈硬化組織の発現解析を行った。

【結 果】

初めに DNA 損傷応答における、Chk2 のリン酸化状態の時間依存的変化を検討した。使用薬剤は、DNA の 2 本鎖切断を引き起こすことが特徴的であるネオカルジノスタチン (NCS) を用量依存性に使用し、数種類の癌細胞株を用いた。NCS 添加による p53 の発現増加は、DNA 損傷後 2 時間から 6 時間の比較的早いタイムポイントで認められた。ホスタグ分子の存在下に SDS-PAGE で Chk2 を分離すると、p53 誘導と一致して、高度にリン酸化された Chk2 を認めた。特に、高濃度の NCS 処理では、複数のリン酸化を受けた Chk2 が分離された。このことは、DNA 損傷によって Chk2 は多数のリン酸化制御を受けることを示し、DNA 傷害後の時間やその程度によりリン酸化状態が異なっていることを示している。そこで、real-time PCR 法を

用いて、Chk2-p53 下流遺伝子の mRNA 発現解析を行った。この結果、p53 の下流遺伝子の中でも、とりわけ p21 の発現変化は DNA 傷害下における Chk2 のリン酸化の変化状態とほぼ一致し、Chk2 が p21 の発現制御に重要であると考えられた。

さらに Chk2 の役割を検討するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて、MCF-7 細胞株にて、Chk2 のノックアウト株を作成した。WT-MCF7、Chk2-KO、p53-KO 細胞株にて、DNA 損傷応答時の Chk2-p53-p21 経路の変化を検討した。Chk2 の KO によって、DNA 傷害に伴う p53 と p21 の発現誘導は有意に低下し、一方、p53KO によって、p21 や PUMA の遺伝子発現誘導効果は完全に消失した。この結果は、p53 の上流シグナルには Chk2 以外の代替経路が存在することを示唆している。

次に、DNA 損傷後の Chk2 制御における分子メカニズムを明らかにする目的で、LC-MS/MS 解析を用いて、Chk2 リン酸化部位と会合分子の解析を行った。今回の検討では、既知のリン酸化部位の同定に加えて、新規リン酸化部位を複数箇所同定することに成功した。特に、新規リン酸化部位 Thr441/Ser442 は Chk2 の酵素活性の中心であるキナーゼドメインの中心に位置しているだけでなく、その周囲のリジン残基がユビキチン化を受けていることが判明した。また、Ser518 は nuclear localization signal(NLS) 近傍に位置していた。そこで、これらの部位の非リン酸化(Ala 置換)、リン酸化疑似変異体(Asp 置換)を作成し、機能解析を行うことにした。一方で、Chk2 結合分子の検討として、LC-MSMS 解析から 243 種類の Chk2 の結合蛋白が同定された。そこで DAVID を用いて、Gene Ontology 解析を行った。興味深いことに、ユビキチン制御関連遺伝子や細胞周期制御に関わる gene ontology を持つ分子が有意に集積していることが判明した。このことは、結合分子と協調して Chk2 が細胞周期制御を担っており、ユビキチン化によって機能制御を受ける可能性を示していると考えられた。実際に、Chk2 蛋白の分解は、ユビキチン化を介して Chk2 蛋白がプロテアソームに輸送されるというユビキチン-プロテアソーム機構が関与していることが報告されている。そこで、新規に同定した Chk2 リン酸化部位が、Chk2 蛋白のユビキチン化制御に関与するかについて、ユビキチン化 assay を用いて検討した。定常状態で Chk2 はユビキチン化されており、DNA 傷害により Chk2 のユビキチン化は抑制された。つまり、Chk2 はユビキチン化制御を受け、DNA 損傷後にタンパク安定化されることを確認した。この現象について、Chk2 ユビキチン化における変異体の影響を検討した。WT と比較し、Thr441/Ser442 リン酸化疑似変異体(Asp 置換)と Ser516/Ser518 非リン酸化変異体(Ala 置換)では、Chk2 のユビキチン化が亢進していた。反対に、Thr441/Ser442-Ala 変異体と Ser516/Ser518-Asp 変異体では Chk2 のユビキチン化は低下した。この結果は、Chk2 のリン酸化状態は、各々の部位によってユビキチン化に与える影響が異なることを示している。さらに、変異体の蛋白分解速度を検討した。タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミド添加すると、Thr441/Ser442-Asp 変異体と Ser516/Ser518-Ala 変異体ではタンパク分解が亢進し、半減期は短縮した。つまり、Chk2 の安定性はユビキチン化の結果と一致していた。

さて、細胞周期を視覚的に捉える技術として FUCCI システムが確立されている。そこで、H1299 細胞(p53 欠失)で、FUCCI 安定的発現細胞株を樹立した。この FUCCI-H1299 細胞では、early G1 は発色を認めず、late G1 で赤、G1/S のトランジションで黄色、S/G2/M では緑に蛍光発色した。さらに FACS のソーティング機能を用いることで、細胞周期特異的解析を行った。FUCCI-H1299 に、LacZ-adeno または p53-adeno を感染させ、p53 有無による違い、DNA 損傷における細胞周期への影響を検討した。p53 非存在下では、DNA 損傷の有無によって、細胞周期変化をほとんど認めなかった。一方、p53 を発現させた細胞では、G1 期細胞の割合が増加した。また、p53 存在下に DNA 損傷を与えると early G1 と G1 期の細胞数が増加し、その鏡面像的效果として、G1/S トランジション期と S/G2/M 期の割合は低下した。これらの検討から、FUCCI システムを用いた解析により p53 の存在が DNA 損傷に伴う G1 チェックポイントに作用していることを細胞周期特異的に確認した。

