Osaka University Knowledge Archive

Title	RPAP3はNF-κB経路の抑制により抗癌薬の効果増強作用を示す
Author(s)	島田, 華奈
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58451
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【10】

氏　　名	島　田　華　奈（しま　だ　か　な）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２４４６７　号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学　位　論　文　名	RPAP3はNF-κB経路の抑制により抗癌薬の効果増強作用を示す
論文審査委員	（主査） 教　授　由良　義明 （副査） 教　授　上崎　善規　　講　師　福田　康夫　　講　師　佐藤　　淳

論 文 内 容 の 要 旨

＜目的＞

NF-κB(nuclear factor of κB)は、発癌・細胞死の抑制・免疫反応制御・器官形成など多彩な機能を持っていることが知られている。この分子は高等生物に限らず、ほとんどの動物に発現しており、制御不良な例としてクローン病・慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患や、サイトメガロウイルス・ヒト免疫不全ウイルスの増殖、癌、敗血症性ショックなどの原因になるといわれている。またRel familyに属し、ホモあるいはヘテロ二量体の形で５種類(RelA(p65)、RelB、c-Rel、NF-κB1(p105/p50)、NF-κB2(p100/p52))が存在する。通常は、IκB(inhibitor of kinase B)と結合し、不活性型として細胞質に存在するが、何らかのDNA損傷ストレスが起こるとIKK（IκB kinase）複合体の活性化を介してIκBが分解され、NF-κBが核内に移行し、転写活性を上昇させると言われている。Doxorubicinに代表される、DNAを標的とした抗癌剤を投与する場合においても、NF-κBの活性上昇が惹起されるため、NF-κB阻害をすることが抗癌剤をより効果的に奏功させると考えられてきた。

当教室にてアポトーシス誘導因子としてクローニングを行った分子‘Monad’には、様々な結合分子が存在するが、そのうちの一つであるRNA polymerase Ⅱ associated protein 3(RPAP3)と、IKK複合体の一角をなすNEMO(IKKγ)が結合することを見出した。このIKK複合体は、IKKα、β、γからなるサブユニットで、細胞質においてIκBαをリン酸化する。このリン酸化がIκBαのプロテアソームによる分解を促進して、NF-κB を活性化することがわかっている。本研究ではヒト乳癌細胞におけるRPAP3が、NF-κB活性化経路におよぼす影響について調べた。

＜方法＞

LacZ、RPAP3のORFでPCRを行い、レンチウイルスにより293FT細胞にtransfectionを行った。このウイルス液をヒト乳癌細胞株MCF-7、T-47D細胞に感染させ、ブラストシジンにて選択的してRPAP3を恒常的に発現する細胞株を作製した。その確認はRPAP3のペプチド抗体を当教室にて作製し、ウエスタンブロッティングにより行った。細胞傷害性の評価は、Doxorubicin（Adriamycin）3μM投与後の、１日目から４日目の細胞生存率をMTT assayにより行った。T-47D細胞におけるNF-κB活性の測定は、RPAP3および対照群の発現株に、Doxorubicinを投与後６時間までの活性をp50およびp65の結合活性としてELISA法にて測定した。

NF-κB 経路に関するシグナル伝達分子については、同様の処置をした細胞を用いてウエスタンブロッティングおよび免疫沈降法により検討を行った。

＜結果＞

T-47D細胞において、RPAP3とNEMOの結合が免疫沈降にて確認された。乳癌細胞株MCF-7、T-47Dにおける Doxorubicin 投与後の細胞傷害性について調べたところ、いずれの細胞においてもRPAP3発現株では細胞死の促進が認められた。特にT-47D細胞は、その細胞死は著明で、投与４日後に90%以上の細胞死が認められた。

T-47D細胞においてNF-κB活性を測定したところ、p50およびp65の結合活性はともにRPAP3発現株でDoxorubicinによるNF-κB経路の活性化の抑制が認められた。この細胞株を核分画および細胞質分画に分け、ウエスタンブロッティングにてNF-κBの活性を測定したところ、RPAP3発現株におけるp65の核分画への移行が抑制されていた。同様の株を用いてDoxorubicin処置後のシグナル発現について調べたところ、リン酸化NF-κB p65の活性抑制がRPAP3発現株において認められた。IκBαは、RPAP3発現株ではほぼ活性化されなかったのに対し、LacZ発現株（対照群）においてはDoxorubicin処置の初期段階で活性化され、次第に分解されていくという結果が得られた。

＜考察＞

悪性腫瘍細胞においては恒常的にNF-κBが活性化されていることが報告されている。NF-κBの活性化は、癌細胞の生存・増殖・浸潤・転移を促進し、抗癌剤の耐性の一因となっている。この耐性発現のメカニズムとして、抗癌剤のようなDNA損傷のストレスがDNAの２本鎖切断を引き起こすと、ATMの活性化・NEMOとの結合を介して、不活性型であるIKK複合体が活性化すると考えられている。この活性化したIKK複合体がIκBαをリン酸化することによってNF-κBが遊離し、標的遺伝子を転写することによって細胞死の阻害が起こる。今回の研究で、NF-κBのp65のリン酸化が抑制されていることから、RPAP3がNEMOと結合することによりIKK複合体に作用し、NF-κBのリン酸化を抑制することにより、その活性化を阻害していると推察される。またRPAP3発現株ではIκBαの分解抑制が認められたことからも同様のことが考えられる。以上、これら２種類の細胞においてRPAP3発現株の細胞死が促進されることが確認されたことから、RPAP3はNF-κB経路を阻害することにより抗癌剤の作用を増強していると示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

乳癌細胞株MCF-7およびT-47DにおけるDoxorubicinの細胞傷害性について調べたところ、いずれの細胞においてもRPAP3高発現株では細胞死の促進が認められた。T-47D細胞にDoxorubicin処置を行ったところ、p50およびp65の結合活性はともにRPAP3高発現株でNF-┤B経路の抑制が認められた。Doxorubicin処置後、リン酸化NF-┤B p65の活性抑制がRPAP3高発現株において認められた。Doxorubicin処置により初期段階で活性化され、その後分解されるIκBαは、RPAP3高発現株ではほとんど活性化されなかった。以上より、RPAP3は細胞生存に関与するNF-kB経路を抑制することにより、細胞死を促進することを明らかにした。