

氏 名 ゆのき たつや
柚木 達也

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 160 号

学位授与年月日 平成 27 年 3 月 24 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 Enhancements of hyperthermia sensitivity by novel molecular targets of heat shock transcription factor 1-related proteins in human cancer cells
(ヒートショック転写因子 1 関連タンパク質を標的としたがん温熱療法における細胞増殖抑制および殺細胞効果の増強)

論文審査委員

(主査) 教授 二階堂 敏雄
(副査) 教授 足立 雄一
(副査) 教授 井村 譲二
(副査) 教授 清水 忠道
(指導教員) 教授 近藤 隆

論文内容の要旨

[目的]

温熱を用いた治療法であるハイパーサーミア(HT)は、様々な腫瘍に適用され、その有効性が認識されている。しかしながら、HTの問題点のひとつは、がん細胞自身が温熱抵抗性を有していることであり、それはHTの効果を減弱させる。その温熱抵抗性の獲得には、少なくとも一部にヒートショックプロテイン(HSPs)が関与することが知られている。HSPsはシャペロン機能を有し、様々なストレスに対して細胞保護因子として働いている。HSPsは、主にヒートショック転写因子1(HSF1)により、転写誘導されている。そこで、今回、HSF1関連タンパク質である polo-like kinase 1(PLK1)と Bcl-2 associated athanogene 3(BAG3)に焦点をあてた。PLK1はHSF1の活性化に関与し、がん細胞の増殖や生存に重要な働きを示すといわれている。また、BAG3は分子シャペロンタンパク質として中心的な役割を果たすHSP70のコシャペロンであり、ストレス誘導性の抗アポトーシスタンパク質でもある。それらのHSF1関連タンパク質の機能阻害により、HTの細胞致死効果が増強されるか否かを検討した。

[方法と材料]

細胞はヒト口腔扁平上皮がん細胞株(HSC-3)とヒト網膜芽細胞腫株(Y79, WERI-Rb-1)を用いた。温熱負荷の方法はプレートで培養した細胞を44°C、60分あるいは90分の条件で処理した。BAG3およびPLK1に対するsmall interfering RNA (siRNA)は温熱負荷の48時間前に導入した。また、温熱負荷におけるBAG3の発現とJNK経路、NF-κB活性化との関連について、リアルタイムPCR、ウエスタンブロットを用いて調べた。アポトーシスの誘導と細胞増殖抑制をHTの効果判定に用いた。アポトーシスの判定は温熱負荷から12時間後に行い、Nuclear-ID Green Chromatin Condensation Kitを用いたフローサイトメトリーによるクロマチン凝集、細胞周期のsubG1期の集積およびウエスタンブロットによるカスパーゼ3の断片化を指標とした。細胞増殖の測定は温熱負荷から24時間後に行い、WST-8アッセイによる生細胞数の評価とフリーサイトメトリーによる細胞周期の検討を行った。さらにリアルタイムPCR、ウエスタンブロットと細胞免疫染色を用いて、PLK1とHSF1活性化の関連を調べた。

[結果]

HSC-3, Y79において、BAG3ノックダウンはHT誘導アポトーシスを増強した。HSC-3において、BAG3ノックダウン併用HTはJNK経路の活性化を誘導し、JNK阻害剤の併用で、さらにアポトーシスを増強した。Y79において、HTはNF-κBの不活化を起し、BAG3ノックダウンはその不活化を維持した。

Y79, WERI-Rb-1において、PLK1ノックダウンはHT誘導アポトーシスを増強し、同様

にPLK1 阻害剤も HT 誘導アポトーシスを増強した。さらに、PLK1 ノックダウンは細胞周期における subG1 期の集積と G2 停止を誘導するとともに、生細胞の増殖抑制効果を示した。PLK1 ノックダウン併用 HT はその生細胞増殖抑制効果を増強した。Y79 において、PLK1 ノックダウンは HT により誘導された HSF1 の活性化を抑制し、それに伴い HSPs (HSP70, HSP40)と BAG3 の発現も抑制した。

[総括]

口腔扁平上皮がんと網膜芽細胞腫において、BAG3ノックダウン併用HTは、アポトーシスを有意に増強することから、温熱抵抗性の一部にBAG3が関与すると考えられる。さらに、その併用効果の一部にJNK経路とNF-κBの活性化が関与していると考えられる。また、網膜芽細胞腫において、PLK1ノックダウン併用HTは、アポトーシスを有意に増強した。さらに、PLK1ノックダウンはHTに誘導されるHSF1の活性化を阻害し、細胞保護効果のあるHSPsやBAG3の発現を抑制した。これらの抑制が温熱抵抗性の減弱に寄与し、HTによる殺細胞効果および細胞増殖抑制の増強効果を示すと考えられる。以上の結果から、HSF1活性化に関与するPLK1およびHSF1の活性化に伴い転写誘導されるBAG3を分子標的とすることは、HTの新たな治療戦略となる可能性が示された。

