

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 成 田 善 孝

悪性神経膠芽腫 (glioblastoma) は、delta EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) と呼ばれる変異型遺伝子がしばしば認められるが、この導入した U87MG delta EGFR cell は増殖および分裂能亢進を示す。本研究は、そのメカニズムとして細胞周期関連蛋白に着目し、delta EGFR の下流から細胞周期調節までのシグナル伝達経路を解明することを試みたものであり、U87MG parent cell と U87MG delta EGFR cell を *in vitro/in vivo* の条件で比較検討することにより、下記の結果を得た。

1. これらの細胞について、細胞周期関連蛋白の発現量について比較したところ、10% serum 存在下では、各蛋白の発現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、p27 の発現が低いままであった。また、Cyclin A と Cyclin D1 の発現は、U87MG delta EGFR cell では高かった。マウス脳内に移植した *in vivo* の腫瘍についても、U87MG delta EGFR tumor では、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。
2. 10% serum 培養条件下においては、細胞間で Phosphatidylinositol 3-kinase (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 活性が低下し、リン酸化型 Akt が減少するのに対し、U87MG delta EGFR cell では PI 3-K 活性やリン酸化型 Akt の発現には serum 存在下と比べて変化がなかった。脳内に移植して得られた腫瘍組織についても U87MG delta EGFR tumor では、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。
3. U87MG delta EGFR cell を serum free で培養後、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ところ、Serum free で 24

時間培養すると、リン酸化型 Akt は減少し、p27 の発現が上昇した。この細胞に 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 の高発現も保たれていた。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。

4. Serum free の条件下では、U87MG parent cell では CDK2 kinase 活性が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 培養条件下でも U87MG delta EGFR cell は高リン酸化型 RB の発現が有意であった。In vivo においても、U87MG delta EGFR tumor では、有意に CDK2 kinase 活性が高く、RB 蛋白も高リン酸化型 RB が優位であった。このように、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が明かとなった。

以上、本論文から U87MG delta EGFR cell においては、脳内に移植した *in vivo* や、serum free の *in vitro* の条件においても、delta EGFR の持続的な活性が維持されことによって、PI 3-K の亢進ならびに Akt のリン酸化がおき、p27 の発現が抑制されることが明らかとなった。p27 の低発現の結果、CDK2- Cyclin A の活性が常時維持され、RB 蛋白の高リン酸化が起き、細胞の旺盛な増殖につながるものと考えられた。

本研究は、delta EGFR 遺伝子のもつ増殖能亢進のメカニズムの一つとして delta EGFR/PI 3-K/Akt/p27 経路による細胞周期の調節の重要性について解明したものであり、delta EGFR のシグナル伝達の解明に貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。