

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 楊 義力

題 目 アポトーシスの分子機構の解明とがん治療への応用  
(The Molecular Mechanisms of Apoptosis and their Implications for Therapeutic Intervention)

T細胞の活性化誘導アポトーシスは、T細胞の選択ならびにその恒常性の維持に重要なメカニズムである。T細胞ハイブリドーマを用い、そのメカニズムの詳細を検討した結果、FasとFasリガンドの結合がこの活性化誘導アポトーシスを促進した。また、Fasは細胞表面に発現すること、FasリガンドはT細胞受容体と結合し速やかに活性化されること、ならびにグルコシルコイドやレチノイドはFasリガンドの活性化を抑制することにより、活性化誘導アポトーシスを阻害することが明らかとなった。さらに、HIV TatタンパクがFasリガンドの転写活性因子Egr-2,3と結合し、Fasリガンドの発現を相乗的に上昇させた。したがって、HIV感染者の末梢血単核球におけるFasリガンドの発現上昇は、Egr-2,3とHIV Tatとの協調作用によると考えられる。以上のことより、Fasリガンドの発現調節は、AIDS治療において有効な手段であることが示唆された。

グルコシルコイドによる胸腺の細胞死は、アポトーシスの古典的な例であり、発生期におけるT細胞レパトア形成の役割を持つと考えられている。胸腺細胞のアポトーシスがプロテアソーム阻害剤処理によって抑制されることから、アポトーシス誘導時に分解される抗アポトーシス分子の検索を行った。その結果、グルコシルコイド及びエトポサイドで処理した胸腺細胞においてcIAP1及びXIAPが、プロテアソームに依存的に消失していることを発見した。興味深いことに、IAPsは自己ユビキチン化を触媒し、RING部位を必要とする。野生型cIAPの過剰発現は、ユビキチン化後、すぐに分解されたことに対し、RING部位変異型のcIAPは分解されなかった。同様に、RING部位欠損のXIAPはアポトーシス誘導時に分解されず、野生型XIAPに比べ、アポトーシスを効果的に抑制した。以上の結果から、IAPsの自己ユビキチン化及び分解はアポトーシス過程に重要な出来事である。ユビキチン化システムの活性化が細胞のアポトーシスに重要な役割を果たすことが示された。

癌抑制遺伝子p53は、ゲノムの守護神でDNA損傷や発癌ストレスを受けた細胞に細胞増殖停止やアポトーシスを惹き起こす。細胞内のp53の発現量は、p53を分解するユビキチンE3リガーゼの一つであるHDM2によって制御されている。HDM2の自己ユビキチン化の阻害剤を検索するために、約10000個の化合物を含むライブラリーを用いて高処理スクリーニングを行った。その結果、HDM2のユビキチンE3活性を抑制する低分子化合物(HL198s)を同定した。HL198sは、細胞レベルではp53とHDM2の安定化、ならびにp53により制御する遺伝子の活性化を可能にし、さらに、正常型p53を発現する癌細胞を選択的にアポトーシスに誘導することができた。また、同様な手法で同定したユビキチンE1リガーゼの阻害剤も類似的に癌細胞を選択的に細胞死に誘導することが見られた。以上の結果から、癌細胞における正常型p53発現の促進は、癌細胞を選択的に細胞死に誘導するための有効な戦略であることが示された。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 Name	Yili Yang
題 目	The Molecular Mechanisms of Apoptosis and their Implications for Therapeutic Intervention (アポトーシスの分子機構の解明とがん治療への応用)

Activation-induced T cell apoptosis is an important mechanism to select T cell and maintain T cell homeostasis following antigen stimulation. Using T cell hybridomas as a model, I have found that the interaction of Fas and Fas ligand mediates activation-induced apoptosis. While Fas is constantly expressed on the surface of the cells, Fas ligand is rapidly upregulated by engagement of T cell receptor. Glucocorticoids and retinoids can effectively block activation-induced apoptosis by suppressing the upregulation of Fas ligand. Interestingly, HIV-encoded Tat can bind to Egr-2 and -3, which are major transcription factors in activation-induced Fas ligand upregulation, and synergize with them to induce the expression of Fas ligand. Therefore, the increased expression of Fas ligand in PBMCs from HIV-infected individuals may result the cooperative activities of activation-induced Egrs (2, and 3) and HIV Tat, suggesting that modulation of Fas ligand expression could be an effective target for therapeutic intervention for AIDS treatment.

