

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト GH 産生下垂体腺腫細胞における
細胞容積の制御機構

指導教官 藤田 敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成13年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 林 周兵

要旨

[はじめに]

先端巨大症患者を octreotide で治療すると、約 50%の患者で GH 分泌の抑制がみられ、約 60%の患者で下垂体腺腫の縮小が認められる。Octreotide による腫瘍縮小の機構については、Saitoh らが、アポトーシス等による細胞数減少の関与は少なく、腫瘍を構成している細胞それぞれの cell size の縮小によると報告したが、ヒト GH 産生下垂体腺腫細胞における cell size の縮小機構については明らかにされていない。したがって、ヒト GH 産生下垂体腺腫細胞における cell size の制御機構を調べることで腫瘍縮小の機序を知る上で重要であると考えられたため、細胞レベルでの縮小および拡大の様子を透過型電子顕微鏡で観察し、その作用機構の刺激伝達経路を調べた。

[百日咳毒素感受性 G 蛋白質の関与]

GH 産生下垂体腺腫細胞における cell size の制御機構を調べるために、octreotide 負荷試験により GH 分泌低下を認めた先端巨大症患者の下垂体腺腫細胞を初代培養し、透過型電子顕微鏡による観察を行った。臨床用量の octreotide を7日間投与した細胞は、対照と比べて核の面積は有意差を認めなかったが、細胞質の面積が 49~59%に有意に縮小した(図1)

($p < 0.001$)。この octreotide による細胞質の縮小は、3 日毎に百日咳毒素 (PTX) 処理を行った細胞ではみられなくなった (図 2)。これらの結果より、細胞質の縮小に百日咳毒素感受性 G 蛋白質が関与することが明らかとなった。Octreotide による GH 分泌抑制に百日咳毒素感受性 G 蛋白質が関与することは知られており、分泌抑制と細胞縮小の両方に百日咳毒素感受性 G 蛋白質が関与することが明らかとなった。

[p70 S6 kinase、mTOR、PP2A の関与]

G 蛋白質の下流の刺激伝達機構に、cell size の制御に重要な p70 S6 kinase の関与を考えた。p70 S6 kinase はリボソーム蛋白質である S6 をリン酸化する酵素であり、mTOR によって活性化され、mRNA の翻訳を促進することを介して cell size の制御を行う (図 3)。

Octreotide 投与により p70 S6 kinase 活性が変化するか否かをウエスタンブロッティングにより調べた。p70 S6 kinase 活性を調べるために、phospho-p70 S6 kinase 抗体を用いてメンブレンの染色を行った。Octreotide 投与群では p70 S6 kinase 活性が抑制された (図 4) ことから、octreotide による細胞質の縮小に p70 S6 kinase 活性が関与していることが推測された。一方、p70 S6 kinase 抗体を用いてリプローブを行った結果、octreotide 投与群と対照群で差を認めなかった (図 4)。また、百日咳毒素や okadaic acid 1nM の処理により、octreotide による p70 S6 kinase 活性の抑制が消失した (図 4) ことから、octreotide による p70 S6 kinase 活性の抑制に、百日咳毒素感受性 G 蛋白質および PP2A が関与していると考えられた。

Octreotide による p70 S6 kinase 活性の抑制には PP2A が関与していると考えられたが、p70 S6 kinase の上流にある mTOR を介している可能性を考え、phospho-mTOR 抗体を用いて免疫染色を行った。Octreotide を投与すると mTOR 活性は対照に比較して抑制された。Octreotide による mTOR 活性の抑制は、百日咳毒素処理や okadaic acid 1nM による処理でみられなくなった。よって、octreotide による mTOR 活性の抑制に PP2A が関与しており、octreotide の作用点は mTOR である可能性が示唆された。

以上のことから、octreotide は、百日咳毒素感受性 G 蛋白質と PP2A を介して、mTOR および p70 S6 kinase を抑制し、細胞縮小に働くと考えられた (図 5)。

このシグナル伝達経路への mTOR の関与を確認するために、mTOR の inhibitor である rapamycin の投与により mTOR 活性が抑制されるか否かを調べた。Phospho-mTOR 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、rapamycin を投与した細胞では mTOR 活性が対照に比較して抑制された。よって、このシグナル伝達経路に mTOR が関与することが示唆された。

次に、下垂体腺腫細胞の細胞容積の変化を調べるために、透過型電子顕微鏡による観察を行った。Rapamycin を 7 日間投与した細胞は、対照と比較して核の面積は有意差を認めな

