

氏名	こだに まさひろ 小谷昌広
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第509号
学位授与年月日	平成17年 3月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Suppression of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway is a determinant of the sensitivity to a novel histone deacetylase inhibitor, FK228, in lung adenocarcinoma cells (肺腺癌細胞において phosphatidylinositol 3-kinase/Akt 経路の抑制が新規 histone deacetylase 阻害剤 FK228 への感受性を決定する)
学位論文審査委員	(主査) 村脇義和 (副査) 應儀成二 清水英治

学位論文の内容の要旨

新規 histone deacetylase (HDAC) 阻害剤である FK228 は強力な抗腫瘍活性を有し、各種遺伝子の転写調節、細胞周期阻害、アポトーシスに関与することが知られている。そのメカニズムとして FK228 のシグナル伝達因子に対する効果検討されているが、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) /Akt 経路への作用の詳細は未だ明らかでない。そこで今回、肺腺癌細胞における FK228 の細胞障害性の評価および Akt に関係したシグナル伝達経路への作用について検討した。本研究の目的は以下の3点である: 1) FK228 の細胞障害性を肺腺癌細胞株にて評価する。2) PI3K/Akt 経路抑制の有無を FK228 高感受性株および低感受性株それぞれで評価する。3) FK228 低感受性株における FK228 と PI3K/Akt 経路を抑制する薬剤との併用効果を明らかにする。

方法

肺腺癌細胞株 A549, PC14 を用いて、FK228 による細胞障害性とアポトーシス誘導能を MTT アッセイおよび抗 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 特異抗体を用いたウエスタンブロット法により検討した。肺癌細胞における Akt の発現およびリン酸化への影響、さらに PI3K/Akt 経路の下流の基質である glycogen synthase kinase (GSK)-3 β の発現およびリン酸化への影響をそれぞれみるため、それらに対する特異抗体を用いてウエスタンブロット法を施行した。さらに、FK228 低感受性株である PC14 細胞において FK228 と PI3K/Akt 経路を抑制する薬剤 (LY294002, UCN-01) をそれぞれ併用処理し、アイソボログラム解析およびフローサイトメトリーを施行し、細胞障害性およびアポトーシスを評価した。

結 果

肺癌細胞株 A549 および PC14 における FK228 48 時間処理による 50% 増殖阻害濃度 (IC₅₀) は MTT アッセイにより作成した濃度反応曲線より求めた。FK228 に対する IC₅₀ は、それぞれ 5nM, 20nM であり A549 細胞の方が PC14 細胞に比べ約 4 倍感受性が高かった。またウエスタンブロット法では FK228 20nM 24 時間処理により、A549 細胞ではアポトーシスを反映する PARP の断裂がみられたが、PC14 細胞では認められなかった。以上より A549 細胞を FK228 高感受性株、PC14 細胞を低感受性株とした。

次に、A549 細胞および PC14 細胞において FK228 24 時間処理による、Akt 発現、Akt リン酸化、Akt 下流基質である GSK 発現、GSK リン酸化を検討した。A549 細胞においては Akt, GSK 蛋白そのものの発現に変化は見られなかったが、Akt リン酸化、GSK リン酸化とも FK228 2nM 以上で濃度依存的にその抑制が認められた。一方、FK228 は PC14 細胞において Akt, GSK に関して蛋白レベルおよびリン酸化いずれにも影響を与えなかった。

FK228 の PI3K/Akt 経路を介した細胞障害性を明らかにするために、PI3K 阻害剤 LY294002 の FK228 低感受性株である PC14 細胞の Akt リン酸化状態への効果を検討した。LY294002 2 時間処理で濃度依存的に Akt の脱リン酸化がみられた。FK228 と LY294002 の PC14 細胞に対する併用効果を検討するために、アイソボログラム解析を行うと FK228 と LY294002 の間に相乗作用が認められた。フローサイトメトリーでの Sub-G₁ 期細胞比率や抗 PARP 特異抗体によるウエスタンブロット法による評価でも、これらの薬剤によるアポトーシス誘導能の相乗効果が認められた。PI3K/Akt 阻害剤の UCN-01 と LY294002 の間にも相乗作用が認められた。

考 察

HDAC 阻害剤は細胞増殖や細胞周期に関与する種々の分子の転写制御により、抗腫瘍活性を示し、現在新規分子標的治療薬として臨床への応用が期待されている薬剤である。肺癌領域における分子標的治療薬の問題点として薬剤耐性の誘導がある。本研究では FK228 への高感受性肺癌細胞株である A549 細胞と低感受性株である PC14 細胞の FK228 高感受性株の PI3K/Akt 経路のシグナル伝達分子の特徴を明らかにした。すなわち、FK228 処理により A549 細胞では Akt 経路の活性抑制がみられ、PC14 細胞ではみられなかった。しかし、PC14 細胞を Akt 阻害剤で処理することにより FK228 に対する感受性が高まり、FK228 の作用発現に PI3K/Akt 経路が重要な役割を担うことが示唆された。また、FK228 が効果を示さない肺癌患者に対して、既に臨床応用されている UCN-01 を前投与することが薬剤耐性克服に有用であると考えられた。

結 論

肺癌細胞において PI3K/Akt 経路のシグナル抑制が新規 HDAC 阻害剤 FK228 の抗腫瘍効果を高める可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は肺腺癌細胞株を用い新規 HDAC 阻害剤 FK228 の細胞障害性の評価および Akt に関係したシグナル伝達経路への作用について検討したものである。その結果、FK228 高感受性株の A549 細胞において FK228 による Akt の活性抑制を認めた。FK228 低感受性株である PC14 細胞においてこの作用は認められなかったが、Akt 活性を抑制する薬剤を併用処理することで細胞障害性およびアポトーシスの増強が認められた。これらの結果は PI3K/Akt 経路の活性化状態が肺癌細胞の FK228 に対する感受性を規定する因子である可能性を示唆するものである。本論文の内容は、肺癌治療において PI3K/Akt 経路抑制の重要性を示唆するものであり、明らかに学術水準を高めたものと認める。