

Title	RPAP3はNF- κ B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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 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
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 2 4 4 6 7 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- κ B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- κ B(nuclear factor of κ B)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- κ B1(p105/p50)、NF- κ B2(p100/p52))が存在する。通常は、I κ B(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 (I κ B kinase) 複合体の活性化を介して I κ B が分解され、NF- κ B 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- κ B の活性上昇が惹起されるため、NF- κ B 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 (IKK γ) が結合することを見出した。この IKK 複合体は、IKK α 、 β 、 γ からなるサブユニットで、細胞質において I κ B α をリン酸化する。このリン酸化が I κ B α のプロテアソームによる分解を促進して、NF- κ B 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- κ B 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、プラスミジンにて選択的に 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) 3 μ M 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- κ B 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- κ B 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- κ B 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- κ B 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- κ B 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- κ B p65 の活性抑制が RPAP3 発現株において認められた。I κ B α 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- κ B が活性化されていることが報告されている。NF- κ B 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 I κ B α をリン酸化することによって NF- κ B 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- κ B 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- κ B 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 I κ B α の分解抑制が認められたことから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- κ B 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- κ B 経路の抑制が認められた。Doxorubicin 処置後、リン酸化 NF- κ 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 I κ B α 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- κ B 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。