




学位論文審査の結果の要旨

平成28年2月8日

審査委員	主査	上野正樹			  
	副主査	正木 勉			
	副主査	鈴木康之			
願出者	専攻	機能構築医学	部門	医用工学	
	学籍番号	12D706	氏名	西村 英樹	
論文題目	GSK-3 inhibitor inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human 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。)				
<p>[要 旨]</p> <p>【諸言】 Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) は多機能性のセリン/スレオニンタンパク質キナーゼで、様々な生理学的過程にかかわる多くのシグナル伝達経路で働く。グリコーゲン産生、転写、核細胞質輸送、細胞増殖、アポトーシスなど多岐にわたる細胞制御に関係しており、GSK-3 が関係する細胞シグナル伝達経路の異常によって種々の疾病が引き起こされることが示唆されている。GSK-3 は古典的には、癌に対して抑制的に働くのではないかと考えられていたが、近年いくつかの悪性腫瘍において GSK-3 が腫瘍増殖に関与しているとの研究報告があり、腫瘍によってその役割は異なっている。本研究では、ヒト骨肉腫細胞における GSK-3 の役割と選択的 GSK-3 阻害剤による抗腫瘍効果について検討した。</p> <p>【方法】 選択的 GSK-3 阻害剤として SB216763 を使用した。ヒト骨肉腫細胞株として KTHOS、KHOS、MG63 を用いた。RT-PCR にて、骨肉腫細胞および良性骨軟部腫瘍における GSK-3 遺伝子の発現レベルを評価した。免疫染色により骨肉腫および良性骨軟部腫瘍組織における GSK-3 発現の相違を評価した。MTS assay により、GSK-3 阻害剤投与による 24 時間および 48 時間後の細胞増殖抑制効果を評価した。ELISA 法によりアポトーシス細胞中の一本鎖 DNA を選択的に定量することで GSK-3 阻害剤投与によるアポトーシス誘導を検討した。Western blot により、GSK-3 阻害剤投与によるアポトーシス誘導のシグナル伝達経路について検討した。蛍光顕微鏡によりアポトーシス細胞の形態学的解析を行った。</p> <p>【結果】 RT-PCR では良性骨軟部腫瘍と比較し、骨肉腫細胞において GSK-3 遺伝子の高発現を認めた。免疫染色では、骨肉腫において強く染色された。MTS assay では骨肉腫細胞株において用量および時間依存性に SB216763 投与による細胞増殖抑制効果を認めた。ELISA 法では GSK-3 阻害剤投与によりアポトーシス誘導を認めた。Western blot では、GSK-3 阻害により phospho-GSK-3、NF-κB</p>					

および抗アポトーシス分子 Bcl-2 の発現が低下し、アポトーシス関連タンパク質である cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、cleaved PARP の発現増強を認めた。また GSK-3 の上流にある phospho-Akt の増加は認めたが、mTOR 経路に影響は及ぼさなかった。形態学的評価では、SB216763 投与により用量依存性にアポトーシス細胞の増加を認めた。

【考察】

本研究では、ヒト骨肉腫細胞においてGSK-3が細胞の生存・増殖に重要な役割を果たしていることが示唆された。GSK-3阻害剤投与により用量および時間依存性に腫瘍増殖抑制効果を認めた。この抗腫瘍効果は、GSK-3阻害によりNF-κB/Bcl-2経路を抑制し、ミトコンドリア経路を介したアポトーシスを誘導することによるものと考えられた。骨肉腫において、GSK-3が分子標的治療のターゲットとなり得る可能性がある。

本研究に関する学位論文審査委員会は平成28年2月8日に行われた。

本研究は骨肉腫細胞に対してGSK-3阻害剤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治療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. 一本鎖 DNA 測定によるアポトーシスとネクローシスを判別できているか。
2. MTS assay で IC50 がやや高濃度になった理由。
3. 骨肉腫以外の腫瘍における GSK-3 阻害剤の濃度はどうなっているか。
4. Western blotting で SB216763 投与により GSK-3β自体のタンパク量が下がった理由。
5. Phospho-Akt のタンパク発現が増加した理由。
6. 細胞周期の arrest の評価を行ったかどうか。
7. GSK-3 阻害剤による細胞毒性はあるか。
8. in vivo での薬剤濃度はどのように決定するのか。
9. SB216763 は GSK-3αと GSK-3βのどちらをより強く抑制しているのか。
10. GSK-3 が核内に移行する機序はどのように考えるか。
11. 正常細胞において GSK-3 はどの程度発現しているか。
12. 細胞株によって特徴に違いがあるか。
13. 形態学的評価でdot状の緑の染色は何を意味しているのか。
14. Western blotting、形態学的検討における定量評価をどのように行うのか。

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回答し、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	Oncology Reports		
(公表予定) 掲載年月	2016年 1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。