

論文内容の要旨

論文題目 悪性神経膠芽腫における p27 発現の意義
- PI 3-kinase/Akt pathway の関与

指導教官 桐野高明 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 9 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 成田善孝

序論

悪性神経膠芽腫(glioblastoma)は脳腫瘍全体の約 1/4 をしめ、極めて予後の悪い腫瘍である。Glioblastoma 症例の約 40%では p53 の変異を伴わず、Epidermal growth factor receptor (EGFR)遺伝子の増幅と過剰発現が認められる。特に EGFR の細胞外ドメインの一部分をコードする Exon 2-7 が欠損した delta EGFR と呼ばれる変異型遺伝子が、EGFR 遺伝子が増幅している症例の 1/2 で見られる。Delta EGFR は細胞外ドメインの一部を欠くために、EGF (Epidermal growth factor)や TNF- α の増殖因子刺激がなくとも、自己リン酸化によって tyrosine kinase ドメインが恒常的に活性化されている。我々は U87MG glioblastoma cell line にこの delta EGFR 遺伝子を導入した U87MG delta EGFR cell を確立し、delta EGFR 遺伝子の生物学的活性とその特徴について詳細に研究してきた。その結果 serum free の培養条件下では U87MG parent cell は増殖を停止するが、U87MG delta EGFR cell は増殖し続けることが明らかとなった。またヌードマウスの皮下あるいは脳内にこれらの細胞を移植すると、U87MG delta EGFR cell は、著しい腫瘍増殖速度の亢進を示し、また薬剤に対する apoptosis 抵抗性となる。しかし、その増殖ならびに分裂能亢進のメカニズムは未だ明確には解明されていない。

そこで我々は細胞周期に関連蛋白に着目し、その発現について詳細な検討を行ったところ、U87MG delta EGFR cell においては serum free 培養条件下でも、p27 の発現上昇が見られず、またマウスの脳内に移植しても発現が低いままであることが明らかとなった。p27 は G1/S 期移行の check point として機能し、serum free 培養下や抗癌剤治療などにより細胞分裂が停止する状態では発現が上昇し、CDK-Cyclin 複合体に結合してその酵素活性を抑制し、細胞周期を G1 期に停止させる。さらに様々な癌において、p27 の発現と予後が相関することが報告され、p27 が臨床上も腫瘍増殖および悪性化に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K)は、EGFR の下流に位置し、glioblastoma をはじめ様々な腫瘍で活性が亢進しており、その結果下流のシグナルである Akt のリン酸化がおき、p27 の発現を抑制していることが最近報告された。我々は、U87MG delta EGFR cell においては delta EGFR の下流で PI 3-kinase および Akt が活性化されていること、またこの持続的に活性化された EGFR/PI3-K/Akt pathway により p27 が抑制されるとの仮説を立て検証した。

さらに、CDK-Cyclin kinase assay ならびに RB 蛋白のリン酸化について検討することで、p27 が CDK-Cyclin を抑制することによって細胞周期を調節し、p27 が G1/S 期のチェックポイントとして重要な役割を果たしていることを検証した。

本研究は delta EGFR の下流から p27 の発現までのシグナル伝達経路を明らかにし、p27 がいかに細胞周期を調節しているかを解明することを目的に行った。

方法と結果

培養細胞における細胞周期関連蛋白の発現について

U87MG parent cell および U87MG delta EGFR cell について、10% serum 存在下では、Cyclin、CDK、p21、p27、RB などの細胞周期関連蛋白の発現量には差異は認められなかった。しかし、serum free 培養条件下では、U87MG parent cell では p27 の発現が上昇するのに対し、U87MG delta EGFR cell では、発現量にあまり変化はなかった。また Cyclin A と Cyclin D1 の発現も U87MG delta EGFR cell では高かった。

