

191. 癌と動脈硬化を結ぶ老化制御システムの解明

田中 知明

*千葉大学 大学院医学研究院 細胞治療内科学講座

Key words : tumor suppressor p53, Check point kinase 2 (Chk2), DNA damaging signal, 生活習慣病, 癌

緒言

高齢者人口の増加とともに、癌の発症のみならず、高血圧、心不全、虚血性心疾患などの生活習慣病、心血管疾患は増加の一途をたどっている。これらの疾患は高齢者に高頻度に認められることから、加齢関連疾患として老化形質の一側面と捉えることが可能である。従って、その病態形成には、細胞や組織レベルでの「老化制御システム」が中心的な役割を果たすことが考えられる。一方で、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為に、*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。そこで、癌と生活習慣病に作用する分子機構として、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。

方法

ヒト癌細胞株を用いて、DNA 障害依存的な Chk2 リン酸化状態の変化を観察した。我々が最近報告した LC-MS/MS による手法を応用して¹⁾、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 (Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator) 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肥満脂肪組織の発現解析による発現解析を行った。

結果および考察

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。フォ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

*現所属：千葉大学 大学院医学研究院 分子病態解析学

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。

次に、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。*p21* mRNA の転写活性化は、DNA 傷害後 2 時間・6 時間の比較的早い時間で NCS 濃度依存的に認められた。p53 下流遺伝子であり、アポトーシス誘導能を持つ *PUMA* や代謝調節遺伝子である *GLS2* は、6 時間から 24 時間で NCS の濃度依存的な発現誘導を認めた。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。

Chk2 の p53 の下流遺伝子制御への影響を確認するため、siRNA を用いて、Chk2 のノックダウン効果を検討した。Chk2 のノックダウンによって、NCS 添加に伴う p53 と p21 タンパクの発現誘導は顕著に低下した。この *p21* 発現誘導の抑制効果は、mRNA レベルでも確認できた。従って、Chk2 が p53 依存的な *p21* の発現を制御していることが明らかとなった (図 1)。

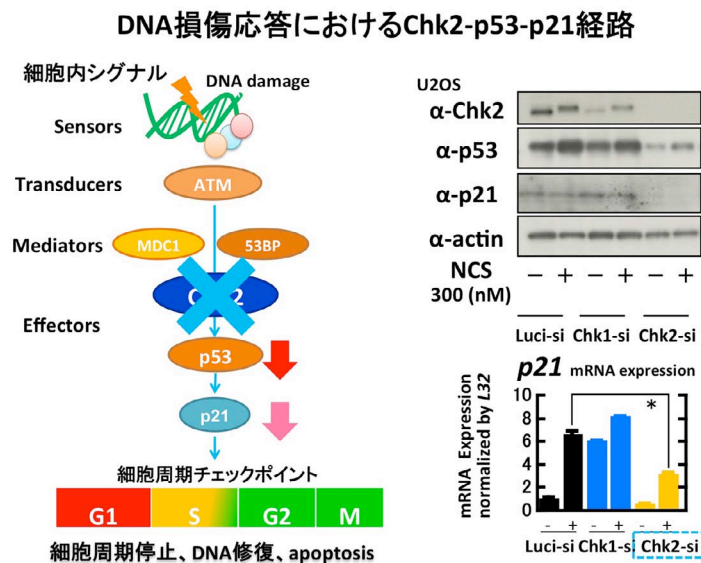


図 1. DNA 損傷応答における Chk2-p53-p21 経路

DNA 損傷応答経路 (左パネル)。DNA 損傷が感知されるとセンサー、トランスデューサーから、DNA 損傷応答のエフェクターである Chk2 にシグナルが伝わる。その結果、p53-p21 経路を活性化し、細胞周期を制御する。DNA 損傷後の Chk2 サイレンシング効果 (右)。U2OS における Chk1 及び Chk2 の siRNA 効果について、p53 と p21 のタンパク発現誘導における western blot の解析結果。また、*p21WAF1* mRNA の発現誘導における real-time PCR の解析結果。