Glucocorticoid-induced thymocytes death is a classic example of apoptosis and may also play a role in shaping T cell repertoire during development. Since proteasome inhibitors prevent thymocyte death, the degradation of anti-apoptotic molecules in cells induced to undergo apoptosis was examined. I have found that the cIAP1 and XIAP (inhibitors of apoptosis) were selectively lost in glucocorticoid- or etoposide-treated thymocytes in a proteasome-dependent manner before death. Interestingly, IAPs catalyzed their own ubiquitination *in vitro*, an activity requiring the RING domain. Overexpressed wild-type cIAP1, but not a RING domain mutant, was spontaneously ubiquitinated and degraded, and stably expressed XIAP lacking the RING domain was relatively resistant to apoptosis-induced degradation and, correspondingly, more effective at preventing apoptosis than wild-type XIAP. Autoubiquitination and degradation of IAPs may be a key event in the apoptotic program. These results also suggest that activation of the ubiquitination system may play a critical role in apoptotic cell death.

The p53 tumor suppressor protein is a critical guardian of genome, largely through inducing growth arrest and apoptosis in cells undergoing DNA damages or oncogenic stresses. Its level in cells is mainly regulated by its interaction with HDM2, which serves as an ubiquitin ligase (E3) to target p53 for degradation. A high throughput screening of chemical library containing 10,000 compounds was carried out to find inhibitors of HDM2 autoubiquitination. A family of small molecules (HLI98s) was identified that inhibits HDM2's E3 activity *in vitro*. In cells, the compounds allow the stabilization of p53 and HDM2 and activation of p53-dependent transcription. As a result, they preferentially induce apoptosis of transformed cells expressing wild type p53. Similar differential killing of tumor cells was observed with the ubiquitin E1 inhibitors I identified. These results indicated that accumulating wild type p53 in tumor cells is an effective strategy to selectively kill tumor cells.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	Yili Yang
審査委員	主査 鹿児島大学 准教授 侯 徳興
	副査 鹿児島大学 教授 藤井 信
	副査 鹿児島大学 教授 杉元康志
	副査 佐賀大学 教授 柳田晃良
	副査 琉球大学 教授 安田正昭
審査協力者	
題目	The Molecular Mechanisms of Apoptosis and Their Implications for Therapeutic Intervention (アポトーシスの分子機構の解明とがん治療への応用)
<p>アポトーシスは細胞死の一形態であり、多くの生命現象に関与している。これまでアポトーシスが①個体の発生・分化、個体の形成・維持；②がん、ウィルス、疾病や老化；③抗がん剤や食品由来成分によるがん細胞の破壊などに関与することが報告されている。それぞれの分子機構には複数の流れがあるが、不明な点が多い。本研究では、異なる癌細胞におけるアポトーシス誘導の分子機構とがん治療への応用について解析を行い、以下の研究結果が得られた。</p> <p>1. 活性化T細胞のアポトーシスは抗原刺激によるT細胞の選択や恒常性維持のための重要なメカニズムである。本研究はT細胞ハイブリドーマをモデルとしFas及びFasリガンドの相互作用がT細胞のアポトーシスを制御することを発見した。Fasは細胞表面上に一定に発現しているのに対し、FasリガンドはT細胞レセプターとの結合によって速やかに活性化される。また、グルココルチコイドやレチノイドはFasリガンドの活性化を抑制することによって活性化T細胞のアポトーシスを効果的に抑制することを明らかにした。興味深いことにエイズウイルス (HIV) をコードしたTatが、Fasリガンド発現を制御する転写因子である Egr-2 及び Egr-3 と結合し、相乗的にFasリガンドの発現を誘導した。</p>	

