

学位論文審査の結果の要旨

平成27年 2月 2日

審査委員	主査	荒木伸一 印		
	副主査	今井田 亮己 印		
	副主査	上野正樹 印		
願出者	専攻	機能構築医学	部門	医用工学
	学籍番号	11D708	氏名	森 正樹
論文題目	Hsp90 inhibitor induces autophagy and apoptosis in osteosarcoma cells			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格	<input type="radio"/> 不合格	(該当するものを○で囲むこと。)	

(論文要旨)

【緒言】

Heat shock protein 90 (以下Hsp90) は細胞増殖、生存に関与する多種多様な領域のクライアント蛋白の安定化・機能を調節するATP依存性分子シャペロンであり、細胞内の総タンパク質の1-2%を占めている。腫瘍細胞ではHsp90の発現量は2-10倍に増えており、腫瘍細胞の増殖や生存に重要なものであることが示唆されている。様々な腫瘍細胞においてHsp90活性を阻害するとHsp90クライアント蛋白が急速に分解され、2つの経路を介してアポトーシスが誘導される。またHsp90はオートファジーにおける重要な役割を担っており、Hsp90阻害薬はmTORの抑制を介してオートファジーを誘導する。しかしながら腫瘍細胞において化学療法で誘導されるオートファジーが防御反応として発現しているのか、細胞死を促進するために誘導されるのかに関しては一定の見解は得られていない。本研究ではヒト骨肉腫細胞株におけるHsp90阻害薬およびオートファジー阻害薬との併用による抗腫瘍効果を検討した。

【方法】

ヒト骨肉腫細胞株としてKTHOS細胞を使用した。Hsp90阻害薬としてgeldanamycin (以下GA) を、オートファジー阻害薬として3-methyladenine (以下3-MA) を使用した。GAおよび3-MAによる抗腫瘍効果はCell Proliferation Assay (MTS assay) により評価した。Western blot法では、Akt/mTOR経路の各因子の蛋白発現およびGAによる経路のリン酸化抑制を評価し、更にLC-3抗体およびp62/SQSTM1抗体を用いてオートファジーを、またcaspase-9抗体、caspase-8抗体およびPARP抗体を用いてアポトーシスをそれぞれ評価した。またTUNEL法を用いたフローサイトメトリーにてアポトーシスを意味する断片化DNAの検出を行い測定した。また、培養細胞をMDCおよびAnnexin-Vにより染色を行い、それぞれオートファジー細胞およびアポトーシス細胞を形態学的に評価した。

【結果】

MTS assayではGAにより時間・用量依存性にKTHOS細胞の増殖抑制効果を認めた。また、GAに3-MAを併用することでこの抗腫瘍効果の増強が確認された。Western blot法では、GAの投与により用量依存性にAkt/mTOR経路のリン酸化抑制と、オートファジーを示すLC-3 IIの発現増加およびp62/SQSTM1の発現低下を認めた。また、GAの投与によりアポトーシスを示すcleaved caspase-9、cleaved caspase-8、cleaved PARPの発現を認めた。さらに、GAおよび3-MAの併用によりcleaved PARPの発現の増強を認めた。フローサイトメトリーでは、GAおよび3-MAの投与により、アポトーシスを示す断片化DNAの増加を認めた。形態学的評価では、GAによりオートファジー細胞が増加し、GAおよび3-MAの併用によりアポトーシス細胞の増加が確認された。

【考察】

本研究ではKTHOS細胞においてGAはアポトーシスおよびオートファジーを同時に誘導することが確認された。オートファジーはAkt/mTOR経路の抑制を介して腫瘍細胞の防御機構として誘導され、オートファジーを抑制することで強い抗腫瘍効果を発揮することが確認された。これらの結果から考察すると、骨肉腫においてHsp90阻害薬とオートファジー阻害薬の併用によりアポトーシスが誘導され有効な化学療法となり得る可能性が示唆された。

本研究に関する学位論文審査委員会は平成27年1月26日に行われた。

本研究は骨肉腫細胞株に対してHsp90阻害薬とオートファジー阻害薬との併用による抗腫瘍効果の有効性を示唆したもので、結果に対する十分な考察もなされている。本研究で得られた成果は骨肉腫に対する新たな分子標的薬の確立に関して意義があり、学術的価値が高い。委員会の合議により、本論文は博士（医学）の学位論文に十分値するものと判定した。

審査においては、

1. GAと3-MAとの併用でアポトーシスが增強されているが、他のsarcoma cell lineでも同様の効果が得られたかどうか。
2. GAと3-MAの正常細胞への影響について。
3. MDC染色によるオートファジーの検出機序について。
4. 本研究論文のタイトルと研究内容の関係について。
5. Caspase-8、caspase-9が同時に活性化している機序。
6. Western blottingのバンドの定量解析は行ったか。
7. GAと3-MAの併用による細胞増殖の抑制効果の増強は両薬剤の相乗効果によるものか。その機序は。
8. Western blottingでGAによりAktのリン酸化は抑制されることが予想されるが、逆に発現が増加しているが、その機序は。
9. GA、3-MAの設定濃度は何を基準に決定したか。
10. 3-MA以外にオートファジーを阻害する薬剤はあるか。
11. 本研究の結果を受けて、今後何か研究のプランは考えているか。

などについて多数の質問が行われた。申請者はいずれにも明確に応答し、医学博士の学位授与に値する十分な見識と能力を有することが認められた。

掲 載 誌 名	International Journal of Oncology		第46巻, 第1号
(公表予定) 掲 載 年 月	2014年10月	出版社(等)名	Spandidos Publications

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。