

氏名	しが そういちろう 志賀 壮一郎
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	2020年3月25日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	DNA-PKcs は低栄養状態で活性化し Akt、MST1、FoxO3a、NDR1 を制御する
論文審査委員	主査 教授 細井 義夫 教授 高瀬 圭 教授 武田 賢

論文内容要旨

緒言: 低酸素および低栄養状態のがん細胞は放射線治療に抵抗性を示し、がんの再発に寄与すると考えられているが、低酸素および低栄養状態のがん細胞における放射線抵抗性獲得の分子機序は不明である。これまでに低酸素および低栄養状態で DNA 二重鎖損傷修復酵素である ATM の発現量の亢進が放射線抵抗性の一因であることが示唆されている。本研究では、ATM と同じ PI3K ファミリーに属する DNA-PKcs への低栄養状態の影響を評価し、さらに MST1、転写因子 FoxO3a への影響を評価した。

材料と方法: ヒト神経膠芽腫細胞株 T98G を、血清を添加しないグルコース濃度 0g/L、1g/L、4.5g/L でそれぞれ 2 時間培養し、蛋白質を回収してウエスタンブロット法により DNA-PKcs の発現量およびリン酸化の比較を行った。次に、グルコース濃度 0g/L または 1g/L の培地で T98G を培養し、DNA-PKcs 阻害剤 NU7026 または Akt 阻害剤 Akt inhibitor VIII による処理を行い、蛋白質を回収し、Akt、MST1、FoxO3a の発現およびリン酸化をそれぞれ評価した。さらに、siRNA により DNA-PKcs または Akt の発現を抑制し、同様に各蛋白質の発現を評価した。低栄養状態における MST1 の機能を評価するため、siRNA による DNA-PKcs または Akt をノックダウンした場合の NDR1 のリン酸化を評価した。また FoxO3a のリン酸化への AMPK の関与を調べるため、DNA-PKcs の阻害による AMPK α のリン酸化への影響を評価した。

結果: グルコース濃度 1g/L または 4.5g/L での培養と比較し、低栄養状態 (グルコース濃度 0g/L) での培養によって DNA-PKcs のリン酸化の亢進が見られた。低栄養状態で DNA-PKcs、Akt、MST1、FoxO3a のリン酸化が見られた。NU7026 の処理または siRNA による DNA-PKcs の発現抑制により、低栄養状態における Akt、MST1、FoxO3a のリン酸化は抑制された。また、Akt inhibitor VIII の処理または siRNA による Akt の発現抑制により、低栄養状態における MST1、FoxO3a のリン酸化は抑制された。低栄養状態でみられた NDR1 のリン酸化は DNA-PKcs または Akt の発現抑制により抑制された。低栄養状態でみられた AMPK α のリン酸化は NU7026 による DNA-PKcs の阻害では抑制されなかった。

考察: DNA-PKcs/Akt の高発現および活性化は放射線抵抗性に関与することが知られていることから、低栄養状態のがん細胞では DNA-PKcs/Akt の活性化により放射線抵抗性を獲得している可能性が考えられた。低栄養状態で活性化した DNA-PKcs/Akt は、MST1、FoxO3a を活性化することが示唆された。DNA-PKcs/Akt により活性化された MST1 は下流の NDR1 をリン酸化することが示唆された。また低栄養状態における DNA-PKcs の阻害では AMPK α のリン酸化は抑制されず、FoxO3a の Ser413 のリン酸化が AMPK 非依存性であることが示唆された。

(書式12)

結論: 本研究により DNA-PKcs は低栄養状態で活性化し、Akt、MST1、FoxO3a、NDR1 を制御することが示唆された。低栄養状態のがん細胞における DNA-PKcs の活性化が放射線抵抗性獲得において重要な機能を持つことが示唆されることから、本研究の成果は低栄養状態のがん細胞における放射線抵抗性獲得の分子機序解明の一助となると考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題目 DNA-PKcs は低栄養状態で活性化し Akt, MST1, FoxO3a, NDR1 を制御する
所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 放射線生物学分野
学籍番号 B5MD5141 氏名 志 賀 壮 一 郎

本論文は、低栄養状態における放射線抵抗性の分子メカニズムの解明を目的として、ヒト神経膠芽腫由来 T98G 細胞を用いて研究を行ない、低栄養状態では DNA2 重鎖切断修復酵素である DNA-PKcs が活性化し、Akt, MST1 の活性化を介して FoxO3a および NDR1 を活性化することを初めて明らかにしている。本論文は、志賀壮一郎氏を筆頭著者として Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC) に既に掲載されている (Shiga S, Murata Y, Hashimoto T, Urushihara Y, Fujishima Y, Kudo K, Sonohara Y, Kurusu M, Takeda K, Jingu K, Hosoi Y., DNA-PKcs is activated under nutrient starvation and activates Akt, MST1, FoxO3a, and NDR1. BBRC 521: 668-673, 2020)。

第一次審査は、副査第一の高瀬圭教授（放射線診断学分野）、副査第二の武田賢教授（放射線治療学分野）、審査委員の武藤哲彦准教授（生物科学分野）並びに松下晴雄准教授（放射線腫瘍学分野）を審査委員として、令和元年 11 月 28 日に開催された。第一次審査に関する意見書として「合格、但し修正が必要で、最終審査は書面審査で行なう。」との評価を受けた。同意見書では 38 項目の修正意見が付された。令和元年 12 月 12 日に、指導教授より医学系研究科博士課程最終審査の書面審査申請書が申請され、副査第一の高瀬圭教授、副査第二の武田賢教授により書面審査が行なわれた。高瀬教授からは「合格に値するが、論文に修正必要箇所がある。」との評価を受け、4 項目のコメントを受けた。武田教授からは「合格に値するが、論文に修正必要箇所がある。」との評価を受け、2 項目のコメントを受けた。これらのコメントに従って論文は修正され、修正は十分にコメントを反映しているものと判断された。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。