

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト網膜芽細胞腫 Y79 に対するオルニチン脱炭酸酵素阻害剤の増殖抑制作用およびその機構の解明

指導教官 新家 眞教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 上田 章子

ポリアミンは細胞の増殖、分化など多彩な機能にかかわる低分子の非蛋白性の窒素化合物であり、オルニチンからオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の作用により生成される。代表的なポリアミンとしてプトレシン、スペルミジン、スペルミンがある。ポリアミンと ODC は細胞増殖および細胞周期の制御に重要な役割を果たしていると考えられている。また、様々な癌においてポリアミンと ODC レベルが上昇しており、発癌および癌の浸潤転移においても重要な役割を果たしている。細胞内ポリアミン量は ODC により制御されている。ODC の特異的阻害剤である DL- α -difluoromethylornithine (DFMO) は種々の細胞の増殖、転

移を抑制する。DFMO は p21 や p27 などの CDK インヒビターの発現を増強し、retinoblastoma protein (pRb) の脱リン酸化による細胞周期の G1 期停止を誘導する。

Rb ファミリーと転写因子 E2F ファミリー蛋白質は細胞増殖、細胞周期制御において重要な分子である。Rb 遺伝子は網膜芽細胞腫の原因遺伝子として発見された。1986 年に Dryja と Weinberg のグループにより Rb 遺伝子は初めてクローニングされ、1989 年にはサイクリン依存性キナーゼ (CDK) により pRb はリン酸化され、増殖抑制能を失うことが示された。1991 年には転写因子 E2F が pRb と結合することによりその活性が抑制されることが発見された。さらに p107 が 1991 年に、p130 が 1993 年にそれぞれクローニングされ、pRb と類似した構造をもつことが明らかになり、pRb、p107、p130 が Rb ファミリーと呼ばれるようになった。pRb ファミリー蛋白を過剰発現させると G1 期停止が誘導されることが報告されている。また、最近、p107 の過剰発現により G1 だけでなく S 期における停止もおこることが報告されている。

DFMO は pRb の脱リン酸化と細胞周期の G1 期停止を引き起こすとの報告がある。しかし、pRb を発現していない細胞の増殖および細胞周期に対する DFMO の効果は今までに報告がない。そこで本研究では pRb を発現していないヒト網膜芽細胞種 (Y79) に対する DFMO の増殖抑制効果およびその機構について解析した。

DFMO (0, 1, 5mM) の Y79 細胞の増殖に対する効果をトリパンプルー法で解析したところ、濃度依存的に Y79 細胞の増殖を抑制した。そこで本研究では DFMO 5mM を用いた。DFMO

無添加（コントロール）、5 mM DFMO、5 mM DFMO および 20 μ M プトレシンを添加した 3 群を比較して増殖抑制効果を解析した。72 時間後および 96 時間後に 5 mM DFMO 群の細胞数はコントロールに比して 65.5%, 46.7%と有意に抑制された ($p < 0.01$)。この効果は 20 μ M プトレシン添加により完全に回復し、DFMO の増殖抑制効果がポリアミン特異的に引き起こされていることが示された。生存率はいずれの群においても変化はなかった。すなわち DFMO は細胞死を引き起こさなかった。そこで、DFMO による細胞周期への効果を解析した。48 時間後および 72 時間後に DFMO (5 mM) は細胞周期の G1 期および S 期停止を引き起こした。そこで細胞周期を制御する主要なファミリーである CDK インヒビターおよび pRb ファミリー蛋白の発現の変化を調べた。CDK インヒビターのうち p27 の発現が DFMO により増加していることが確認された。pRb が Y79 において発現していないことをウエスタンブロットで確認した。次に p107 の発現について解析したところ、DFMO は p107 の脱リン酸化を引き起こした。P130 についてはリン酸化、発現量ともに変化はみられなかった。p107 は転写因子 E2F-4、c-Myc、B-Myb と結合してそれらの転写活性を抑制することにより細胞周期を制御すると考えられている。そこで、E2F-4、c-Myc、B-Myb との複合体につき免疫沈降法で調べた結果、p107 と E2F-4 との複合体が DFMO 処理により増加していることがわかった。なお、p107 と c-Myc および B-Myb との複合体は検出できなかった。また、p107 と E2F-1, 2, 3, 5 の結合についても解析したが、いずれの複合体も検出できなかった。さらに、ゲルシフト法にて E2F 結合配列への p107-E2F-4 複合体の結合の増加を確認した。また

E2Fプロモーター活性への効果をレポーターアッセイにより解析したところ、E2Fプロモーター活性がDFMOにより有意に抑制されていることが判明した。また、pRbファミリー蛋白はMCM7/CDC47と結合することでDNA複製を直接抑制するとの報告がある。そこでp107とMCM7との結合を解析した結果、p107とMCM7との複合体はDFMO処理により増加していないことが判明した。

これらの結果より、pRbが発現していないY79細胞においてもDFMOが増殖抑制効果をもち、それが細胞周期のG1およびS期停止により起こっていることを示した。またその細胞周期制御にp107/E2F-4複合体の増加が関与していることを明らかにした。