

氏名・(本籍)	工藤 絵里奈 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 961 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Cisplatin inhibits AhR activation (シスプラチニによる AhR の活性阻害)
論文審査委員	(主査) 教授 廣川 誠 (副査) 教授 南谷 佳弘 教授 本山 悟

学位論文内容要旨

論文題目
(論文題目の和訳)

Cisplatin inhibits AhR activation
(シスプラチニによるAhRの活性阻害)

申請者氏名 工藤絵里奈

研究目的

芳香族炭化水素受容体 (Aryl Hydrocarbon Receptor, AhR)は、別名ダイオキシン類受容体とも呼ばれており、ダイオキシンなどの多環性芳香族化合物は、AhRによって仲介され、異物代謝酵素 P4501A1(CYP1A1)を誘導し、異物代謝を行う。AhRは不安定なタンパク質であり、細胞質内の分子シャペロン HSP90、及びそのコシャペロン XAP2、p23 と複合体を形成し、安定化する。ダイオキシン等のリガンド結合により活性化し、核移行後、異物応答配列 XRE と結合し、転写因子として作用する。AhR と HSP90 複合体の会合・解離様式は十分には解明されていない。AhR と HSP90 複合体の会合・解離様式を解明するために、HSP90 阻害剤である 17-(Dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG)、及びシスプラチニの影響を解析した。

研究方法

AhR タンパク質の発現・精製

AhR の bHLH ドメイン、及び転写活性領域欠損ドメイン(AhR- Δ -AD)は、GST-融合タンパク質として大腸菌で発現し、GST カラムを用いて精製した。

細胞培養・細胞生存率

ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞を、10% ウシ胎仔血清 (Equitech-Bio)、20 μ g/ml ストレプトマイシンおよび 20 単位/ml ペニシリン (GIBCO) を含む Dulbecco 改変イーグル培地 (DMEM) 37°C、5% CO₂ で培養した。細胞を 50 μ M のシスプラチニで 16 時間処理し、50 μ M の MG132 (プロテアソーム阻害剤) を 1 時間加え、新鮮な培地で 1 回洗浄した。シスプラチニ添加 24 時間前に、100 μ l の培地中、96 ウェルプレート中 1 ウェル当たり 2,500 個の密度で培養した。シスプラチニは、0-100 μ M の濃度で添加した。細胞生存率は、シスプラチニ投与 16 時後、PBS (リン酸緩

衝食塩水(-)) を添加し、MTT 法にて測定した。

CYP1A1 発現量

CYP1A1 の発現量は、細胞からトータル RNA を抽出し、逆転写後、逆転写 PCR (RT-PCR) 法にて定量した。

GST-プルダウンアッセイ

3 μ M の 3MC、50 μ M シスプラチニ、50 μ M 17-DMAG、1mM の ATP の存在下または非存在下で、2.5 μ M の GST-bHLH または GST-AhR- Δ AD または GST タンパク質を 2.5 μ M の HSP90 の溶液に加えた。37°C で 15 分間穏やかに回転させるローテーターを用いてインキュベートした。GST 樹脂に添加し、穏やかに回転させながら 4°C で 15 分間、次いで 4°C で 5,000rpm で 10 秒間回転させて上清を除去し、結合したタンパク質を SDS サンプル緩衝液中で 100°C で 5 分間煮沸することによって溶出させた。すべての GST プルダウンサンプルを SDS-PAGE (9% または 11% ゲル) で分離し、クーマシープリリアントブルー R-250 染色で検出した。

研究成績

AhR・分子シャペロン複合体に対するシスプラチニの影響

細胞中の AhR、HSP90、XAP2、及び p23 複合体に対するシスプラチニ (0~50mM) の効果を分析した。細胞内 AhR 含量は、50 μ M のシスプラチニで約 80% が減少した。シスプラチニの存在下での AhR 含量に対する MG132 の効果を解析した。50 μ M のシスプラチニ、及び MG132 の存在下で AhR タンパク質バンドが検出された。

AhR 活性化に対するシスプラチニの影響

CYP1A1 発現量について検討した。CYP1A1 は 2 時間から増加し、最大は 4 時間で生じた。次に、CYP1A1 発現に対するシスプラチニの影響を分析した。3MC の存在下で、指示されたシスプラチニを HeLa 細胞に添加し、CYP1A1 mRNA を RT-PCR およびアガロースゲル電気泳動によって分析した。50 μ M のシスプラチニ投与では、CYP1A mRNA レベルは約 20% まで減少した。

