

Title	Inhibition of Phosphorylation of a Forkhead Transcription Factor Sensitizes Human Ovarian Cancer Cells to Cisplatin
Author(s)	石田, 絵美
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49819">https://hdl.handle.net/11094/49819</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">〈a href="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">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

【83】

氏 名	いしだ ありもと えみ 石田 (有本) 絵 美
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 2 7 9 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 21 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学 位 論 文 名	Inhibition of Phosphorylation of a Forkhead Transcription Factor Sensitizes Human Ovarian Cancer Cells to Cisplatin (Forkhead 転写因子の一つである FKHL1 のリン酸化を阻害すると、ヒト 卵巣癌細胞のシスプラチン感受性が高まる)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 木村 正 (副査) 教 授 青笹 克之 教 授 野口眞三郎

## 論文内容の要旨

### [目的]

卵巣癌の治療には、手術療法と化学療法とが併用されているが、現在なお十分な治療成績が得られていない。その理由の一つとして、治療開始時に抗癌剤に感受性を示していた癌細胞が、後に耐性を獲得し、治療に抵抗性を示すことが挙げられる。初回治療のキードラッグであるプラチナ製剤の耐性化の分子機構を解明することは、卵巣癌患者の予後改善に重要である。抗癌剤の感受性は、アポトーシス誘導シグナルと生存シグナルという二つの相反するシグナルのバランスにより規定されるということが報告されている。代表的な生存シグナルである Akt は、PI3K の下流で活性化している Ser/Thr キナーゼであり、Bad、Caspase-9 など様々なアポトーシス誘導因子をリン酸化することにより、アポトーシスを抑制し細胞の生存を促進する。これまでに、卵巣癌をはじめ様々な癌において Akt が過剰発現していること、Akt の過剰発現が癌のステージと正の相関を示し生存期間と負の相関を示すこと、また Akt が抗癌剤の感受性低下と関連することが報告されている。我々はこのことに着目し、卵巣癌細胞においてシスプラチンが Akt を活性化すること、及び Akt の活性を抑制するとシスプラチン感受性が高まることを報告してきた。

今回私が着目した FKHL1 は、アポトーシス誘導蛋白である FAS ligand の遺伝子のプロモーターに結合してアポトーシスを誘導する転写因子で、Forkhead (Fox) ファミリーに属し、FOXO3a とよばれている。Brunet らは、様々な種類の細胞において、FKHL1 が PI3K/Akt カスケードを介してリン酸化されると、14-3-3 蛋白と結合するために核内に移行できず、Fas ligand 遺伝子の転写活性が低下することを報告し、Akt のアポトーシス抑制機構の一つとして、FKHL1 のリン酸化が重要であることを示した。そこで私は、Akt による FKHL1 のリン酸化が、卵巣癌細胞のシスプラチン耐性化にも関与しているのではないかと推測し、本研究を行った。

### [方法]

シスプラチン耐性ヒト卵巣癌細胞株 Caov-3 細胞及びシスプラチン感受性ヒト卵巣癌細胞株 A2780 細胞を用いて、①シスプラチンによる PI3K/Akt カスケード を介した FKHL1 のリン酸化について検討した。まず、シスプラチンによる Akt の活性化を、基質である GSK3 $\alpha$ を用いた *in vitro* kinase assay にて検討した。さらに、wortmannin ( PI3K 阻害剤) がシスプラチンによる Akt の活性化を抑制するかどうかについても検討した。次に、シスプラチンによる FKHL1 のリン酸化を western blotting 法にて検討した。また、DN-Akt (ドミナントネガティブ) や TM-HA-FKHL1 (Akt による3か所のリン酸化部位をアラニンに置換した変異体) を強制発現し、FKHL1 が Akt によるリン酸化をうけない状態で、シスプラチンによる FKHL1 のリン酸化が抑制されるかどうかについても検討した。②続いて、シスプラチンによりリン酸化された FKHL1 の細胞内局在の変化、および 14-3-3 蛋白との結合について検討した。まず、WT-HA-FKHL1 を強制発現し、HA-FKHL1 の局在を免疫蛍光染色にて検討した。次にシスプラチン添加後の cell lysate を GST-14-3-3 fusion protein で pull down し、結合した phospho-FKHL1 を western blotting 法で検出した。③最後に、FKHL1 が Akt によるリン酸化を受けない状態での、シスプラチン添加時の Fas ligand 遺伝子のプロモーター活性およびシスプラチン感受性について検討した。 まず TM-FKHL1 を強制発現し、シ

スプラチン添加時の Fas ligand 遺伝子のプロモーター活性を、Luciferase assay にて検討した。続いて cell viability についても MTS assay にて検討した。

### [成績]

Caov-3 細胞 (シスプラチン耐性) において、シスプラチンは PI3K を介して Akt を活性化し、Akt を介して FKHL1 をリン酸化した。シスプラチン添加によりリン酸化された FKHL1 は細胞質内にとどまっていたが、PI3K 阻害剤による Akt の活性化阻害で FKHL1 のリン酸化が抑制されると、核内に移動した。また、シスプラチンによりリン酸化された FKHL1 は 14-3-3 蛋白と結合した。このことより、リン酸化 FKHL1 が細胞質に局在することに 14-3-3 蛋白が関与していることが示唆された。最後に、TM-FKHL1 の強制発現により FKHL1 が Akt によるリン酸化をうけない状態にすると、シスプラチンによる Fas ligand 遺伝子のプロモーター活性が上昇し、シスプラチン感受性が高まった。

一方、A 2780 細胞 (シスプラチン感受性) において、シスプラチンは FKHL1 をリン酸化しなかった。そのため、シスプラチンを添加しても、FKHL1 は核内に局在し、14-3-3 蛋白との結合は誘導されなかった。また、TM-FKHL1 を強制発現しても、シスプラチンによる Fas ligand 遺伝子のプロモーター活性、およびシスプラチン感受性に変化を認めなかった。

### [総括]

シスプラチン耐性細胞において、シスプラチンは PI3K/Akt カスケードを介して FKHL1 をリン酸化し、細胞質への移行を引き起こした。また、FKHL1 が Akt によるリン酸化をうけない状態では、シスプラチンによる Fas ligand 遺伝子のプロモーター活性は上昇し、シスプラチン感受性が高まった。今後、卵巣癌に対する PI3K/Akt カスケードの選択的阻害剤を用いた新たな治療法の開発が期待される。

## 論文審査の結果の要旨

卵巣癌治療において、プラチナ製剤はキードラッグであるが、耐性化が臨床上的の問題となっている。この論文では、Aktの基質である転写因子FKHL1がFASリガンドプロモーターに結合してアポトーシスを誘導することに着目し、卵巣癌細胞のシスプラチン耐性化における、Aktを介したFKHL1のリン酸化の関与について検討した。シスプラチン耐性卵巣癌細胞株Caov-3細胞にシスプラチンを添加すると、Aktを介してFKHL1がリン酸化されること、及びリン酸化FKHL1は14-3-3蛋白と結合して細胞質に局在することを確認した。さらに、Akt/FKHL1カスケードの遮断により、FKHL1がFASリガンドプロモーターに結合してアポトーシスを誘導し、生存細胞数が減少することを確認した。これらの反応はシスプラチン感受性卵巣癌細胞株A2780細胞では認められないことを確認した。以上より、卵巣癌細胞のシスプラチン耐性化に、Aktを介したFKHL1のリン酸化が関与していることを証明した。この論文は学位に値するものと認める。