このことから HIV 感染者の末梢血単核球における Fas リガンドの発現促進は T 細胞活性化における Egr-2, Egr-3 及び HIV-Tat の協調作用によるものだと考えられる。以上の結果から Fas リガンドの発現調節はエイズ治療に有用な標的となることが示唆された。

2. グルココルチコイドによる胸腺の細胞死はアポトーシスの古典的な例であり、発生前における T 細胞レパトア形成の役割を持つと考えられている。胸腺細胞のアポトーシスがプロテアソーム阻害剤処理によって抑制されることからアポトーシス誘導時に分解される抗アポトーシス分子の検索を行った。その結果、グルココルチコイド及びエトポサイドで処理した胸腺細胞において cIAP1 及び XIAP がプロテアソームに依存的に消失していることを発見した。興味深いことに IAPs は自己ユビキチン化を触媒し、RING 部位を必要とする。野生型 cIAP の過剰発現はユビキチン化後すぐに分解されたことに対し、RING 部位変異型の cIAP は分解されなかった。同様に RING 部位欠損の XIAP はアポトーシス誘導時に分解されず、野生型 XIAP に比べアポトーシスを効果的に抑制した。以上の結果から IAPs の自己ユビキチン化及び分解はアポトーシス過程に重要な出来事である。ユビキチン化システムの活性化が細胞のアポトーシスに重要な役割を果たすことが示された。

3. 癌抑制遺伝子 p53 は、ゲノムの守護神で DNA 損傷や発癌ストレスを受けた細胞に細胞増殖停止やアポトーシスを惹き起こす。細胞内の p53 の発現量は p53 を分解するユビキチン E3 リガーゼの一つである HDM2 によって制御されている。HDM2 の自己ユビキチン化の阻害剤を検索するために約 10,000 個の化合物を含むライブラリーを用いて高処理スクリーニングを行った。その結果、HDM2 のユビキチン E3 活性を抑制する低分子化合物 (HL198s) を同定した。HL198 は細胞レベルでは p53 と HDM2 の安定化ならびに p53 により制御する遺伝子の活性化を可能にし、さらに正常型 p53 を発現する癌細胞を選択的にアポトーシスに誘導することができた。また、同様な手法で同定したユビキチン E1 リガーゼの阻害剤も類似的に癌細胞を選択的に細胞死に誘導することが見られた。以上の結果から癌細胞における正常型 p53 発現の促進は癌細胞を選択的に細胞死に誘導するための有効な戦略であることが示された。

以上のように本研究はアポトーシスの分子機構を解明することによって、癌細胞への効果的なアポトーシス誘導剤の開発に取り組み、生命科学および医学のみならず、食品による抗癌作用においても新しい知見を与え、学際領域に大きく寄与するものである。従って博士（学術）の学位論文として十分に価値のあるものと判定した。

学力確認結果の要旨	
学位申請者 氏 名	Yili Yang
審査委員	主査 鹿児島大学 准教授 侯 徳興
	副査 鹿児島大学 教授 藤井 信
	副査 鹿児島大学 教授 杉元康志
	副査 佐賀大学 教授 柳田晃良
	副査 琉球大学 教授 安田正昭
審査協力者	
実施年月日	平成20年8月8日
試験方法（該当のものを○で囲むこと。）	
<input checked="" type="radio"/> 口答 <input checked="" type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成20年8月8日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。また、学位論文の内容を慎重に検討した結果、本論文は学際領域に該当する研究であることを確認した。</p> <p>また、口答および筆頭により外国語（英語）の学力を確認した。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに識見を有するものと認め、博士（学術）の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。</p>	