学位論文審査の要旨

【目的】

熱を利用したがん治療法であるハイパーサーミア (HT) は、様々な腫瘍に適用され、その有効性が認識されている。しかしながら、HT の問題点のひとつは、加温により対象となるがん細胞に温熱抵抗性が誘導されることであり、それは HT の効果を減弱させる。その温熱抵抗性には、少なくとも一部にヒートショックプロテイン (HSPs) が関与することが知られている。HSPs はシャペロン機能を有し、様々なストレスに対して細胞保護因子として働いている。HSPs は、主にヒートショック転写因子 1 (HSF1) により、転写誘導されている。そこで、柚木達也君は、HSF1 関連タンパク質である polo-like kinase 1 (PLK1) と Bcl-2 associated athanogene 3 (BAG3) に焦点をあてた。PLK1 は HSF1 の活性化に関与し、がん細胞の増殖や生存に重要な働きを示すといわれている。また、BAG3 は分子シャペロンタンパク質として中心的な役割を果たす HSP70 のシャペロン補助因子であり、ストレス誘導性の抗アポトーシスタンパク質でもある。そこで、柚木達也君は、それらの HSF1 関連タンパク質の機能を阻害することにより、HT の細胞致死効果が増強されるか否かを検討した。

【方法と材料】

細胞としてヒト口腔扁平上皮がん細胞株 (HSC-3) とヒト網膜芽細胞腫株 (Y79, WERI-Rb-1) を用いた。温熱処理はプレートで培養した細胞を 44°C、60 分あるいは 90 分の条件で恒温水槽で行われた。BAG3 および PLK1 に対する small interfering RNA (siRNA) は温熱処理の 48 時間前に導入した。また、温熱処理における BAG3 の発現と JNK 経路、NF- κ B 活性化との関連について、リアルタイム PCR, ウェスタンブロットを用いて調べた。アポトーシスの誘導と細胞増殖抑制を HT の効果判定に用いた。アポトーシスの判定については、温熱処理から 12 時間後に行い、Nuclear-ID Green Chromatin Condensation Kit を用いたフローサイトメトリーによるクロマチン凝集、細胞周期の subG1 期の集積およびウェスタンブロットによるカスパーゼ 3 の断片化を指標とした。細胞増殖の測定は温熱処理から 24 時間後に行い、WST-8 アッセイによる生細胞数の評価とフローサイトメトリーによる細胞周期の検討を行った。さらにリアルタイム PCR, ウェスタンブロットと細胞免疫染色を用いて、PLK1 と HSF1 活性化の関連について調べた。

〔結果〕

HSC-3, Y79 において、BAG3 ノックダウンは HT 誘導アポトーシスを増強した。HSC-3 において、BAG3 ノックダウン併用 HT は JNK 経路の活性化を誘導し、JNK 阻害剤の併用で、さらにアポトーシスを増強した。Y79 において、HT は NF- κ B の不活化を起し、BAG3 ノックダウンはその不活化を維持した。

Y79, WERI-Rb-1 において、PLK1 ノックダウンは HT 誘導アポトーシスを増強し、同様に PLK1 阻害剤も HT 誘導アポトーシスを増強した。また、PLK1 ノックダウンは細胞周期における subG1 期の集積と G2 停止を誘導し、生細胞の増殖抑制効果を示した。さらに、PLK1 ノックダウン併用 HT は細胞増殖抑制効果を増強した。Y79 において、PLK1 ノックダウンは HT により誘導された HSF1 の活性化を抑制し、それに伴い HSPs (HSP70, HSP40) と BAG3 の発現も抑制した。

【総括】

本研究で、柚木達也君は、口腔扁平上皮がんと網膜芽細胞腫において、BAG3 ノックダウン併用 HT は、アポトーシスを有意に増強することを見出し、温熱抵抗性の一部に BAG3 が関与することを明らかにした。さらに、その併用効果の一部に JNK 経路と NF- κ B の活性化が関与していることを明らかにした。また、網膜芽細胞腫において、PLK1 ノックダウン併用 HT は、アポトーシスを有意に増強し、さらに、PLK1 ノックダウンは HT に誘導される HSF1 の活性化を阻害し、細胞保護効果のある HSPs や BAG3 の発現を抑制することを見出した。これらの抑制が温熱抵抗性の減弱に寄与し、HT による殺細胞効果および細胞増殖抑制の増強効果を示すと考えられる。以上のことから HT において HSF1 活性化に関与する PLK1 および HSF1 によって転写誘導される BAG3 が温熱抵抗性となることを初めて明らかにした点は新規性があり、医学における学術的重要性も高く、これらの因子を分子標的とすることで HT の治療効果を増強できる可能性が示されたことにより臨床的発展性が期待できる。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。