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製した。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。いずれにせよ、DNA 傷害後の *p21* の発現誘導・転写活性化は p53 依存的であり、その一部を Chk2 が担っていることが明らかとなった。

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 (図 2)。

Chk2の機能ドメインと機能制御機構

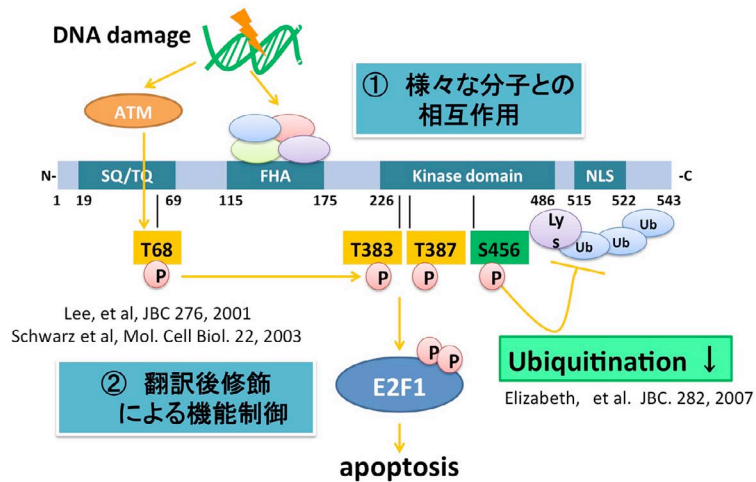


図2. Chk2 のドメイン構造とその機能制御機構

Chk2 のドメイン構造。ヒト Chk2 は 543 アミノ酸から構成される。機能発現調節機構の一つとして、FHA ドメインを介した様々な結合分子との分子間相互作用が挙げられる。また、キナーゼドメイン、C 末に核移行シグナルを有し、多数のリン酸化制御を受ける。例えば、T68 は、ATM によりリン酸化されることで、キナーゼドメインのオートフォスホリレクションを促す。一方、S456 はユビキチン化制御に作用する。LC-M/MS 解析により、①Chk2 結合分子の同定、②Chk2 翻訳後修飾解析を施行した。

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事が判明した。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) を作製し、機能解析を行うことにした (図3)。

LC-MS/MS解析よりThr441, Ser442 and Ser518 をChk2新規リン酸化部位として同定

Sites on phosphorylated Chk2 and ubiquitinated Chk2
identified by LC-MS/MS

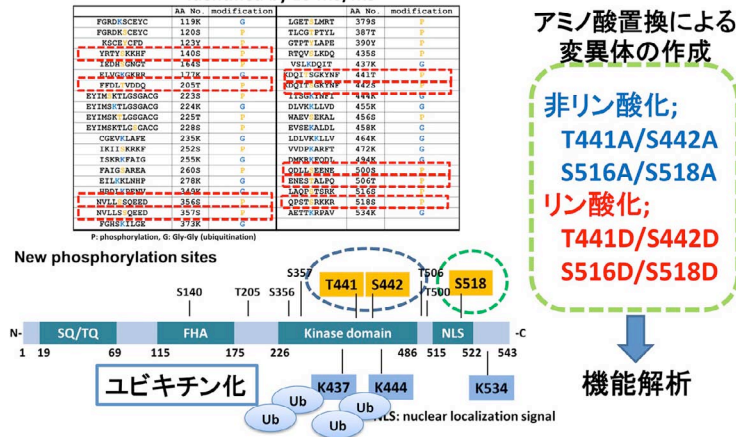


図3. LC-MS/MS 解析による Chk2 翻訳後修飾の同定

既報のリン酸化部位を同定した。新規リン酸化部位を認めたので、赤枠で示す。Chk2 キナーゼドメインの中心に、新規リン酸化部位 T441/S442 が確認でき、その周囲のリジン残基はユビキチン化されていた。また、S518 は nuclear localization signal (NLS) に位置していた。そこで、これらの部位の機能解析を目的にアミノ酸置換体を作製した（非リン酸化/リン酸化疑似変異体）。

