

論文内容の要旨

PI3 キナーゼ/Akt 経路の特異的遮断を基盤とした 新規がん化学療法の開発

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻
細胞制御学研究室 藤原 雄介

【目的】細胞内における主要な生存シグナルである PI3 キナーゼ/Akt 経路の恒常的な活性化は、細胞がん化と密接に関連している。そこで本研究では、PI3 キナーゼ/Akt 経路の異常（恒常的活性化）が認められるヒトがん細胞株において、その選択的遮断が効果的な「制がん」に結びつく可能性を、特に様々な作用機序を持つ抗がん剤の細胞死誘導効果増強に注目して検討した。

【方法・結果】リン酸化 Akt 抗体を利用した解析より、ヒト神経膠芽腫由来細胞株（A172、T98G）、前立腺がん由来細胞株（LNCaP）等において、PI3 キナーゼ/Akt 経路が恒常的に活性化されている事を見いだした。次に、上記がん細胞において PI3 キナーゼに対する特異的阻害剤、LY294002(LY)等でそれを選択的に遮断したところ、若干の S 期細胞の減少/G₁ 期細胞の増加、および細胞増殖抑制を認めたが、それだけでは効果的な「制がん」に必須である細胞死の誘導には至らなかった。そこで、LY 処理で PI3 キナーゼ/Akt 経路を遮断した際、他の作用機序を持つ抗がん剤の細胞死誘導効果が増強される可能性を検討した。

まず、様々な DNA 傷害性抗がん剤（Doxorubicin、Topotecan、Mitomycin C、Etoposide、Cisplatin）の A172、LNCaP 細胞等に対する誘導死誘導効果が、LY 処理（PI3 キナーゼ/Akt 経路の特異的遮断）によって増強される可能性を、フローサイトメトリー法で DNA 含量の低下した sub-G₁ 期細胞（死細胞）の増加を指標として解析した。その結果、PI3 キナーゼ/Akt 経路の特異的遮断によって、Doxorubicin の細胞死誘導効果が選択的に増強される事、それは Doxorubicin の濃度が低い領域によって特に顕著である事を見出した。また、LY と Doxorubicin の併用によって、Caspase-3 の活性化、その基質である poly ADP-ribose

polymeraseの断片化が認められたこと等より、そこではアポトーシスが誘導されていることを確認した。なお、上記薬剤併用によってアポトーシスが增強されるがん細胞の条件として、PI3キナーゼ/Akt 経路が恒常的に活性化されている事の他に、p53経路が活性化される事が必須である事を見出した。この点は、p53 遺伝子に対する siRNA を利用してそれをロックダウンした際、上記両薬剤併用によるアポトーシス誘導がほぼ完全に抑制された事、Doxorubicin 以外の DNA 傷害性抗がん剤が、がん細胞において p53 経路の活性化を誘導しない事、等によって確認した¹⁾。

次に、微小管機能（チューブリンの重合/脱重合）を阻害することで、染色体分配を阻害する抗がん剤の細胞死誘導効果が、PI3 キナーゼ/Akt 経路の特異的遮断によって增強される可能性を、上と同様に解析した。その結果、LY はチューブリン脱重合阻害剤（Paclitaxel）の細胞死誘導効果もある程度增強するが、それはチューブリン重合阻害剤（Vincristine 等）との併用において特に顕著である事、Vincristine 単独では有意に細胞死を誘導しない低濃度領域において、LY と併用する事で極めて顕著な細胞死が誘導される事、Vincristine と LY の併用効果はPI3 キナーゼ/Akt 経路の恒常的活性化が認められるがん細胞において共通に認められる事、を見出した。また、Vincristine と LY の併用処理で誘導された細胞死がアポトーシスである事は、DNA-ladder の検出、Caspase-9/-3 等の活性化により確認した。次いで、上記薬剤併用による細胞死誘導增強の分子機構を、LY 単独処理で微小管構造が若干減弱する事より、特に Glycogen synthase kinase-3 β （GSK3 β ）の関与に注目して解析を進めた。これに関しては、GSK3 β は Akt によるリン酸化で不活性化される事、GSK3 β の生理的基質には微小管結合タンパク質（MAPs/Tau）が含まれている事、MAPs/Tau は GSK3 β によってリン酸化されることで微小管から遊離し、結果として微小管構造が不安定化される事、等が報告されおり、実際、T98G 細胞では LY 処理で Tau のリン酸化亢進を確認した。そこで GSK3 β の機能を阻害する LiCl の添加（T98G 細胞で Tau リン酸化のレベルの低下、微小管構造の安定化を確認）、あるいは GSK3 β 遺伝子に対する siRNA を利用してそれをロックダウンしたところ、LY と Vincristine の併用によって增強されたアポトーシス誘導

が有意に抑制された。これより、PI3 キナーゼ/Akt 経路の特異的遮断剤とチューブリン重合阻害剤の併用による細胞死誘導効果増強において、GSK3 β が重要な役割を果たしている事を見出した。

【考察】細胞内における主な生存シグナル、PI3 キナーゼ/Akt 経路の恒常的活性化が認められるがん細胞において、LY294002 等でそれを特異的に遮断すると、Doxorubicin およびチューブリン重合阻害剤の細胞死誘導効果が極めて顕著に増強される事を見出した。それは、上記各薬剤単独では有意な細胞死を誘導しない低濃度領域において特に顕著に認められた事より、PI3 キナーゼ/Akt 経路遮断剤との併用は、副作用を軽減した新規がん化学療法の開発に、新しい方向を提示するものと考えている。