次に、細胞周期特異的な p21 と cdc25c の転写活性化状態の変化を、RT-qPCR 法を用いて検討した。p21 の転写活性化は、p53 の存在下では、いずれの細胞周期によっても亢進した。そこで、どの細胞周期が最も強く DNA 傷害の影響を受けるかを検討した結果、G1 期と G1/S 期で強い p21 の発現誘導を受けた。一方、cdc25c 発現は、p53 の有無に関わらず、G1 期より S/G2/M 期で活性化されていた。よって、p53 依存的な p21 による細胞周期制御は、G1 と S 期において、重要な役割を果たしていると考えられた。さらに、Chk2 の新規リン酸化部位が DNA 損傷応答における細胞周期制御へ与える影響について DNA 損傷の影響が強い G1 期に着目し、検討した。Chk2-WT と 516/518 の非リン酸化変異体を比較したところ、G1 分画の細胞では、NCS による DNA 損傷によって、p21 の転写活性化が認め、G1 期の細胞割合が増加していた。一方、Ser516/Ser518-Ala 変異体では、G1 分画における p21 誘導効果は減少し、その結果に一致して、G1 期の割合も低下した。

【考 察】

DNA 損傷応答における Chk2 リン酸化と細胞周期制御についてまとめると、Chk2-KD・KO や、FICCI 細胞周期制御に関わる検討から、Chk2-p53-p21 細胞周期制御は DNA 損傷応答における G1/S チェックポイント制御に重要であることが確認された。また、今回の LC-MS/MS で同定した新規のリン酸化部位の機能解析の結果、Chk2-Ser516/Ser518 のリン酸化は、Chk2 のユビキチン化を抑制し、Chk2 を安定化させていた。特に、Ser516/Ser518 が非リン酸化状態は、Chk2 のユビキチン化を亢進させ、DNA 損傷における p53 依存的な p21 の転写活性化を抑制し、G1 における細胞周期停止を減少させると考えられた。一方、Thr441-Ser442 のリン酸化はユビキチン化を亢進させ、逆方向性のフェノタイプを示していた。リン酸化部位によって機能的役割が異なることから、同定された他の多くのリン酸化部位の機能解析と多彩なリン酸化による Chk2 制御機構を詳細に検討する必要があると考えられた。

Chk2 リン酸化と生活習慣病の役割を検討するため、ヒト糖尿病患者における大血管の動脈硬化巣のバイパス手術検体組織を用いて、p53 老化シグナルが活性化と p21WAF1 mRNA の発現誘導を検討した。HE 染色における腹部大動脈瘤の病理所見を示す。内皮特異的マーカーである CD31 陽性(赤)の内皮細胞において、核内に p53 が集積している所見が観察された。そこで、糖尿病患者において、動脈硬化の起こっている胸部/腹部大動脈と、動脈硬化の認めない胸部大動脈を 2 例ずつ、血管壁全体から total RNA を抽出して、各遺伝子発現を解析した。すると、老化マーカーである p21WAF1 mRNA は動脈硬化巣で顕著に亢進していた。また、VCAM1 や PAI1、IL8 などの遺伝子発現も亢進していた。この結果は、肥満脂肪組織の結果とほぼ同等の所見であり、糖尿病患者の動脈硬化巣における内皮細胞において、p53 活性化に伴う老化シグナルが生じていることを示している。つまり、Chk2 のリン酸化は癌進展抑制経路における機能と共に、動脈硬化組織においても惹起されている。従って、Chk2-p53-p21 といった DNA 損傷応答を活性化が、生活習慣病病態の形成に関与する可能性が示唆された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

今回の検討の結論として、DNA 損傷応答機構の key-regulator である Chk2 は、多彩なリン酸化やユビキチン化による発現調節を受けて、p53 依存的細胞周期制御を果たすことが明らかとなった。さらに、Chk2 リン酸化調節のメカニズムは癌と生活習慣病病態をつなぐ新たなシグナル経路となることが期待される。

最後に、本研究を御支援賜りました公益財団法人 先進医薬研究振興財団と関係者の皆様に深く感謝申し上げます。

【参考・引用文献】

1. Sakuma I, Koide H, Yoshida T, Yamato A, Fujimoto M, Tamura A, Komai E, Kono T, Nagano H, Horiguchi K, Yokote K, and **Tanaka T***. Congestive heart failure secondary to a TSH-secreting pituitary adenoma aggravated by takotsubo cardiomyopathy in elderly patient. *AACE Clinical Case Reports*. (in press) (査読有)
2. Nagano H, Nakagawa Y, Ishikawa N, Watanabe H, Miyabayashi Y, Nakayama A, Fujimoto M, Komai E, Shiga A, Tamura A, Kono T, Takiguchi T, Higuchi S, Sakuma I, Hashimoto N, Suzuki S, Koide H, Yokote T, **Tanaka T***. Seven familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia cases in three unrelated Japanese families and high-performance liquid chromatography analysis of the thyroxine binding profile. *Endocrine Practice*. (2017) Aug 17. doi: 10.4158/EP171964.OR. (2017) (査読有)
3. Hashimoto N, **Tanaka T***. Role of miRNAs in the pathogenesis and susceptibility of diabetes mellitus. *J. Hum. Genet.* 62, 141-150, (2017) (査読有)
4. Hosokawa H, **Tanaka T**, Endo Y, Kato M, Shinoda K, Suzuki A, Motohashi S, Matsumoto M, Nakayama KI, Nakayama T. Akt1-mediated Gata3 phosphorylation controls the repression of IFN γ in memory-type Th2 cells. *Nature Commun.* 7: 11289. (2016). (査読有)