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事が判明した（図4）。

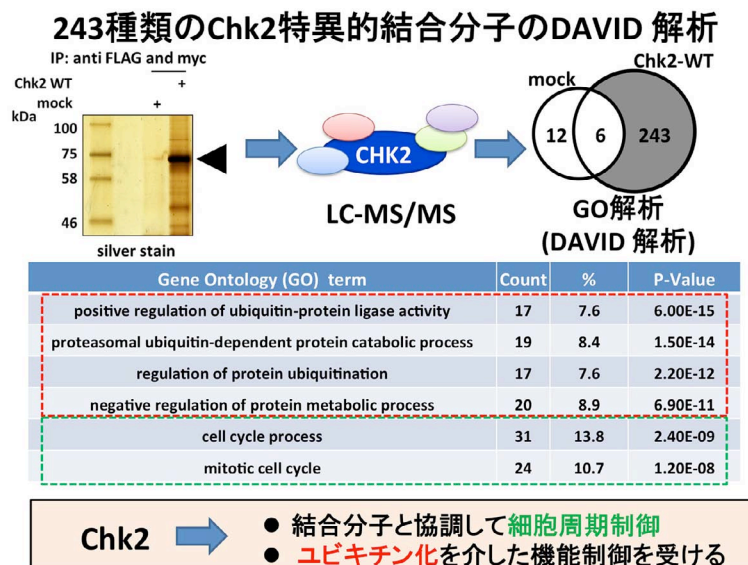


図 4. LC-MS/MS を用いた Chk2 結合分子の同定と DAVID 解析

Chk2 結合分子を SDS-PAGE 展開して LC-MSMS 解析を施行した結果、243 種類の Chk2 の結合蛋白が同定した。これらの結合分子に関して、DAVID 解析を行い gene ontology 解析した。ユビキチン制御関連遺伝子や細胞周期制御に関わる機能を持つ分子が有意に集積していた。

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。更に 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* の発現誘導をうけた。一方、*cdc25c* 発現は、p53 の有無に関

ならず、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。

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。

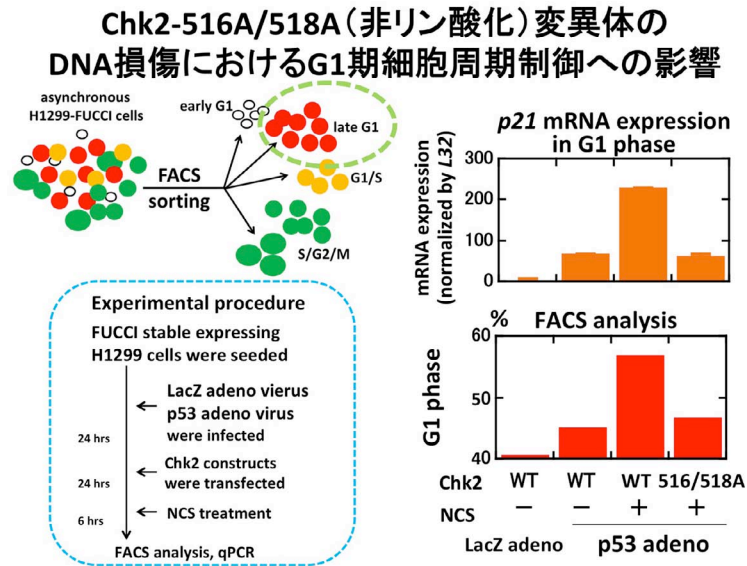


図5. Fucci安定発現H1299細胞を用いたChk2のS516/518の細胞周期制御における役割

Fucci安定発現H1299細胞株の樹立と、それを用いてChk2変異体(S516A/S518A)の細胞周期制御における役割を検討。実験プロトコールを左パネルに示す。Real-timePCR法によるG1期細胞分画におけるNCS処理後のp21WAF1 mRNAの発現(右上)。FACS解析によるNCS処理後のG1期分画の割合(右下)。

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、Fucci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、ヒト内蔵脂肪組織を用いた発現解析を行った。非肥満者に比較し、肥満者の脂肪組織では、複数のリン酸化をうけたChk2を認め、p53蛋白の発現も増加し、p21 mRNAの転写活性化の亢進していた。よって、肥満者の脂肪組織では、DNA損傷応答経路が活性化されていることを確認した。