AhR-HSP90 複合体に対する ATP、シスプラチニ、及び 17-DMAG の影響

GST-AhR- Δ AD を用いた AhR-HSP90 複合体に対するリガンドの影響を確認した。AhR- Δ AD は AhR の全長近くにある (トランス活性化ドメインの欠失)。シスプラチニの存在下では、HSP90 は GST-AhR- Δ AD から解離した。

結論

AhR-HSP90 複合体の解離機構は不明であった。本研究において、HSP90 阻害剤シスプラチニが AhR-HSP90 複合体を解離させ、AhR をプロテアソーム系に誘導することを見い出した。抗がん剤であるシスプラチニが、AhR の活性化を阻害した。シスプラチニの抗がん剤治療を受けている患者さんは、毒物代謝機構が低下することが示唆された。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主査：廣川 誠

申請者：工藤絵里奈

論文題名：英文（和訳）Cisplatin inhibits AhR activation（シスプラチニによるAhRの活性阻害）

要旨

芳香族炭化水素受容体（aryl hydrocarbon receptor, AhR）は basic helix-loop-helix-per-arnt-sim (bHLH-PAS) ファミリーに属する転写因子で、ダイオキシンなどの芳香族化合物をリガンドとして結合し、P4501A1 (CYP1A1) を誘導することにより異物代謝に関与する。細胞質内においては分子シャペロンである HSP90、XAP2 および p23 結合して安定化した複合物として存在するが、リガンドと結合した後核内移行し、ARNT と一緒に複合体を形成して転写調節領域の XRE 配列に結合し、CYP1A1 の転写を活性化する。AhR の機能調節に HSP90 との会合・解離は極めて重要であるがそのメカニズムは解明されていなかった。申請者らは AhR と HSP90 の会合・解離メカニズムを明らかにするために、HSP90 の阻害薬であるシスプラチニおよび geldanamycin (17-DMAG) を利用して AhR の代謝および CYP1A1 の発現を解析した。

50mM 濃度のシスプラチニ存在下で AhR の細胞質内濃度は減少したが、HSP90、XAP2、p23 に発現量は変化しなかった。シスプラチニによる AhR 細胞内濃度減弱作用はプロテアソーム阻害剤 (MG132) により抑制された。このことはシスプラチニ存在下で AhR は HSP90 を中心とするシャペロンから解離してプロテアソーム系で代謝されることを示唆している。AhR リガンドの刺激により細胞内 CYP1A1 mRNA の発現が亢進するが、この作用はシスプラチニにより抑制された。AhR の bHLH からなる変異タンパク質 (bHLH) および転写活性領域を欠失した変異タンパク質 (Δ AD) を用いて HSP90 との結合様式を解析したところ、 Δ AD と HSP90 の結合はシスプラチニにより阻害されることが判明した。

以上より申請者らは、シスプラチニは AhR と HSP90 の結合に干渉することによってプロテアソーム系による AhR の代謝を促進し、AhR の機能を抑制すると結論した。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斩新さ

芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) と HSP90 の結合様式を明らかにし、シスプラチニがそのプロセスに干渉することによって AhR の機能阻害することを見出したのは本研究が初めてである。

2) 重要性

本研究はシスプラチニが AhR と HSP90 の結合に競合することによってプロテアソーム系による AhR の代謝を促進し、AhR の機能を抑制することを明らかにし、HSP90 が分子シャペロンとして蛋白の成熟や機能制御に関わっているという新たな事実を追加した。本研究の知見はシスプラチニの投与を受けている患者において芳香族炭化水素受容体が関与する物質の代謝、ならびに CYP1A1 による薬剤の代謝が変化していることを容易に想像させ、シスプラチニを含む化学療法における有害事象のマネジメントを向上させることに貢献する臨床的にも極めて重要な内容と考えられる。

3) 研究方法の正確性

蛋白質の精製および生化学的解析手法、リコンビナント蛋白の合成手法、細胞生物学的解析方法は標準的かつ正確であり、結果の解釈ならびにディスクッションも適切である。

4) 表現の明瞭さ

これまで明らかにされていなかったシスプラチニの芳香族炭化水素受容体の代謝と機能に及ぼす影響とそのメカニズムに関する学術的背景、本研究の目的、研究方法、実験結果、考察を簡潔、かつ明瞭に記載していると考える。以上より、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。