

平成21年 2月

松岡さおり 学位論文審査要旨

主 査 井 藤 久 雄
副主査 原 田 省
同 汐 田 剛 史

主論文

Involvement of thioredoxin-binding protein 2 in the antitumor activity of CD437

(CD437の抗腫瘍効果におけるthioredoxin-binding protein 2 の関与)

(著者：松岡さおり、土谷博之、坂部友彦、渡邊祐実、星川淑子、栗政明弘 板持広明、
原田省、寺川直樹、増谷弘、淀井淳司、汐田剛史)

平成20年 Cancer Science 99巻 2485頁～2490頁

学 位 論 文 要 旨

Involvement of thioredoxin-binding protein 2 in the antitumor activity of CD437 (CD437の抗腫瘍効果におけるthioredoxin-binding protein 2 の関与)

以前に著者らは、合成レチノイドの一つであるCD437が、卵巣癌細胞に対して小胞体 (ER) ストレスを介してアポトーシスを誘導することを報告した。しかし、その他の作用機序も関与することも示唆されている。本研究では、CD437がヒト卵巣癌由来細胞株SKOV3に対して、細胞内カルシウム濃度に依存してthioredoxin-binding protein 2 (TBP2) の発現を亢進させることで、アポトーシスを誘導することを明らかにした。これまでTBP2は thioredoxin (TRX) に結合しその作用を抑制すると報告されていた。一方、TRXはapoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) に結合し、ASK1を介したアポトーシス誘導を抑制すると報告されている。本研究においては、CD437によるTBP2の誘導後に、TBP2とTRXの結合と、さらにTRXからASK1の解離が観察された。また、これと一致して、ASK1並びにその下流の分子c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化を認めた。そこで、siRNAを用いてTBP2の発現誘導を抑制すると、SKOV3のCD437に対する感受性は有意に低下した。以上より、SKOV3に対するCD437のアポトーシス誘導機序にTBP2が重要な役割を果たしていることが示唆された。

方 法

ヒト卵巣漿液性腺癌細胞株SKOV3を用い検討した。SKOV3の細胞生存率はWSTアッセイにより定量した。遺伝子発現量は、RT-PCR法およびウエスタンブロット法により評価した。細胞内カルシウムイオン濃度に関する検討はカルシウムキレーターBAPTAおよび蛍光カルシウムプローブFluo-8を用いて行った。蛋白質相互作用は免疫沈降法により確認した。

結 果

SKOV3をCD437処理すると細胞生存率は低下した。さらにcleaved PARPの発現が亢進したことから、CD437がSKOV3のアポトーシスを誘導することを確認した。同様に時間依存的にTBP2の発現亢進が認められた。またFluo-8を用いた検討では、細胞内カルシウムイオン濃度がCD437処理後30分と60分で一過性の増加を示した。この一過性の上昇はBAPTA添加により消失し、さらにTBP2 mRNA発現誘導も抑制されたことから、CD437によるTBP2の発現誘導は、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇に依存することが示された。更に、CD437はASK1

およびJNKを、時間依存的・濃度依存的に活性化したが、TBP2をノックダウンするとASK1は活性化されなかった。免疫沈降法によって、通常状態ではTRXはASK1と結合しているが、CD437処理によりTRXはASK1から解離しTBP2と結合することが示された。以上のことから、CD437によるアポトーシス誘導の機序の一つに、細胞内カルシウムイオン濃度に依存したTBP2の発現誘導と、それに続くTRXの抑制およびASK1・JNKの活性化という経路が示された。

考 察

CD437はERストレスを介したアポトーシス誘導を示すが、その他の機序の存在が示唆されていた。本研究では、CD437がTBP2の顕著な発現亢進を示すことに着目し、CD437のアポトーシス誘導における分子機序について検討した。その結果、CD437はTBP2発現誘導し、さらにはASK1-JNK経路を介してアポトーシスを誘導していることが示された。

CD437はレチノイン酸受容体(RAR) γ の選択的アゴニストとして開発された。しかしその作用機序、特にアポトーシスに導くメカニズムはRAR非依存的であると示唆されている。今回の研究では、CD437は優性抑制変異型RAR遺伝子を発現したSKOV3に対し効率的に生存細胞数を減らしアポトーシスへと導くことを確認している。以上より、SKOV3細胞に対するCD437の抗腫瘍作用は、RAR γ 非依存的な経路であると示唆される。

本来TBP2はビタミンD₃によって発現誘導される遺伝子として同定された。しかしその後の研究で、TRXと選択的に結合することで細胞内酸化還元反応を調節してその作用を抑制することが示され、その機能はビタミンD₃の生理学的特性と無関係と報告されている。さらに、機能喪失型変異TBP2遺伝子を持つマウスでの肝発癌や、逆にTBP2の強制発現による細胞周期の停止とアポトーシス誘導が報告されている。また、TBP2は、酸化ストレスや薬物など様々なストレスによって発現が誘導される。今回、CD437によるTBP2誘導において、細胞内カルシウムイオン濃度への依存性を明らかにしたが、TBP2の転写調節機序の詳細は不明であり、今後さらなる研究が必要である。

結 論

CD437が卵巣癌細胞に対しTBP2経路を介して抗腫瘍作用を示し、有用な治療薬となる可能性が示唆された。