

京都大学	博士（医学）	氏 名	渡部 基信
論文題目	Induction of autophagy in malignant rhabdoid tumor cells by the histone deacetylase inhibitor FK228 through AIF translocation (AIFの核内移行を介したヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 FK228 による、悪性横紋筋肉腫様腫瘍細胞のオートファジーの誘導)		
(論文内容の要旨)			
【目的】Malignant rhabdoid tumor (MRT) は、極めて予後の悪い小児悪性腫瘍の1つである。既存の抗癌剤に対して MRT は抵抗性を示し、新しい治療法が模索されている。ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬はヒストンをアセチル化し、クロマチンの remodeling を誘導する。既にいくつかの HDAC 阻害剤は新しい抗癌剤として臨床応用されている。FK228 (depsipeptide) は環状構造のペプチドで、Class I, Class II の HDAC を強力に阻害する HDAC 阻害剤である。今回 FK228 の MRT に対する抗腫瘍効果とその細胞死誘導機序を in vitro 及び in vivo で解析した。【方法】3種類の MRT 細胞株を用いて、in vitro での caspase 依存性及び非依存性の細胞死について検討した。またヌードマウスに MRT 細胞を皮下移植する事で、in vivo における FK228 の増殖抑制効果を調べた。【結果】WST-1 assay で FK228 は 3 種類全ての細胞株について、細胞増殖抑制効果を示した。FACS 解析では time-dependent に SubG1 分画の増加を認め、Western blotting の結果では caspase-3 及び 8 の活性化がみられた。しかし、pan-caspase inhibitor である z-VAD-fmk 存在下で細胞死は抑制されなかった。電子顕微鏡所見にて FK228 による細胞の形態変化を調べた結果、apoptosis, necrosis さらに細胞質内に autophagosome を形成した autophagy と思われる細胞を認めた。autophagosome を有する細胞は FK228 単剤の時に比べ z-VAD-fmk 存在下ではより増加していた。FK228 処理後の western blotting で LC3-I から LC3-II への移行を確認し、免疫染色では細胞質中の LC3 が autophagosome に集積していた。以上より FK228 が autophagy を誘導することがわかった。また Caspase 非依存性の細胞死が関係していると考えられ精査した結果、FK228 により apoptosis-inducing factor (AIF) の核への移行が誘導されていた。AIF と autophagy の関係について調べ、AIF の siRNA により FK228 による LC3-I から LC3-II への移行が抑えられた。電子顕微鏡所見でも FK228 による autophagy の誘導は control に比べ AIF の siRNA では抑制されていた。FK228 による autophagy と細胞死の関係をみるために、autophagy 阻害薬クロロキンを使用したところ、FK228 による細胞死は増強された。FK228 は in vivo においても dose-dependent な腫瘍の増殖抑制効果を示した。腫瘍の組織標本から、治療群において AIF の核への移行を確認した。電子顕微鏡所見で in vivo でも治療群において autophagy が誘導されていた。さらに免疫電顕の結果より autophagy を認めた細胞内で AIF の核内移行を確認した。【考察】難治性の腫瘍である MRT に対して、HDAC 阻害剤 FK228 による抗腫瘍効果を in vitro 及び in vivo で確認された。FK228 は apoptosis, necrosis さらに autophagy を誘導し、autophagy の機序として、AIF の核への移行が関与していると考えられた。			

（論文審査の結果の要旨） ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害薬である FK228 (depsipeptide) による、Malignant rhabdoid tumor (MRT) に対する抗腫瘍効果とその細胞死誘導機序を解析した。MRT3 種類全ての細胞株について FK228 投与後に SubG1 分画が増加し、apoptosis の誘導を認めた。しかし pan-caspase inhibitor である z-VAD-fmk 存在下で細胞死は抑制されなかった。電子顕微鏡所見にて FK228 による autophagy の誘導を認め、western blotting と免疫染色で autophagosome の形成を確認した。また apoptosis-inducing factor (AIF) の核への移行がみられた。AIF の siRNA により FK228 による autophagy の抑制を認め、autophagy の阻害により細胞死が増強した。<i>In vivo</i> でも、dose-dependent な腫瘍の増殖抑制効果を示した。治療群の腫瘍の組織標本において AIF の核への移行と autophagy の誘導を確認した。 以上の研究は、難治性腫瘍である MRT に対して HDAC 阻害剤の有用性と、autophagy の誘導と AIF の核への移行の関連について初めて報告し、autophagy の制御による新規治療法の可能性を示し、今後の癌治療に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 21 年 2 月 24 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			