



Title	GENISTEIN, A TYROSINE KINASE INHIBITOR, BLOCKS THE CELL CYCLE PROGRESSION BUT NOT Ca ²⁺ INFLUX INDUCED BY BAY K8644 IN FRTL-5 CELLS
Author(s)	Takano, T.
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3075068
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	たかの 高野 徹
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 11299 号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	GENISTEIN, A TYROSINE KINASE INHIBITOR, BLOCKS THE CELL CYCLE PROGRESSION BUT NOT Ca^{2+} INFLUX INDUCED BY BAY K8644 IN FRTL-5 CELLS (チロシン磷酸化酵素阻害剤ゲニステインの甲状腺培養細胞 FRTL-5に及ぼす増殖抑制効果について)
論文審査委員	(主査) 教授 網野 信行 (副査) 教授 祖父江憲治 教授 三木 直正

論文内容の要旨

【目的】

細胞増殖のシグナルは種々の磷酸化反応によって伝達されており磷酸化酵素阻害剤はこれらの反応をブロックすることによって細胞の増殖を抑制することが知られている。ラット甲状腺細胞 FRTL-5 は甲状腺細胞の分化・増殖機構の解析に広く用いられているが Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I), 及び Calcium Channel Agonist (BAY K 8644) は Thyroid Stimulating Hormone (TSH) によって前処理され G_1 期に入った FRTL-5 に対して Progression Factor として働き Ca^{2+} 流入を引き起こすとともに細胞周期を S 期にすすめる作用を持つことがわかっている。本研究ではこれらの増殖刺激因子の作用に対して Tyrosine Kinase Inhibitor である Genistein がどのような影響を及ぼすか検討した。

【方法ならびに成績】

- 1) TSH で前処理された FRTL-5 細胞に対して BAYK8644 を Genistein (2.0mg/l) の存在下, 非存在下で添加し DNA 合成を 3H -thymidine の取り込みで評価した。Genistein は BAYK8644 によって誘導される DNA 合成を明らかに抑制した。
- 2) TSH 及び IGF-I の増殖効果に対する Genistein の影響を調べるため TSH 前処理時または IGF-I 処理時に Genistein を共存させ 3H -thymidine の取り込みを調べた。Genistein は IGF-I 処理時に共存させたときには FRTL-5 の DNA 合成を著明に抑制したが TSH 前処理時に共存させても DNA 合成に影響を与えなかった。すなわち TSH による FRTL-5 に対する priming 効果 (G_0 - G_1 移行) に Genistein は影響を与えなかった。
- 3) Genistein が FRTL-5 の内部で Tyrosine Kinase Inhibitor として作用していることを確認するため FRTL-5 の細胞抽出液に対して抗 phosphotyrosine 抗体を用いたイムノブロッティングをおこなった。静止期の FRTL-5 細胞に TSH または IGF-I を添加することによって 175kD の基質が tyrosine 磷酸化されることがわかった。これに対して BAY K8644 は FRTL-5 内の tyrosine 磷酸化蛋白に変化を起さなかった。Genistein は TSH で前処理された FRTL-5 に IGF-I と同時に添加すると TSH または IGF-I によって引き起こされる tyrosine 磷酸化基質の増加を抑制した。また TSH で前処理された FRTL-5 に BAY K8644 を添加した場合には Genistein は TSH での前処理によって増加した 175kD tyrosine 磷酸化基質を減少させた。すなわち Genistein は FRTL-5 内において Tyrosine Kinase Inhibitor として働き 175kD 基質の tyrosine 磷酸化を抑制した。

4) Genistein が BAY K8644 の Calcium Channel Agonist としての薬理的な効果を抑制している可能性を否定するために $^{45}\text{CaCl}_2$ を用いて Ca^{2+} 流入を測定した。Genistein は BAY K8644 によって引き起こされる Ca^{2+} 流入の増加を抑制しなかった。

5) FRTL-5 に TSH, IGF-I を同時添加し、さらに Genistein を加えて48時間の ^3H -thymidine の取り込みを見た場合、Genistein は明らかな増殖抑制効果を示さなかった。また TSH と Genistein を同時添加した場合、8 時間後には TSH による175kD 基質の tyrosine 磷酸化が再び観察されるようになった。以上のことより Genistein の培養液中での有効作用時間は比較的短く（8 時間以内）、IGF-I, BAY K8644 の増殖作用に対する Genistein の阻害作用については単なる細胞毒性ではなく細胞周期の特定の時期に作用して阻害効果を示している可能性が示唆された。

【総括】

Genistein は甲状腺細胞 FRTL-5 の内部で Tyrosine Kinase Inhibitor として作用し、TSH による細胞周期の G_0 - G_1 移行は阻害しなかったが、IGF-I, BAY K8644 による G_1 -S 移行を著明に抑制した。また BAY K8644 による Ca^{2+} 流入には変化を与えなかった。よって Genistein は FRTL-5 の細胞増殖の情報伝達を G_1 期の Ca^{2+} 流入以降の過程で抑制しているものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

本論文はチロシン磷酸化酵素の甲状腺培養細胞 FRTL-5 の増殖における役割を解析するためにチロシン磷酸化酵素特異的な阻害剤であるゲニステインを用いて増殖に及ぼす影響を調べたものである。

その結果、ゲニステインは Thyroid Stimulating Hormone (TSH) で処理された FRTL-5 に対して Insulin-Like Growth Factor (IGF-I), Ca^{2+} Channel Agonist で誘導される DNA 合成を完全に抑制し、さらに TSH または IGF-I による175kD の基質の Tyrosine 磷酸化を著明に抑制することがわかった。

本研究は甲状腺細胞の増殖に Tyrosine 磷酸化酵素が深くかかわっていることを示す新しい知見でありまた細胞内情報伝達における Tyrosine 磷酸化酵素の作用点について新しい情報を提供するもので、学位論文として十分価値のあるものと認められる。