in vivo 脳内移植腫瘍における細胞周期関連蛋白の発現について

マウス脳内に移植した U87MG delta EGFR tumor は、U87MG parent tumor に比

較して、p27 の発現が低く、また Cyclin A と Cyclin D1 の発現が高かった。

培養細胞の PI 3-kinase 活性と Akt のリン酸化

10% serum 培養条件下においては、細胞間で PI 3-K 活性には差が無かったが、serum free 培養条件下では、U87MG parent cell の PI 3-K 活性が 75% に低下するのに対し、U87MG delta EGFR cell はほとんど変化がなかった。Serum free の培養条件下では、U87MG parent cell はリン酸化型 Akt が減少するのに対し、U87MG delta EGFR cell では変化がなかった。

in vivo 脳内移植腫瘍における PI 3-kinase 活性と Akt のリン酸化

脳内に移植して得られた腫瘍組織についても U87MG delta EGFR tumor は、U87MG parent tumor に比較して、PI 3-K 活性の亢進と、リン酸化型 Akt の発現上昇が認められた。以上のことから *in vitro/in vivo* ともに、U87MG delta EGFR cell においては、delta EGFR の下流で PI 3-kinase および Akt が持続的に活性化されていることが明らかとなった。

EGFR signaling - PI 3-kinase - Akt pathway による p27 の発現調節

U87MG delta EGFR cell においても、serum free の培養後、PI 3-K の特異的な阻害剤である LY294002 で処理して PI 3-K を抑制すると p27 の発現上昇が認められた。Wild type の EGFR を U87MG parent cell に overexpress させた U87MG wt EGFR cell を用いて Akt のリン酸化と p27 の発現について検討した。Serum free で 24 時間培養すると、U87MG wt EGFR cell の Akt のリン酸化 form は減少し、p27 の発現が上昇した。この細胞に 100 ng/ml の EGF を加えて EGFR signaling だけを活性化させると、Akt は速やかにリン酸化され、再び p27 の発現は減少した。しかし、LY294002 で前処置をして同様の実験を行うと、EGF を加えても Akt はリン酸化されず、p27 も高値に保たれていた。さらに U87MG parent cell、U87MG delta EGFR cell に constitutively active Akt を強制発現させると、p27 の発現が低下することが判明した。以上のことから EGFR signaling が PI 3-K/Akt を活性化させ、p27 の発現を抑制することが明らかとなった。

培養細胞における CDK-Cyclin 酵素活性の比較

Serum free の条件下では、U87MG parent cell では CDK2 kinase 活性低下するにもかかわらず、U87MG delta EGFR cell の CDK2 kinase 活性には変化はなく、特に CDK2-Cyclin A 活性を維持していることが明らかになった。CDK4, CDK6 kinase 活性については、serum の有無に関わらず、各細胞間に変化はなかった。また、serum free 条件下でも U87MG delta EGFR cell は高リン酸化型 RB の発現が有意であった。

以上のことから U87 delta EGFR cell においては、p27 の低発現に伴う CDK2-Cyclin A kinase activity が cell cycle を回転させるために重要であることが明らかになった。

in vivo 脳内移植腫瘍における CDK-Cyclin 酵素活性の比較

U87MG delta EGFR tumor は、有意に CDK2 kinase 活性が高かった。一方、CDK4, CDK6 kinase 活性は、明らかな差は認められなかった。RB 蛋白のリン酸化についても、U87MG U87MG delta EGFR tumor では、高リン酸化型 RB が優位であった。

考察

本研究では、U87MG delta EGFR cell において、EGFR の持続的な活性が維持されことによって、PI 3-K の亢進がおき、さらに Akt のリン酸化がおきていることが明らかになった。さらに、Akt のリン酸化により p27 の発現が抑制されることを明らかにした。その結果として、CDK2- Cyclin A の活性が常時維持され、RB 蛋白の高リン酸化（活性化）が起き、細胞の旺盛な増殖につながるものと考えられた。

Glioblastoma をはじめ、様々な癌において、p27 の発現と予後が相関することが報告されており、p27 が臨床上も腫瘍増殖と悪性化に重要な役割を果たしていると考えられる。p27 は glioblastoma 細胞においても G1/S 期移行の check point として機能しており、p27 の発現調節のメカニズムをさらに解析することが、glioblastoma の増殖を抑制し、脳腫瘍の治療に役立つ可能性があると考えられた。