学位申請者  
氏 名

Yili Yang

[質問 1] リン脂質のひずみとアポトーシスとの関連は？

[回答 1] 細胞膜が脂質二重層によって構成されている。その脂質がホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミンやスフィンゴミエリンなどを含める。しかし、これらのリン脂質が脂質二重層に不均一的に分布している。細胞膜外層には主にホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンに対して、内層にはホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリンがある。アポトーシスを惹き起こしている細胞にはホスファチジルセリンが細胞膜外層に流し出されていく。マクロファージがこれを認識し死細胞を除去する。従って、細胞膜外層においてホスファチジルセリンの検出がアポトーシス細胞の同定に有力的指標となっている。

[質問 2] p53を活性化する化合物は何種類があるか？

[回答 2] p53がゲノムの安定維持に必須である。すべての癌ではないが、多くのがん細胞にはp53の変異が見つかっている。従って、大別すれば、下記のような3種類の化合物が細胞p53の活性に関与すると考えられる。1. DNAをダメージする化合物； 2. p53の転写を制御する化合物； 3. p53をユビキチン化するまたは分解する化合物である。

[質問 3] IAPsの基質は？

[回答 3] 本研究はIAPsがユビキチンE3の活性を持つことを見出したので、SMAC, カスパーゼ7, TRAFsやカスパーゼ9等のようなタンパク質がIAPsの基質であることがすでに報告されている。これらのタンパク質の性質からみるとIAPsのユビキチンE3活性が細胞のアポトーシスやシグナル伝達にとって重要だと考えられる。

[質問 4] HL198s をHDM2の特異的インヒビターとして同定されているが、HDM2の量がどうして増えたか？

[回答 4] HDM2のユビキチンE3活性がp53の水準を調節する以外に、自己ユビキチン化によりHDM2自身の水準も調節する。HL198sがHDM2自己ユビキチン化及びp53ユビキチン化とも抑制するので、細胞のHDM2 及びp53の水準を増加する。

〔質問5〕PYR-41化合物によるユビキチンE1活性の抑制が一般的に抗炎症や抗がん作用を有すると考えてよろしいか？

〔回答5〕実は私もこのように予測している。転写因子NF- $\kappa$ Bの活性化が炎症の発生過程にとって重要である。ユビキチン化がIL-1やTNF・等のようなサイトカインによるNF- $\kappa$ Bの活性化が必須である。本研究はPYR-41化合物がサイトカインによるNF- $\kappa$ Bの活性化を多くのステップで阻害することを明らかにした。これから動物モデルを用いてその抗炎症機能を検証していきたいと思う。

〔質問6〕化合物PYR-41及びHL198sがキナーゼ阻害剤としても機能するか？

〔回答6〕多くの研究データによりこれらの化合物がキナーゼ阻害剤ではないと示唆されている。本研究の管内キナーゼ分析の結果、PYR-41及びHL198sがCdk2のキナーゼを抑制しなかった。むしろPYR-41がEGF受容体による自己リン酸化を促進した。さらにE1を添加すると、PYR-41によるタンパク質の分解を逆転させることができた。従って、ユビキチンE1が化合物PYR-41の主要な標的だと考えられる。

〔質問7〕ユビキチンE1の生理学的な重要性は？

〔回答7〕ユビキチンE1がユビキチン化過程において最初かつ必須の酵素であるので、ユビキチン化の生理学的な重要性とほぼ同じだと思う。従って、ユビキチンE1がDNA複製、転写、DNA修復から細胞シグナル伝達、細胞周期や分化まで、すべてとはまだ言えないが、多くの生命現象や細胞活動に関与している。

〔質問8〕ユビキチン酵素がいくつかあるが、がん細胞の選択死に対してどのユビキチン酵素が重要か？

〔回答8〕ユビキチンE3の特異性が大事だと思う。本研究は最初にユビキチンE3を持つHDM2の阻害剤同定もそのためである。しかし、さきに話したユビキチンE1の阻害剤も選択的にがん細胞を死なせることができることを加えておく。