



Title	Induction of hTERT expression and phosphorylation by estrogen via Akt cascade in human ovarian cancer cell lines
Author(s)	木村, 晃子
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46177
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	木村 瞳子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 19752 号
学位授与年月日	平成 17 年 7 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Induction of hTERT expression and phosphorylation by estrogen via Akt cascade in human ovarian cancer cell lines (ヒト卵巣癌細胞株における、Akt カスケードを介したエストロゲンによる hTERT の発現増加とリン酸化のメカニズム)
論文審査委員	(主査) 教授 村田 雄二
	(副査) 教授 高井 義美 教授 奥山 明彦

論文内容の要旨

【目的】

エストロゲン補充療法は乳癌、子宮内膜癌のみならず卵巣癌のリスクも上昇させるといわれるが、そのメカニズムは不明である。近年注目されている発癌標的分子の一つに telomerase が挙げられ、エストロゲンは乳癌細胞、子宮内膜癌細胞、そして上皮性卵巣癌細胞において telomerase を活性化することが報告されている。telomerase は細胞分裂毎に短小化する telomere DNA の複製伸長に関する reverse transcriptase で、染色体の安定性に必要である。また telomerase は、癌細胞において広く活性化されているが、体細胞では認められないことより、細胞の不死化や癌化への関与が考えられている。telomerase 活性化は subunit の hTERT(human telomerase reverse transcriptase) の活性に依存し、種々の上皮性悪性腫瘍において、hTERT の発現増加と活性上昇が関与していることが報告してきた。今回、ヒト上皮性卵巣癌細胞 Caov-3 を用い、エストロゲンが telomerase を活性化するかどうか、hTERT の発現増加と活性上昇が見られるかどうか、及びそれらのメカニズムについて検討した。

【方法】

ヒト卵巣乳頭状腺癌の細胞株 Caov-3 を用い、 17β -estradiol (E2) により telomerase が活性化されるかどうか、stretch PCR 法にて検討した。E2 の hTERT 発現に対する影響は半定量 RT-PCR 法と、種々の大きさのプロモーター・レポーター遺伝子を用いた luciferase 法にて検討した。E2 による Akt のリン酸化を Western blotting 法にて検討した。E2 による hTERT の発現増加に PI3K/Akt cascade を介しているかどうか、PI3K 阻害剤 (LY294002) を添加し、または dominant-negative Akt (DN-Akt) を強制発現させ、RT-PCR 法と luciferase 法にて検討した。PI3K/Akt の downstream にある転写因子 NF- κ B が hTERT の発現に関与しているかどうか、I κ B α の阻害剤 (BAY 11-7082) を添加し、または核内移行ドメインを消失した変異 p50 (NF- κ B subunit) を強制発現させ、luciferase 法にて検討した。hTERT はリン酸化され、核内に移行することにより酵素活性を発揮するが、hTERT が E2 によりリン酸化されるかどうかを Western blotting 法にて検討した。hTERT の核内移行に重要な 14-3-3 蛋白や p65 (NF- κ B subunit) との結合が E2 により増強するかどうかを GST-14-3-3 fusion protein との binding 法や免疫沈降法にて検討した。E2 により hTERT が核内に移行するかどうか細胞内局在の変化をみるために、pCR3-hTERT-HA を強制発現させ、共焦点顕微鏡にて検討した。

【結果】

Caov-3 細胞において、10 nM E2 添加後 6 時間から telomerase 活性の上昇が観察され 24 時間で最大となり、この現象はエストロゲン受容体(ER)のアンタゴニストである ICI182,780 により抑制された。E2 により hTERT の mRNA 量は増加し、ICI182,780 にて抑制された。Estrogen response element (ERE) を欠損した hTERT 遺伝子プロモーター領域でも E2 による hTERT 転写活性の上昇が認められた。E2 により ER、Src、PI3K を介した Akt のリン酸化がみられた。LY294002 の添加や DN-Akt 強制発現により E2 による hTERT の発現增加が抑制された。BAY11-7082 の添加や変異 p50 の強制発現により E2 による hTERT の発現增加が抑制された。E2 による hTERT のリン酸化は添加後 30 分で認められ 24 時間後も持続し、ICI182,780 や LY294002 で抑制された。E2 により hTERT は 14-3-3 蛋白や p65 と結合し、LY294002 や ICI182,780 で抑制された。HA-hTERT は E2 添加後 30 分で核内に移行し 24 時間後も認められ、LY294002、ICI182,780、BAY11-7082 の添加で核内移行が抑制された。

【総括】

卵巣癌細胞株において、エストロゲンによる telomerase の活性化は、ERE を介した経路のみならず、PI3K/Akt/NF κ B 経路を介した hTERT 発現增加による転写制御と、Akt を介した hTERT の活性上昇による転写後制御とも関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

エストロゲン補充療法は乳癌、子宮内膜癌のみならず卵巣癌のリスクも上昇させるといわれるが、そのメカニズムは不明である。近年注目されている発癌標的分子の一つに telomerase が挙げられ、エストロゲンは乳癌細胞、子宮内膜癌細胞、そして上皮性卵巣癌細胞において telomerase を活性化することが報告されている。telomerase は細胞分裂毎に短小化する telomere DNA の複製伸長に関与する reverse transcriptase で、染色体の安定性に必要である。また telomerase は、癌細胞において広く活性化されているが、体細胞では認められないことより、細胞の不死化や癌化への関与が考えられている。telomerase 活性化は subunit の hTERT(human telomerase reverse transcriptase) の活性に依存し、種々の上皮性悪性腫瘍において、hTERT の発現增加と活性上昇が関与していることが報告してきた。今回、ヒト上皮性卵巣癌細胞 Caov-3 を用い、エストロゲンが telomerase を活性化することを確認し、hTERT の発現增加や活性上昇に、細胞内シグナル伝達の 1 つ PI3K/Akt 経路による制御が関与していることを示した。

以上のこの研究をまとめた論文により、博士（医学）の学位授与に値すると評価された。