



|              |  |
|--------------|--|
| Title        | Suppression of PI3K/mTOR pathway rescues LLC cells from cell death induced by hypoxia  |
| Author(s)    | 濱中, 雄幸   |
| Citation     | 大阪大学, 2005, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/46343">https://hdl.handle.net/11094/46343</a>  |
| 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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 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         | はま なか ゆう こう<br>濱 中 雄 幸   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (医 学)  |
| 学位記番号      | 第 19706 号  |
| 学位授与年月日    | 平成 17 年 4 月 28 日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>医学系研究科未来医療開発専攻   |
| 学位論文名      | Suppression of PI3K/mTOR pathway rescues LLC cells from cell death induced by hypoxia.<br>(PI3K および mTOR シグナルの抑制により LLC 細胞は低酸素により誘導される細胞死を回避する。) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 松田 暉<br><br>(副査)<br>教授 福澤 正洋 教授 辻本 賀英   |

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [ 目 的 ]

固形腫瘍内の低酸素領域の癌細胞は放射線治療や抗癌剤治療に抵抗性を示し、固形腫瘍内の酸素濃度の実測から低酸素と臨床予後が相関することが報告されている。従って、低酸素領域の癌細胞を標的とした新しい治療が必要と考えられるが、現在のところ癌細胞の低酸素耐性のメカニズムは明らかにされていない。

細胞環境の変化を感知するシステムとして mTOR を中心とするシグナル伝達系の詳細が明らかにされつつある。mTOR は PI3K シグナルの下流に位置し、十分な酸素・栄養素の存在下では増殖因子等によりシグナルは ON の状態となり蛋白の翻訳を促進する。種々の癌細胞で PI3K/mTOR シグナルの過剰発現が多数報告されている。一方、エネルギー源が枯渇すると mTOR シグナルは OFF の状態となり、蛋白の翻訳を抑制する。

最近、低酸素状態で mTOR シグナルが抑制されることが報告されたが、その意義・メカニズムについては未だ明らかでない。癌細胞は低酸素下で mTOR シグナルを抑制することによって細胞死を回避するとの仮説のもと、mTOR シグナルを中心に Lewis Lung Carcinoma (LLC) の低酸素耐性のメカニズムを検討した。

#### [ 方法ならびに成績 ]

##### 1. LLC 細胞の低酸素下における細胞死についての検討

LLC 細胞の低酸素 (1%O<sub>2</sub>) 下における細胞死を通常酸素濃度下と比較した。LLC 細胞は通常酸素濃度下では生存し、低酸素下では細胞死に陥った。次にその細胞死を定量化するため、上清 LDH 活性を測定したところ、低酸素下で有意に高かった。LLC 細胞の低酸素下における細胞死の形態を観察した。低酸素下では、Hoechst 染色で核の凝縮などアポトーシス特有の変化は認めず、PI 染色陽性であった。Cleaved caspase-3 蛋白の発現をウエスタンブロット法にて経時的に検討したところ、Cleaved caspase-3 の発現は認めなかった。以上より、LLC 細胞の低酸素での細胞死はネクローシスであった。

##### 2. LLC 細胞の低酸素下における PI3K/mTOR シグナルの変化

LLC 細胞の低酸素ストレスにて誘導される mTOR シグナル蛋白の発現およびリン酸化をウエスタンブロット法で通常酸素下と比較したところ、低酸素下では mTOR 下流の S6K 蛋白および S6 蛋白のリン酸化が通常酸素

下と比較して著明に低下した。

### 3. S6K 恒常的活性化が低酸素下における細胞死に及ぼす役割

低酸素下における S6K 蛋白の役割を明らかにするため、レトロウイルスベクターを用いて LLC 細胞に恒常的に活性化した S6K を導入し (S6K-CA)、低酸素下における細胞死を評価した。S6K-CA 株ではコントロール群と比し、mTOR 下流の蛋白のリン酸化が増強し、低酸素下における細胞死が増加した。

### 4. PI3K/mTOR 阻害剤が低酸素下における細胞死に及ぼす効果

S6K 恒常的活性化が低酸素下における細胞死を増強したので、低酸素下における S6K 蛋白リン酸化の抑制が低酸素耐性の本質ではないかと考えた。そこで、S6K 活性を抑制する方法として、PI3K 阻害剤および mTOR 阻害剤で LLC 細胞を処理し、低酸素下における細胞死について検討した。阻害剤投与群では mTOR 下流の蛋白のリン酸化が抑制され、投与群では両者とも細胞死を回避した。

### 5. PI3K/mTOR 阻害剤投与による細胞状態の経時的変化の検討

実験 4 において、低酸素下では細胞内 ATP は通常酸素下と比較して早い速度で低下したが、阻害剤投与群では細胞内 ATP の低下速度は通常酸素下と同程度であった。上清 PH、glucose の減少はともに阻害剤投与群では遅延した。低酸素により G1 細胞周期停止をきたしたが、PI3K 阻害剤および mTOR 阻害剤投与群では更なる細胞周期停止は観察されなかった。

## [ 総 括 ]

1. 低酸素下でネクローシスに陥る LLC 細胞を用いて、低酸素下における PI3K/mTOR シグナルの変化と役割を検討した。
2. LLC 細胞は低酸素下で S6K 蛋白および S6 蛋白のリン酸化が著明に抑制された。
3. 低酸素下にて S6K 蛋白を恒常的に発現させたところ細胞死を増強した。
4. 低酸素下で PI3K/mTOR シグナルを阻害剤にて抑制したところ、細胞死を回避した。
5. 低酸素下で PI3K/mTOR シグナルを阻害剤にて抑制すると細胞内 ATP・上清 PH・上清 Glucose の低下は遅延した。阻害剤投与による更なる細胞周期停止は認められなかった。

以上より、PI3K/mTOR シグナルの抑制が低酸素耐性能に関与する可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

固形腫瘍の内部環境は不均一で低酸素領域の癌細胞は放射線や抗癌剤に治療抵抗性で、腫瘍内の低酸素と予後が相関することが報告されている。従って、低酸素領域の癌細胞を標的とした新しい治療が必要であるが、低酸素耐性のメカニズムは明らかでない。細胞環境の変化を感知するシステムとして mTOR シグナル伝達系が明らかにされつつあり、癌細胞での mTOR シグナルの過剰発現が多数報告されている。近年、低酸素が mTOR シグナルを抑制することが報告されたが、その意義については明らかでない。癌細胞は mTOR シグナルを抑制することにより低酸素による細胞死を回避するのではないかと考え、LLC 細胞の低酸素耐性のメカニズムを mTOR シグナルを中心に検討した。LLC 細胞は PI3K および mTOR シグナルの抑制により低酸素により誘導される細胞死を回避した。この研究は、低酸素領域の癌細胞の治療には PI3K/mTOR シグナルを活性化させる必要性を示唆するものであり学位に値するものと認める。