かったが、細胞質の面積が 49～52%に有意に縮小した($p<0.001$)。また、臨床用量の octreotide を 7 日間投与した細胞も、対照と比較して核の面積は有意差を認めなかったが、細胞質の面積が 53～54%に有意に縮小した($p<0.001$)。そして、rapamycin と octreotide の両方を 7 日間投与した細胞は、対照と比較して核の面積は有意差を認めなかったが、細胞質の面積が 58～61%に有意に縮小した($p<0.001$)。Rapamycin を投与した細胞において細胞質の縮小がみられたことから、細胞容積の制御機構に mTOR が関与することが明らかとなった。また、octreotide を投与した細胞においても細胞質の縮小がみられたが、rapamycin と octreotide の両方を投与しても、それぞれを単独で投与した場合以上の細胞質の縮小を認めなかったことから、ヒト GH 産生下垂体腺腫細胞における細胞容積の制御機構に、mTOR と p70 S6 kinase が系として関与していると考えられた。

百日咳毒素を 8 日間連日で投与した細胞は、対照と比較して、細胞質の面積が 121～125%に有意に増大した($p<0.001$)。百日咳毒素を 8 日間および臨床用量の octreotide を 7 日間投与した細胞では、対照と比較して、細胞質の面積が 118～125%に有意に増大した($p<0.001$)。このように、百日咳毒素を 8 日間連日で投与した細胞では細胞質の増大を認めたことから、実験で使用した 10%FCS 含有 DMEM に、百日咳毒素感受性 G 蛋白質を介して細胞質の縮小に働く物質が含まれており、その細胞質縮小効果が百日咳毒素処理によって遮断されたために、細胞質が増大した可能性を考えた。

Octreotide による細胞質の縮小は、okadaic acid 1nM を投与した細胞ではみられなくなったことから、octreotide による細胞縮小機構に PP2A が関与していると考えられた。

これらの結果をまとめると、octreotide は、百日咳毒素感受性 G 蛋白質と PP2A を介して、mTOR および p70 S6 kinase を抑制し、細胞縮小に働くと考えられた(図 5)。

[結語]

ヒト GH 産生下垂体腺腫細胞における細胞容積の制御機構に、百日咳毒素感受性 G 蛋白質が関与し、その下流に、PP2A、mTOR および p70 S6 kinase が介在して、細胞容積を制御すると考えられた。

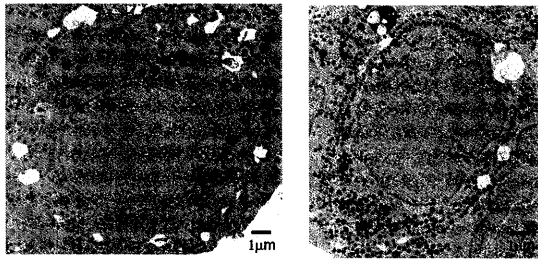


図1. Octreotide投与により細胞質が縮小した。

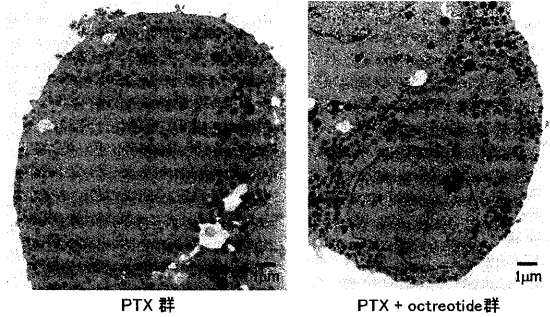


図2. PTX処理により、octreotideによる細胞質縮小効果が減弱した。

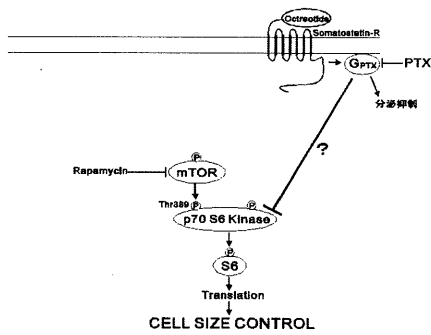


図3. p70 S6 kinaseシグナル伝達機構(その1)

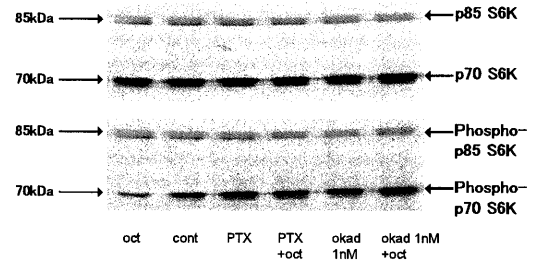


図4. ウェスタンブロットングの結果

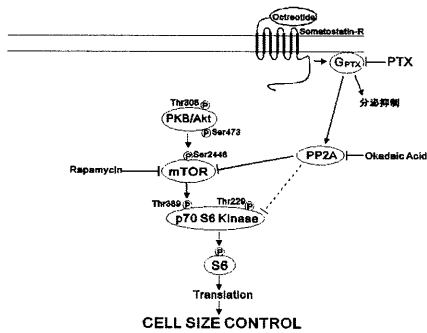


図5. p70 S6 kinaseシグナル伝達機構(その2)