

審査の結果の要旨

氏名 六代 範

アポトーシスは核の凝集、断片化とそれに伴う細胞の縮小を特徴とする死の形態であり、この異常は生体の恒常性の破壊につながり、様々な疾病が誘発される。抗癌剤により誘導されるアポトーシスについて考えた際、抗癌剤は細胞の生と死のバランスを崩し、生存シグナルを不活性化することにより抗腫瘍効果を発揮する可能性が考えられる。そこで生存シグナルであるAkt経路に着目して検討を行った。AktはIGF-Iなどの成長因子により活性化されるセリン・スレオニンキナーゼであり、細胞の生存に関与する分子である。実際にAktは細胞質内においてBad や Caspase-9等のリン酸化を介して様々なアポトーシス誘導刺激に対して抑制的に働くことが報告されている。また、同時に活性化されたAktは核内に移行してForkhead転写因子をリン酸化し核外へ移行させ、その転写活性を減弱させることでもアポトーシスシグナルに拮抗することが報告されている。本研究では、Akt活性と抗癌剤耐性との相関関係について検討し、Akt-FKHRを介したTRADD発現機構、およびTRADD発現上昇が抗癌剤の誘導するアポトーシスに関与する可能性について検討した。

1. 抗癌剤耐性とAkt活性との相関

ヒト肺癌細胞 A549 において数種類の抗癌剤処理により、カスパーゼの活性化を伴ってアポトーシスが誘導される。その際に生存因子である Akt のリン酸化が抑制され、Akt のキナーゼ活性が減少することを明らかにした。さらに同細胞において、カンプトテシン(CPT)の用量依存的にカスパーゼの活性化が認められたが、Akt の活性は用量依存的に減少していた。これらの結果より抗癌剤に誘導されるアポトーシスと、Akt のリン酸化及び活性の間に負の相関関係があることが示唆された。Akt の活性減少が抗癌剤により誘導されるアポトーシスに関与することを検討するために、活性化型 Myr-Akt を HT1080 細胞に遺伝子導入し過剰発現させたところ、エトポシド(VP-16)に対して耐性を示すことが認められた。これらの結果より、抗癌剤によるアポトーシスの誘導には PI3K-Akt による生存シグナルの伝達経路の抑制が関与することが明らかになった。

2. PI3K-Akt経路の抑制によるTRADDの発現上昇

Aktの活性減少によるアポトーシスの促進機構を検討するために、PI3Kの特異的阻害剤 LY294002 (LY)によりAkt経路を抑制した際の遺伝子発現量変化をcDNAマイクロアレイ法を用いて既知の4009遺伝子について解析を行った。その結果、PI3K-Akt経路の抑制に伴いTRADD (TNFR I associated death domain)遺伝子の発現が上昇することを見いだした。マイクロアレイのデータを確認するためにA549細胞およびHT1080細胞にLY処理を行った後、RT-PCR法にてTRADD mRNAの発現変化を検討した結果、発現上昇が確認された。Akt下流の転

写因子であるForkhead転写因子FKHRはAktの不活性化に伴い活性化することから、TRADD発現にFKHRが関与している可能性を考え、遺伝子導入による検討を行った。その結果、WT-FKHRによりmRNA及びタンパクのレベルでTRADDの発現上昇が認められた。一方でDNA結合能を欠いたミュータントH215R-FKHRによってはTRADDの上昇が認められなかった。これらの結果よりTRADDの発現機構においてはAktにより負の制御を受けるFKHRが関与することが明らかになった。

3. FKHRによるTRADD発現の制御

FKHRがTRADD遺伝子を直接転写することで発現上昇に関与する可能性を検討するため、TRADDのプロモーター上におけるFHRE(Forkhead transcription factor-responsive element)配列を検索した。その結果、FHRE配列と高いホモロジーを有する部位がTRADDのIntron 1上に一カ所以上存在することが確認された。EMSA法により、TRADDのFHRE配列はWT-FKHRを過剰発現させたHT1080細胞の核抽出物とFKHR-DNA複合体を形成することが確認された。さらにTRADDの発現上昇におけるFKHRの関与を検討するために、TRADD遺伝子のFHRE配列をLuciferase遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミド(x2)を用いて転写活性を測定したところ、WT-およびAAA(active)-FKHRとともに293T細胞に導入することでルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。VP-16はAktの活性を抑制しFKHRを活性化することから、VP-16によるFKHRを介したTRADD遺伝子発現への影響を検討した。レポータープラスミド(x2)をHT1080細胞に導入後、VP-16処理したところ、ルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。これらの結果よりTRADD遺伝子の発現はAkt-FKHRにより制御されており、FKHRがTRADD遺伝子のプロモーター部位に存在するFHRE配列に結合し転写誘導することで、TRADDの発現上昇が起こることが明らかとなった。

4. TRADDの発現上昇に伴う抗癌剤感受性の上昇

TRADDは腫瘍壊死因子TNF経路に関与する分子であり、TNF receptorとCaspase-8とのDISC複合体形成においてアダプターとして働く分子である。これまでにTRADDは過剰発現によりアポトーシスを誘導することが報告されている。Deathドメインを欠いたミュータントTRADDを遺伝子導入し過剰発現させたHT1080細胞はエトポシド耐性を獲得することが認められた。これらの結果より、抗癌剤によるAkt経路の抑制に伴ってTRADD遺伝子の発現が上昇することが、アポトーシスの進行に寄与していることが明らかになった。

以上、本研究では、Aktの活性減少と薬剤感受性との相関関係を明らかにし、Aktの活性が抗癌剤の感受性を検討する上で一つの指標となる可能性を示した。さらにAkt-FKHRを介したTRADDの発現機構を解明し、TRADDの発現上昇が抗癌剤によるアポトーシスに寄与することを明らかにした。これらの成果は生命薬学における新たな興味深い知見であり、博士(薬学)の学位に値するものと判断した。