The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Overexpression of PIAS3 suppresses cell growth and restores drug sensitivity of human lung cancer cells in association with PI3-K/Akt inactivation
Author(s)	緒方, 嘉隆
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47434
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

【15】

氏　　名	緒　方　嘉　隆（おがた よしたか）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２０６８１　号
学位授与年月日	平成 18 年 9 月 27 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学　位　論　文　名	Overexpression of PIAS3 suppresses cell growth and restores drug sensitivity of human lung cancer cells in association with PI3-K/Akt inactivation. （PIAS3 の過剰発現は PI3-K/Akt を介してヒト肺癌細胞の増殖を抑制し薬剤感受性を回復させる）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　川瀬　一郎 （副査） 教　授　門田　守人　　教　授　金倉　　譲

論　文　内　容　の　要　旨

（目的）

チロシンキナーゼ成長因子受容体からのシグナルを介する分子が、癌細胞の増殖と生存に関与していることは良く知られている。STATs（signal transducers and activators of transcription）もそのひとつであるが、その STATs が恒常的に活性化されている場合、増殖シグナルの伝達が制御不能に陥ることが報告されている。STAT を制御する分子として SOCS の役割は多く報告されている。また STAT を制御する分子として PIAS（protein inhibitor of activated STAT）蛋白も知られている。前立腺癌やリンパ腫で PIAS3 の機能不全、欠損が増殖と抗癌剤感受性の低下に関わっているとの報告が見られる。しかし肺癌においてはその役割についての報告は余りなされていない。今回われわれは PIAS3 が肺癌細胞において果たす役割を検討した。

（方法ならびに成績）

まずわれわれは肺癌細胞において JAK/STAT、PI3-K を抑制することが、増殖と抗癌剤感受性にどのような影響を与えるかを検討した。ヒト肺腺癌の細胞株である A549 に JAK 阻害剤 AG490 を加え、その増殖を見ると、JAK 阻害剤を加えたほうは対照群に比べて有意に増殖が抑制された。別のヒト肺腺癌の細胞株 LCD でも同様に増殖は抑制された。今度は PI3-K の阻害剤である LY294002 を A549 に加えたところ AG490 の場合と同様に増殖が抑制された。次に MTT assay 法を用いて抗癌剤感受性について検討した。AG490 あるいは LY294002 を加えた場合の抗癌剤に対する IC50 を、対照群の IC50 で除し比較した。JAK 阻害剤を加えたほうがほぼ感受性が変わらないのに対して、PI3K 阻害剤を加えたほうは感受性が約２倍から８倍上昇した。JAK、PI3K 系を抑制すると、いずれにおいても増殖は抑制されるが、抗癌剤感受性は PI3K の径路を抑制した場合のみ改善した。

次に PIAS3 遺伝子を組み込んだプラスミドを用いて肺癌細胞株 A549、LCD、EBC1 の stable transfectant を作成した。発現は Myc tag で確認した。また PIAS3 蛋白の増加を Western blot で確認した。作成した transfectant を IL6 で刺激し western blot で確認したところ A549 では明らかに STAT のリン酸化が抑制された。EBC1 では transfectant のリン酸化が対照群の細胞に比べて早期に減弱した。作成した transfectant の増殖を検討した。A549

