

論文要旨

応用動物科学専攻

平成 10 年度博士課程進学

氏名 赤堀 正和

指導教官 高橋伸一郎

論文題目 「甲状腺細胞の増殖誘導における phosphatidylinositol 3-kinase 活性化の生理的意義」

インスリン様成長因子 (IGF) は、プロインスリンに構造が類似したペプチドホルモンである。このホルモンやレセプターのトランスジェニックマウス、ノックアウトマウスを用いた *in vivo* 系の解析から、IGF は、動物の正常な発達や成長、代謝制御に必須な役割を果たしていることが明らかにされてきている。一方、培養細胞系を用いた研究から、IGF は多種多様な細胞に対して、増殖誘導、アポトーシス抑制、分化誘導、機能の維持などの活性もつことが示されている。IGF 活性のひとつの特徴として、一般に IGF は単独での生理活性は弱く、他のホルモンや成長因子などの共存下でその生理活性が相乗的に増強されることがあげられる。したがって、IGF の生理的意義を解明するためには、このホルモンと他の因子との相乗作用発現機構の解明を進めることが必須である。

我々の研究グループでは、内分泌細胞におけるトロピックホルモンと IGF-I との相乗作用発現機構について研究を進めている。その過程で、ラット甲状腺由来正常細胞 FRTL-5 では、甲状腺刺激ホルモン (TSH) 長時間処理が、cAMP 経路の活性化を介して、細胞を IGF-I にさらに強く応答するように priming し、結果として、IGF-I 誘導性 DNA 合成が相乗的に増強されることを見出した。この priming 機構について詳細に解析したところ、cAMP 経路の長時間刺激に応じてチロシンキナーゼが活性化され、このチロシンキナーゼにより 125 kDa 新規シグナルタンパク質 (p125) がチロシンリン酸化、チロシンリン酸化された p125 は PI 3-kinase の p85 制御サブユニットと結合することを発見した。そして、このシグナル伝達は、cAMP 経路の刺激による priming に必須であることが明らかとなっている。一方、priming された細胞では、IGF-I 細胞内シグナルの起点である IGF-I レセプターチロシンキナーゼの活性化には影響しないにも関わらず、IGF-I レセプターキナーゼの基質である p66 Shc あるいは IRS-2 の IGF-I 依存性チロシンリン酸化が増強され、このシグナル増強が、IGF-I 誘導性 DNA 合成の増強に重要な役割を果たしていることがわかっている。

そこで本研究では、FRTL-5 細胞を用いて、まず、1) IGF-I の生理活性を増

強する他の因子を検索、これらが、TSH と IGF-I との相乗作用を仲介するオートクリン因子である可能性を検討した。次に、2) cAMP 経路長時間刺激に応答した PI 3-kinase 経路の活性化、IGF-I 短時間刺激に応答した PI 3-kinase 経路の活性化、それぞれの機構および生理的意義について比較検討した。これらの研究成果をもとに、内分泌細胞の増殖において、IGF-I と他の因子の相乗作用発現に果たす PI 3-kinase の新しい役割を解明することを目的に研究を進めた。

1. 甲状腺細胞において IGF-I 増殖誘導活性を修飾する因子の同定

1) IGF-I 増殖誘導活性を修飾する因子の検索

甲状腺細胞では、cAMP 経路を刺激するホルモンや薬剤以外の因子と IGF-I の相乗作用についての報告は数少ない。そこで、IGF-I と異なる細胞内情報伝達経路を活性化し、IGF-I の増殖誘導活性を修飾するような因子の検索を試みた。静止期に同調した FRTL-5 細胞を、IGF-I 存在下・非存在下で種々の因子で処理し、IGF-I により誘導される DNA 合成に及ぼす影響について検討した。その結果、1) 線維芽細胞成長因子 (FGFs) は、IGF-I の増殖誘導活性を相乗的に増強する、2) 形質転換増殖因子(TGF)- β 1 は、IGF-I が誘導する DNA 合成を抑制するが、TSH と IGF-I と共存させると、TSH と IGF-I による相乗作用をさらに増強することを発見した。また、3) 腫瘍壊死因子 (TNF)- α は、TSH と IGF-I の相乗作用を抑制することを明らかとした。

2) TSH と IGF-I の相乗作用を仲介するオートクリン因子の同定

これまでに、FRTL-5 細胞は、FGF-2 や TGF- β 1 を産生することが報告されている。そこで、FRTL-5 細胞における TSH と IGF-I の相乗作用が、FGF-2 や TGF- β 1、あるいは他の因子により仲介されている可能性について検討した。まず、静止期の FRTL-5 細胞を TSH と IGF-I 同時処理し、この際、オートクリン因子を除去するために、4 時間ごとに新しい培地に交換、経時的に DNA 合成量を測定した。その結果、相乗作用の一部が抑制され、TSH と IGF-I の相乗作用発現に、オートクリン因子が関与していることが示唆された。そこで、TSH 処理した FRTL-5 細胞から得られた培養上清を、TSH レセプターを発現しておらず、cAMP と IGF-I の相乗的増殖誘導が起こらないことが明らかとなっているヒト線維芽細胞に、IGF-I とともに添加したところ、IGF-I による DNA 合成誘導が相乗的に増強されることを見出した。また、この培養上清をヘパリンカラムに供したところ、ヘパリンに高親和性を示す画分に IGF-I 生理活性を増強する活性が認められた。これらの結果から、TSH と IGF-I の相乗作用の少なくとも一部は、FGF-2 などのオートクリン因子が仲介している可能性が考えられた。

