



Title	Interferon- α Acts on the S/G2/M Phases to Induce Apoptosis in the G1 Phase of an IFNAR2-expressing Hepatocellular Carcinoma Cell Line
Author(s)	前田, 栄
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51993
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏名 Name	前田 栄
論文題名 Title	Interferon- α Acts on the S/G2/M Phases to Induce Apoptosis in the G1 Phase of an IFNAR2-expressing Hepatocellular Carcinoma Cell Line (IFNAR2を発現する肝癌細胞において、インターフェロン- α はS/G2/M期に作用してG1期でのアポトーシスを誘導する)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕 肝細胞癌に対して、インターフェロン-α (IFN-α) と5-Fluorouracil (5-FU) を併用することで、良好な治療成績が報告されているが、その抗腫瘍効果の機序については、十分には解明されていない。特に、IFN-αの直接的な抗腫瘍効果と考えられる細胞周期の調節とアポトーシスの関連については、その詳細な作用機序は不明であった。今回、我々は細胞周期毎に異なる蛍光を発するfluorescence ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci) のシステムを用いて細胞周期を可視化し、IFN-αがそのレセプターであるIFNAR2を介して細胞周期に与える影響を解析し、その作用機序と関連する分子を同定することを目的とした。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 インターフェロン受容体 (IFNAR2) を介したIFN-αの肝癌細胞に対する抗腫瘍効果を解析するために、IFNAR2の発現が低く、IFN-αに抵抗性を示す肝癌細胞株: HuH7に対し、レトロウィルスベクターを用いてIFNAR2の遺伝子導入を行った。IFNAR2の導入により、IFN-α投与でSTAT1、2及び3リン酸化が強く誘導されることが示され、更に、72時間のIFN-α投与によるIC70濃度はmock群が$2,839.1 \pm 321.8$ (IU/ml)であったのに対してIFNAR2導入群においては90.1 ± 36.1 (IU/ml)とIFN-αの感受性が増加していた。 IFN-αがIFNAR2を介して細胞周期に与える影響を個々の細胞レベルで観察するために、これらの細胞にFucciシステムを導入し、細胞周期のG0/G1期及びS/G2/M期の核がそれぞれ、mK02 (赤)、mAG (緑) により蛍光標識される細胞を樹立した。共焦点レーザー顕微鏡を用いてtime-lapse imagingを行うことで、個々の細胞レベルで細胞周期変化が可視化されることを確認した。これらの細胞を用いて、5-FU、IFN-α投与後から72時間までtime-lapse imagingを行い、細胞周期の変化と形態的变化を観察した結果、5-FU (1000 μM) の投与では、mock及びIFNAR2導入株の両群において、S/G2/M期で細胞周期が停止し、さらにアポトーシスが誘導されていた。IFN-α投与ではIFNAR2導入株のみにおいて濃度依存的にG0/G1期でアポトーシスを来す細胞の割合が増加した。FACSによる集団解析では IFN-α投与によりG0/G1期の細胞集団が有意に増加していた。 続いて、IFN-αの細胞周期における作用点を解析するために、Aphidicolinを用いて細胞周期を早期S期またはG0/G1期に同調させ、同調解除と同時にIFN-αを投与し、72時間のtime-lapse imagingを行った。早期S期に同調させた場合、51.7%の細胞が、S/G2/M期を経て、G0/G1期に入った後にアポトーシスを生じていたが、G0/G1期に同調させた細胞ではG0/G1期からS/G2/M期を経て再度G0/G1期に突入した細胞でのアポトーシス発生頻度が29.4%と最も多く見られた。以上の結果から、IFN-αはS/G2/M期にアポトーシス誘導の作用点を有し、S/G2/M期を経たG0/G1期でアポトーシスが誘導される効果発現点をもつことが示唆された。 IFN-α/IFNAR2シグナルの下流でこれらの現象を制御する分子を同定するために、IFN-α投与後の細胞をG0/G1期、S/G2/M期にFACSを用いてsortし、western blotting法によりそれぞれのシグナル発現を解析すると、Caspase3やCaspase7はS/G2/M期と比較してG0/G1期で強く活性化される一方で、p53のhomologとして働くp63の発現がS/G2/M期で強く見られた。S/G2/M期でのp63発現が、IFN-αの細胞周期制御やアポトーシスに関連していると考えられたため、p63の遺伝子導入をHuh7に行ったところ、G0/G1期での細胞周期停止を誘導するp21と、アポトーシスを誘導するPUMAの発現が上昇することを確認した。次に、p63の発現をsiRNAにより抑制した細胞にIFN-αを投与するとCaspase3やCaspase7の活性化が抑制された。これらの結果によりIFN-α/IFNAR2のシグナル伝達系においてp63がアポトーシス誘導に重要な役割を担っていることが示された。 〔総括(Conclusion)〕 IFN-α/IFNAR2シグナルが個々の細胞の細胞周期に与える影響を「細胞周期の変化」と「形態学的変化」を同時に解析することにより、IFN-αがS/G2/M期に作用点を持ち、G0/G1期で細胞のアポトーシスを誘導することがしめされ、その作用機序にp63が関与することを同定した。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 前田 栄			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	森 正 樹
	副 査	大阪大学教授	野々村 祝夫
	副 査	大阪大学教授	熊 御 淳
論文審査の結果の要旨 IFN-αは実臨床で肝細胞癌の治療に用いられている一方で、IFNAR2を介した直接的な抗腫瘍効果を発揮する細胞周期の作用点は明らかではなかった。本研究は肝癌細胞であるHuH7にFucci (fluorescence ubiquitination-based cell-cycle indicator) システムを導入することで細胞周期を可視化した。time-lapse imagingの手法を用いて、IFN-α/IFNAR2シグナルが個々の細胞の細胞周期に与える影響を「細胞周期の変化」と「形態学的変化」を同時に解析することにより、IFN-αがS/G2/M期に作用点を持ち、G0/G1期で細胞のアポトーシスを誘導することを示し、その作用機序にp63が関与することを同定した。time-lapse imagingの解析からIFN-αの細胞周期における作用点と効果発現点を同定し、その制御因子を同定した本論文は学位授与に値するものとする。			