

氏 名	立 入 誠 司
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2304 号
学位授与の日付	平 成 13 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Enhanced Cell Killing by Overexpression of Dominant - negative Phosphatidylinositol 3 - kinase Subunit, Δ p85, following Genotoxic Stresses (PI3-K 変異型 p85 (Δ p85) 発現によるシスプラチン・紫外線の殺細胞効果の増強)
論文調査委員	(主 査) 教 授 武 田 俊 一 教 授 藤 堂 剛 教 授 平 岡 真 寛

論 文 内 容 の 要 旨

化学療法や放射線療法の進歩により癌の治療成績の向上が見られるが、治療抵抗性を示す癌も少なくなく、これらの難治性癌に対する治療法の開発が急務である。化学療法や放射線療法は癌細胞の DNA をターゲットにしており、DNA 損傷後に引き起こされるアポトーシスや細胞分裂停止、DNA 修復などの細胞応答を修飾することは、これらの治療法を増感する可能性がある。

phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-k) は、調節サブユニット p85 と触媒サブユニット P110 とから成る二量体である。PI3-k は phosphatidylinositol (PtdIns), PtdIns(4)P, PtdIns(4, 5)P₂ のイノシトール環の D3 位にリン酸基を付加し PtdIns(3)P, PtdIns(3, 4)P₂, PtdIns(3, 4, 5)P₃ に変換する。特に、PtdIns(3, 4)P₂, PtdIns(3, 4, 5)P₃ は細胞分裂、細胞内小胞体輸送、細胞骨格の調節などの様々な細胞機能に関わっていることが明らかになってきている。最近、チロシンリン酸化された増殖因子受容体が PI3-k を介して Akt を活性化し、生存シグナルを伝達することによって細胞をアポトーシスから回避させていることが明らかにされた。P110 との結合部位に欠失がありドミナントネガティブに働く Δ p85 (神戸大学医学部第二内科春日雅人先生より譲与) を用い、PI3-k を阻害することによって、シスプラチンや紫外線 (UV) による DNA 損傷に対する感受性の増強が得られるか否かを検討した。ヒト膠芽腫細胞 T98G に Δ p85 を遺伝子導入し、過剰発現を示すクローンをウェスタンブロット法により同定した。 Δ p85 導入によって、これらの細胞で PI3-k の活性が阻害されていることを確認するために Akt のリン酸化を抗リン酸化 Akt 抗体で評価した。シスプラチン・UV 処理後、ベクターのみ導入した対照細胞 (T98Gv) のでは Akt のリン酸化が認められたが、 Δ p85 を導入した細胞 (T98G Δ 1, Δ 2) では、Akt のリン酸化は観察されなかった。また、シスプラチン・UV に対する感受性を、導入細胞と対照細胞でコロニー形成法により比較した。T98G Δ 1, T98G Δ 2 細胞ではこれらの処理に対して著明な生存率の低下が認められ、増感効果が認められた。また、野生型 p85 を強勢発現させることによって UV によるアポトーシスを抑制できたとの報告があり、シスプラチン・UV 処理後のアポトーシスの誘導を propidium iodide と annexin V で染色し FACS で評価した。対照細胞では一過性にアポトーシスの誘導が観察されたが、 Δ p85 導入細胞では著明なアポトーシスの誘導が得られた。よって Δ p85 によって PI3-k 活性を抑制することによりシスプラチンや UV によるアポトーシスの誘導を増強し、これらへの感受性を増感できたと考えられた。 Δ p85 による増感効果が T98G 以外の細胞でも観察できるか、ヒト膠芽腫細胞 A172 やヒト悪性黒色種細胞 G361 にも Δ p85 を導入し、T98G 細胞と同様にコロニー形成法、FACS 解析を行った。その結果、A1722 や G361 細胞でも Δ p85 によるシスプラチン・石に対する増感が認められ、T98G 以外の細胞でも Δ p85 による増感効果を確認できた。

本研究にてドミナントネガティブに働く Δ p85 を用いて PI3-k 活性を抑制することにより、シスプラチン・UV に対するヒト腫瘍細胞の感受性を増感できることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) は、調節サブユニット p85 と触媒サブユニット p110 とから成る二量体で、最近チロシンリン酸化された増殖因子受容体が PI3-K を介して Akt を活性化し、生存シグナルを伝達することによって細胞をアポトーシスから回避させていることが明らかにされた。

本研究では、P110 結合部位に欠失がありドミナントネガティブに働く Δ p85 を用い、PI3-K を阻害することによって、シスプラチンや紫外線 (UV) に対する感受性の増強が得られるかを検討した。 Δ p85 を導入したヒト膠芽腫細胞 T98G ではシスプラチン・UV に対し著明な感受性化が認められた。また propidiumiodide/annexin V 染色を FACS で解析し、 Δ p85 導入細胞で著明なアポトーシスの誘導を認めた。よって Δ p85 により PI3-K 活性を抑制しシスプラチンや UV によるアポトーシスが增強され、増感できたと考えられた。また、ヒト膠芽腫細胞 A172 やヒト悪性黒色腫細胞 G361 にも Δ p85 を導入し、T98G 細胞と同様の増感効果を確認した。

以上の研究はドミナントネガティブに働く Δ p85 を用いて PI3-K 活性を抑制することにより、シスプラチン・UV に対するヒト腫瘍細胞の感受性を増感できることを明らかにし、癌治療の増感法開発に関する基礎研究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12年12月27日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並び学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。