ヒト肥満組織におけるDNA損傷応答経路 Chk2-p53-21の発現解析

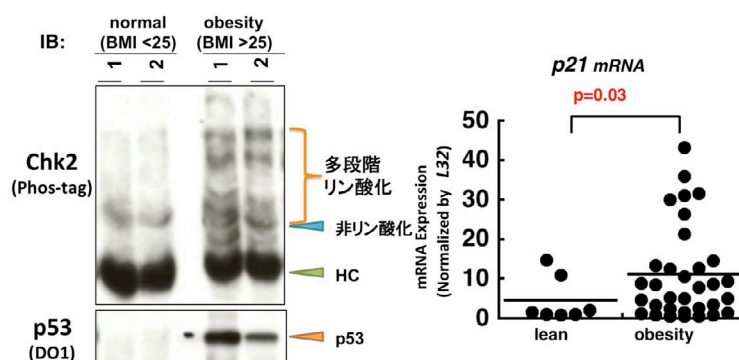


図6. ヒト脂肪組織における Chk2 のリン酸化と p53-p21WAF1 の発現

フォスタグゲルを用いたヒト腎周囲脂肪組織での Chk2 の発現と多段階のリン酸化解析 (左)。ヒト副腎腫瘍摘出時の腎周囲脂肪組織をライゼート化して、western blot 解析により Chk2 のリン酸化をフォスタグゲルで、p53 の発現を SDS-PAGE ゲルで解析した。BMI が<25 の非肥満患者 2 例と BMI>25 の肥満患者 2 例の脂肪組織を用いた比較検討。

非肥満及び肥満患者間における real-time PCR 法を用いたヒト腎周囲脂肪組織での p21WAF1 mRNA 発現の検討 (右)。

さらに、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 p21 mRNA の発現誘導を検討した。

ヒト大動脈血管組織におけるp53-p21WAF1の発現

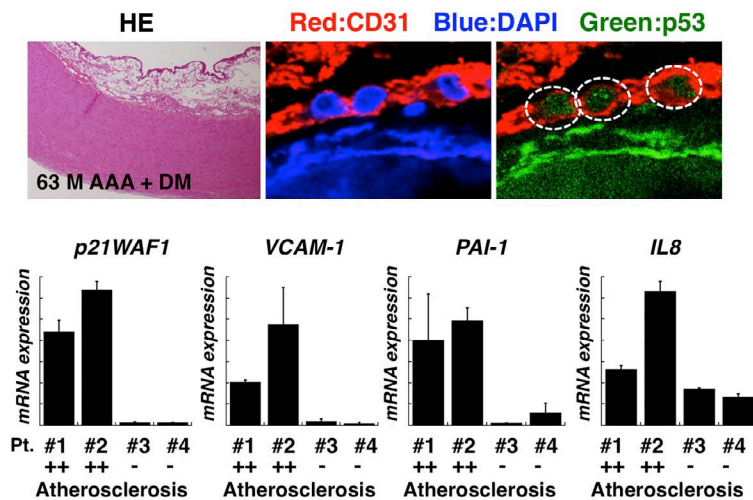


図7. ヒト大動脈血管組織における p53-p21WAF1 の発現

免疫組織染による腹部大動脈留組織における血管内皮細胞での p53 の発現。HE 染色像 (左上)。CD31 マーカー (赤)、DAPI (青)、p53 (緑)。共焦点顕微鏡にて撮影。糖尿病患者由来の胸部/腹部大動脈における real-time PCR を用いた遺伝子発現解析。動脈硬化を認める症例 2 例と動脈硬化を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。対象遺伝子は、*p21WAF1*、*VCAM1*、*PAI1*、*IL8* の mRNA 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。内皮特異的の marker 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 marker である *p21* 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ました。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、糖尿病患者さんの動脈硬化巣における内皮細胞において、p53 活性化にともな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、肥満脂肪組織や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。

最後に、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。

本稿を終えるにあたり、本研究を御支援くださいました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 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. *Nat Commun.*, 7 : 11289-11301, 2016. doi: 10.1038/ncomms11289.