

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 赤堀 正和

インスリン様成長因子 (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、機能維持など、広範な生理活性を示すことが知られている。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。本論文は、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したもので、緒論、本論 2 章、総合討論よりなる。

まず、第一章緒論では、本研究の背景および意義を概説し、本研究の目的と本論文の構成について、述べている。

第二章では、甲状腺細胞において IGF-I 増殖誘導活性を修飾する因子に関する研究成果を示している。これまで、甲状腺細胞では、甲状腺刺激ホルモン (TSH) など 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、ラット甲状腺由来正常細胞 FRTL-5 を用いて、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。その結果、線維芽細胞成長因子 (FGFs) が、IGF-I の増殖誘導活性を相乗的に増強する、腫瘍成長因子 (TGF)- $\beta$ 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。これまでに、FRTL-5 細胞は、FGFs や TGF- $\beta$  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- $\beta$ 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結果、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を示すことができた。

第三章では、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詳細について、述べている。申請者が属する研究グループでは、これまでの研究によって、FRTL-5 細胞を TSH 長時間処理すると、cAMP 経路の活性化を介して、細胞が IGF-I にさらに強く応答するように priming され、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ている。更に、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ている。そこで、申請者は、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明らかにした。更に、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 をアデノウィ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。続いて、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、cAMP 経路の長時間刺激によって、インスリンレセプター基質 (IRS) のひとつ、IRS-2 の IGF-I 依存性チロシンリン酸化が増加し、IRS-2 に結合している p85 PI 3-kinase 量が増加、同時に PI 3-kinase 活性も増強されることを見出した。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、p27<sup>kip1</sup> 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。最後に、cAMP 経路刺激あるいは 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 $\alpha$  を活性化したが、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。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細胞内部位で  
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。

第四章総合討論では、ホルモンの長時間刺激に  
応答して活性が低いながら長時間維持される PI 3-kinase と、IGF-I の短時間刺激に  
応答して強く活性化されるが、その活性化が一時的な PI 3-kinase の生理的意義について論じている。

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明らかにしたもので、学術上・応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位として価値あるものと認めた。