

氏名	坂本 康寛
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 22 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	ヒト悪性膠芽腫細胞株 SF126 の p53 依存性細胞増殖抑制におけるオートファジーによる細胞死の寄与
論文審査委員	主査 教授 石岡 千加史 教授 張替 秀郎 教授 大内 憲明

論文内容要旨

アポトーシスとオートファジーによる細胞死は、ともにプログラム細胞死に含まれ、細胞生存、成長、発達、腫瘍形成において重要な役割を担っている。最近では、アポトーシスの経路を標的とする分子標的薬が開発され、臨床試験が進められている。また、既知の化学療法剤や分子標的薬の中に、オートファジーの経路を修飾するものが存在することも明らかになってきた。がん抑制遺伝子産物 p53 は、DNA 損傷や低酸素状態などの様々なストレスにより発現誘導され、転写依存的にアポトーシスやオートファジーを誘導する遺伝子の発現を亢進する。また、転写非依存的に、細胞質でミトコンドリアに作用しアポトーシスを誘導する一方で、オートファジーを抑制するとされる。しかし、p53 が引き起こす細胞増殖抑制において、アポトーシスとオートファジーによる細胞死がどの程度寄与しているか、また、p53 のアポトーシス誘導能とオートファジー誘導能は機能的に依存するのか、独立するのかは未解明である。私は、これらを解明すべく、野生型 p53 を doxycycline (以下 Dox) 存在下で安定発現する SF126 株を作成し、オートファジー阻害剤 (3MA) とアポトーシス阻害剤 (VAD) を用いて、野生型 p53 が誘導する細胞増殖抑制において、アポトーシスとオートファジーによる細胞死がどの程度寄与しているかを検討した。更に、野生型 p53 よりもアポトーシス誘導能が強い S121F 変異体や空間的配置が異なる R306G 変異体を用いて、オートファジー誘導能について解析し、野生型 p53 と比較することで、アポトーシス誘導能とオートファジー誘導能の機能的独立性の有無について検討しようと考えた。

SF126 細胞に野生型 p53 を発現させると、アポトーシスとオートファジーが誘導されて、細胞増殖が抑制された。3MA は p53 により誘導されたオートファジーを抑制するとともに、S 期分画を回復し、細胞増殖抑制を解除した。一方、VAD は p53 により誘導されたアポトーシスを抑制し、細胞増殖抑制を減弱したが、3MA に比べて、その効果は弱かった。このことから、野生型 p53 による細胞増殖抑制は、アポトーシスとオートファジーによる細胞死で構成され、オートファジーによる細胞死が優位であることが示された。

S121F は野生型 p53 に比べてアポトーシス誘導能が圧倒的に高かったが、オートファジー誘導能は同程度であった。3MA は S121F によるオートファジーを抑制したが、細胞増殖抑制を解除できなかった。これらより、p53 によるアポトーシス誘導能とオートファジー誘導能は機能的に独立していることが示唆された。その制御経路を推測するに、アポトーシスとオートファジーの誘導は、別々の p53 下流遺伝子産物で制御され、それらの転写活性化能の強さと相関する可能性が考えられる。しかし実際には、S121F により誘導された p53 下流遺伝子産物 MDM2、p21WAF1、BAX および 14-3-3 σ の発現は、野生型 p53 よりも弱く、下流遺伝子の転写活性化能

とアポトーシス誘導能は相関しなかった。一方、オートファジーの誘導に関しては、オートファジー関連遺伝子産物 SESN2 の発現と相関する可能性も否定できなかった。p53 のオートファジー誘導能と下流遺伝子の転写活性化能が相関するかどうかは、今後の研究により明らかにされるものと期待する。

細胞質局在型の R306G は、過去の報告からアポトーシス誘導能が強いと予想されたが、実際は弱かった。その理由として、細胞質でのアポトーシス誘導には、他の p53 下流遺伝子産物の協力が必要だが、R306G はこれらの転写活性化能が弱い可能性が考えられた。また、細胞質の p53 はオートファジーを抑制するとの報告から、細胞質局在型の R306G は、オートファジーを抑制すると予想されたが、実際は逆に誘導した。この理由として、わずかながら核に存在する R306G の転写依存的オートファジー誘導が、細胞質に存在する R306G の転写非依存的オートファジー抑制を凌駕している可能性が考えられた。さらに、細胞質でのオートファジーの抑制には、アポトーシスの場合と同様に、他の p53 下流遺伝子産物の協力が必要で、R306G はその転写活性化能が弱い可能性が考えられた。

本研究において、私は、ヒト悪性膠芽腫細胞株 SF126 において、野生型 p53 よる細胞増殖抑制はアポトーシスとオートファジーによる細胞死から構成され、オートファジーによる細胞死が優位であることを明らかにした。これは、野生型 p53 を発現している腫瘍ではアポトーシス同様に、オートファジーを誘導する治療が有効である可能性を示唆し、また、p53 の変異の有無がこの治療のバイオマーカーとなる可能性を連想させた。さらに、アポトーシスに耐性化した腫瘍の治療戦略として、オートファジーによる細胞死を誘導することが有用である可能性が考えられた。

審査結果の要旨

博士論文題名 ヒト悪性膠芽腫細胞株 SF126 の p53 依存性細胞増殖抑制におけるオートファジーによる細胞死の寄与

所属専攻・分野名 内科学専攻・癌化学療法研究分野

氏名 坂本 康寛

申請者・坂本康寛君が提出した標記の博士論文は、がん抑制タンパク質 p53 の発現によって引き起こされるヒト悪性膠芽腫細胞株の細胞増殖抑制について、アポトーシスとオートファジーによる細胞死の視点から解析したものである。従来の研究が p53 の細胞増殖抑制における細胞死はアポトーシスに特化して解析されていたことから、p53 によるヒト悪性膠芽腫細胞株の細胞死誘導機能にアポトーシスのみならずオートファジーが関与することを示す本論文は、新規の知見を含む研究であると評価できる。

具体的には、申請者は p53 が引き起こす細胞増殖抑制において、アポトーシスとオートファジーによる細胞死がどの程度寄与しているか、また、p53 のアポトーシス誘導能とオートファジー誘導能は機能的に依存するのかについて検討した。その結果、野生型 p53 による細胞増殖抑制は、アポトーシスとオートファジーによる細胞死で構成され、オートファジーによる細胞死が優位であることを示した。一方、p53 下流遺伝子産物を調べることにより、アポトーシスとオートファジーによる細胞死が p53 下流遺伝子産物の転写活性化能かについても検討がなされたが、アポトーシスとオートファジーが特定の p53 下流遺伝子の転写活性化には依存しているかどうかについては明らかにはできなかった。

本研究は、p53 によりオートファジーを誘導するがん治療の可能性を示すものであり、今後解明すべき課題を複数提示しているものの、さらなる研究の発展が期待できる。

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。