2. 甲状腺細胞において IGF-I 増殖誘導活性が増強される機構の解明

1) 細胞が IGF-I に応答するように priming される際に活性化される PI 3-kinase 経路

既に述べたように、cAMP 依存的にチロシンリン酸化された p125 は、PI 3-kinase の p85 制御サブユニットと結合することが明らかになっているので、まず、FRTL-5 細胞の cAMP 経路を刺激し、経時的に PI 3-kinase 活性を測定した。その結果、cAMP 経路の長時間刺激に応答して PI 3-kinase が活性化され、PI 3-kinase 経路の下流シグナル分子である Akt および p70 S6 kinase も同様に活性化されることを発見した。また、阻害剤を用いた実験などの結果から、チロシン

リン酸化された p125 との結合により PI 3-kinase が活性化されるという新しい機構が存在すると考えられた。cAMP 依存性 PI 3-kinase 活性化の生理的意義を明らかにするために、cAMP 処理時に PI 3-kinase 阻害剤を添加する、あるいは FRTL-5 細胞に活性化型 Akt 変異体であるミリスチル化 Akt (myl-Akt) をアデノウイルスベクターを用いて発現させるなどの実験を行ったところ、cAMP 経路長時間刺激に応答した PI 3-kinase 活性化は、細胞周期進行に重要な G1 cyclin の誘導や、IGF-I シグナルの増強に重要な p66 Shc のタンパク量増加に重要な役割を果たしていることがわかった。一方、IGF の細胞増殖誘導活性を増強する FGF-2 も、長時間刺激によって PI 3-kinase を活性化し、PI 3-kinase 阻害剤を用いた実験から、この活性は、IGF-I との相乗作用に必須であることを見出した。これらの一連の結果は、IGF-I 依存性 DNA 合成の増強には、PI 3-kinase の長時間活性化が必要であることを示唆している。

2) 細胞が IGF-I に応答して増殖する際に活性化される PI 3-kinase 経路

これまでに、cAMP 長時間前処理により IGF-I レセプターチロシンキナーゼの基質である p66 Shc、IRS-2 の IGF-I 刺激依存的なチロシンリン酸化が増強されることが明らかとなっている。そこで、cAMP 長時間前処理後の IGF-I の細胞内シグナルの変動について解析した。その結果、IGF-I 依存性チロシンリン酸化が変動しない IRS-1 に結合する p85 PI 3-kinase 量、PI 3-kinase 活性が抑制されるのに対して、チロシンリン酸化が増加する IRS-2 に結合している p85 PI 3-kinase 量および PI 3-kinase 活性は増強されることを見出した。このように、IRS-1 と IRS-2 は異なる生理的意義を有することが明らかとなった。PI 3-kinase 阻害剤などを用いた実験結果を併せると、cAMP 経路の長時間刺激によって増強された IGF-I 依存性 IRS-2 チロシンリン酸化は、PI 3-kinase 活性の相乗的増加に反映され、G1 cyclin の増加、p27kip1 などの CDK inhibitor の減少を引き起こし、細胞の G1 期から S 期への進行を可能にすると考えられた。

3) cAMP 経路長時間刺激に応答して活性化される PI 3-kinase と IGF-I 短時間刺激に応答して活性化される PI 3-kinase の比較

最後に、cAMP 経路刺激、IGF-I 経路刺激により、それぞれ活性化される PI 3-kinase の性質を比較検討した。いずれの刺激も、PI 3-kinase の isoform のうち、p110 α を活性化した。次に、超遠心分画法により細胞内小器官を分画し、各画分の cAMP 経路長時間刺激および IGF-I 刺激に応答した PI 3-kinase 活性を測定した。IGF-I 刺激に応答した PI 3-kinase 活性は、細胞膜画分で強く誘導され、同時に high density microsome (HDM) および low density microsome (LDM) 画分でも活性化が認められた。これに対して、cAMP 経路長時間刺激に応答した PI 3-kinase 活性化は、LDM 画分でのみ観察された。また、PI 3-kinase の活性化により産生される PI (3,4,5)P₃ に特異的に認識・結合する PH ドメインと GFP との融合タンパク質、PH-GFP を FRTL-5 細胞に発現後、cAMP 経路刺激もしくは IGF-I 刺激し、PI 3-kinase 活性化により産生される PI (3,4,5)P₃ の細胞内局在について解析した。その結果、IGF-I 刺激時は細胞膜近傍に PH-GFP が局在しているのに対して、cAMP 経路刺激時には細胞膜には局在しないことが明らかとなった。これらの結果は、cAMP 長時間刺激に応答した PI 3-kinase 活性化は、IGF-I 刺激の際と異なる機構および場所で引き起こされ、それぞれの PI 3-kinase の生理的意義が異なることを示している。

総括

ラット甲状腺由来正常細胞 FRTL-5 において、cAMP 経路あるいは FGF 経路の長時間刺激によって、IGF-I 依存的に誘導される DNA 合成が増強されることを見出した。この際、cAMP 経路および FGF 経路の刺激により活性化され、長時間にわたって維持される PI 3-kinase 活性は、細胞周期進行を制御するタンパク質の変動や IGF シグナルの増強に必須であることを明らかにした。一方、これとは異なる機構で、cAMP 刺激に応答した IGF-I 依存性 PI 3-kinase の相乗的な活性化が起こり、この活性化も、細胞周期進行制御タンパク質の変動に寄与していた。このように、本論文では、全く異なる機構で活性化される PI 3-kinase 経路が、それぞれ、cAMP シグナルと IGF-I シグナルの合流点を形成し、内分泌細胞の細胞周期進行に重要な役割を果たしていることをはじめて明らかにすることができた。