

平成21年 3月

渡邊祐実 学位論文審査要旨

主 査 清 水 英 治
副主査 原 田 省
同 汐 田 剛 史

主論文

CD437 induces apoptosis in ovarian adenocarcinoma cells via ER stress signaling

(CD437は小胞体ストレスシグナルを介して卵巣腺癌細胞のアポトーシスを誘導する)

(著者：渡邊祐実、土谷博之、坂部友彦、松岡さおり、明地雄司、藤本由佳、山根恵太郎、池田礼美奈、西尾れん、寺林慶、石井恭子、権田一絵、松見吉朗、An Afida Ashla、岡本秀治、田窪千子、富田暁子、星川淑子、栗政明弘、板持広明、原田省、寺川直樹、汐田剛史)

平成20年 Biochemical and Biophysical Research Communications 366巻 840頁～847頁

学 位 論 文 要 旨

CD437 induces apoptosis in ovarian adenocarcinoma cells via ER stress signaling (CD437は小胞体ストレスシグナルを介して卵巣腺癌細胞のアポトーシスを誘導する)

卵巣癌は化学療法が奏効する腫瘍であり、現在、パクリタキセルとカルボプラチン併用療法の導入により、完全寛解率は改善されている。しかしながら、長期生存率は依然として不良であり、抗腫瘍効果の良好な新たな薬剤の開発が待たれている。

合成レチノイドCD437は、多様な癌細胞株に対して強力な抗腫瘍作用を発揮し、卵巣癌もそのひとつである。CD437はレチノイン酸受容体(RAR) γ 選択的なアゴニストとして作用し、RAR依存性経路を活性化することが知られている。しかしながら、近年の研究から、CD437による抗腫瘍作用にはRARを介さない経路の存在が示唆されている。本研究では、小胞体ストレスに焦点を当て、卵巣癌由来細胞株SKOV3を用い、CD437の抗腫瘍作用機序の検討を行った。その結果、CD437は、卵巣腺癌細胞株SKOV3において、小胞体(ER) ストレストランスデューサーであるPERKとIRE1 α を活性化することで、CHOP、Bip、GADD34の発現を亢進させ小胞体ストレスを引き起こすことを示した。さらに、siRNAを用いてCHOPの発現をノックダウンしたところ、SKOV3細胞に対するCD437の増殖抑制作用は有意に減弱した。以上より、CD437の卵巣癌細胞株におけるアポトーシス誘導メカニズムの一つとして、ERストレスの重要性が示唆された。

方 法

卵巣癌由来細胞株SKOV3細胞を使用し、CD437を0.5-2 μ Mの濃度で、24-48時間処理した。薬剤処理後の細胞内mRNA発現量はreal-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)法にて、蛋白質発現はウエスタンブロット法により検討した。アポトーシスはHoechst33258染色および活性型Caspase-3をウエスタンブロット法により評価した。またXBP-1 mRNAのスプライシングは、RT-PCR後8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて解析を行った。

結 果

CD437はSKOV3に対してアポトーシスを惹起し、さらに小胞体ストレスによって発現誘導される遺伝子(CHOP、GADD34、BiP/GRP78)のmRNA量を有意に増加させた。このときCD437

は、小胞体ストレストランスデューサーであるPERK、IRE-1 α の活性化と、さらにその下流分子の活性化（eIF2 α のリン酸化、ATF4蛋白質発現、XBP-1 mRNAスプライシング）を誘導した。しかし、もう一つの小胞体ストレストランスデューサーであるATF6の活性化は観察されなかった。さらにCHOPに対するsiRNAを細胞に導入したところ、CD437に対する感受性の低下が認められた。

考 察

これまでの報告からCD437は、RAR以外の経路からの遺伝子発現を介してアポトーシスを誘導することが示唆されている。今回の研究の結果から、卵巣癌細胞株におけるCD437の新たな作用機構として、小胞体ストレスの亢進を介する経路が明らかとなった。一般に、小胞体ストレスはPERK、IRE1、ATF6の3つのトランスデューサーを介してシグナル伝達されることが知られている。これらによって最終的に活性化される転写因子ATF4、XBP1、p60ATF6は核内に移行してamino acid regulatory element (AARE)、ER stress response element (ERSE)に作用し、CHOPの発現を誘導する。本研究において、siRNAを用いてCHOPをノックダウンすると、SKOV3におけるCD437の増殖抑制作用が阻害された。このことから、SKOV3においても、CHOPがCD437誘導アポトーシスに重要な役割を果たしていることが示された。本研究では、SKOV3においてCD437がPERKとIRE1の経路を活性化することが明らかとなったが、ATF6の活性化は認められなかった。またこれと同様に、CD437で処理した他の卵巣癌細胞株においても、CHOPの発現増強が認められない細胞株もあった。これらの結果より、CD437は卵巣腺癌細胞株において、明らかに小胞体ストレスを引き起こすが、その誘導経路は細胞株間で異なっている可能性があり、今後さらなる研究が必要である。

結 論

合成レチノイド CD437の卵巣癌細胞株におけるアポトーシス誘導メカニズムの一つとして、小胞体ストレスの重要性が示唆された。