の対照群の細胞と PIAS3 を過剰発現させた transfectant の増殖を比べた場合 transfectant の増殖は抑制された。A549 の対照群の細胞に SOCS3 をアデノウイルスベクターで過剰発現させた場合、対照群の細胞に比べて明らかに増殖が抑制された。PIAS3 を過剰発現させた transfectant に SOCS3 をアデノウイルスベクターで過剰発現させたものと、コントロールベクターを感染させたものを比較すると、SOCS3 を過剰発現させたほうが増殖は抑制された。以上より PIAS3 は SOCS3 に相乗効果を示すものと考えられた。A549、LCD、EBC1 いずれにおいても PIAS3 を過剰発現させたほうが、対照群に比べて有意に増殖が抑制された。PIAS3 を導入した transfectant で抗癌剤感受性を検討した。いずれの細抱株でもカルボプラチン、ビノレルビンに対して 2 倍から 12 倍の感受性の増強が認められた。それに対して SOCS3 をアデノウイルスベクターで導入したものでは抗癌剤感受性に変化は認められなかった。PIAS3 を導入した transfectant と対照群の細胞株をカルボプラチンに曝露し、Bcl-XL を Western blot で見たところ、PIAS3 を過剰発現した細胞株のほうは Bcl-XL の発現が有意に抑制された、次に IL-6 で刺激を行いリン酸化 Akt の発現を見たところ、A549 では、PIAS3 を過剰発現した細胞株のほうは対照群に比べて有意に抑制された。また EBC1 では IL-6 刺激後 30 分で、PIAS3 を過剰発現した細胞株のほうは、リン酸化 Akt の発現が対照群に比べて減弱した。リン酸化 Erk はいずれも変化を認めなかった。

今度は SOCS3 を強制発現した A549 を IL-6 で刺激した。リン酸化 STAT は対照群に比べて有意に発現が抑えられたが、リン酸化 Akt、リン酸化 Erk のいずれも、PIAS3 を過剰発現した場合とは異なり、変化は見られなかった。またカルボプラチンの曝露でも Bcl-XL に変化は認められなかった。

次に PIAS3 の発現を siRNA を用いて阻害し、検討した。A549、EBC1、LCMS では PIAS3 を阻害した結果、リン酸化 Akt のシグナルの増強を認めた。A549、LCMS で PIAS3 を阻害し、その増殖を検討した。いずれも PIAS3 の発現を阻害したほうは対照群に比べて増殖が促進された。また抗癌剤感受性も、PIAS3 の発現を阻害したほうは感受性が半減し、悪化した。

A549、EBC1 にプラスミドを用いて PIAS3 を導入した後、Akt で免疫沈降し、PIAS3 で blot し、検討したところ Akt と PIAS3 は結合している可能性を示した。また IL-6 で刺激を行わなかったものと、刺激したものを比較すると IL-6 で刺激したほうが結合が強い傾向にあった。

（総括）

肺癌細胞において PIAS3 を過剰発現させることで、細胞の増殖を抑制するだけでなく、抗癌剤感受性を増強させる可能性が示唆された。抗癌剤感受性の増強は PIAS3 が、リン酸化 Akt を抑制した結果生じたと考えられた。それに対して SOCS3 を導入した場合では細胞の増殖は抑制されたが、抗癌剤感受性に変化は認められなかった。またリン酸化 Akt にも変化は認められなかった。PIAS3 が PI3K の径路にどのようにして影響を与えるかはさらに詳細な検討が必要だが、以上から PIAS3 は JAK/STAT、PI3K の径路を標的にした癌治療に有用な可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

チロシンキナーゼ成長因子受容体からのシグナルを仲介する STAT はその抑制分子である SOCS や SHP 蛋白の機能不全により恒常的に活性化し、癌細胞の増殖と生存に寄与している。我々は第 3 の抑制分子である PIAS3 の肺癌細胞における役割について検討した。PIAS3 をヒト非小細胞肺癌細胞株 A549 において過剰発現させると増殖を抑制するだけでなく抗癌剤感受性も増強した。これは、Akt のリン酸化が抑制されるためであることが示された。一方、SOCS3 を過剰発現させても抗癌剤感受性は変化せず、また、Akt のリン酸化も抑制されなかった。また PIAS3 を siRNA を用いて阻害すると肺癌細胞の増殖は促進され、抗癌剤感受性も悪化した。以上より、PIAS3 は肺癌悪性化において、重要な役割を果たしていると考えられた。以上の内容は学位に値すると考える。