

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	病態制御科学領域 分子生体防御学教育研究分野 叶鵬
<p>Nrf2- and ATF4-Dependent Upregulation of xCT Modulates the Sensitivity of T24 Bladder Carcinoma Cells to Proteasome Inhibition</p> <p>(Nrf2 と ATF4 依存的な xCT 誘導による T24 膀胱癌細胞のプロテアソーム阻害に対する感受性の制御)</p>	
<p>目的</p> <p>プロテアソーム阻害剤は細胞死を含む多くの生理作用を示すことが知られている。そのため、プロテアソーム阻害剤のいくつかは現在、抗癌剤として利用されているが、癌細胞の種類によってその感受性は異なることが知られている。効果的な化学療法のためには、プロテアソーム阻害剤感受性の制御メカニズムを知ることが重要である。</p> <p>以前の研究から、我々は T24 膀胱癌細胞においてプロテアソーム阻害剤処理によってシスチントランスポーターのサブユニットである xCT が強く誘導されることを見出していた。xCT は細胞内へのシスチンの取り込みに機能しているが、近年、癌細胞の生存を促すことが示されている。本研究の目的は、膀胱癌細胞におけるプロテアソーム阻害剤による xCT 誘導のメカニズムを解明し、プロテアソーム阻害剤感受性における xCT の役割を明らかにすることにより、プロテアソーム経路と xCT 経路両方を標的とした新規膀胱癌治療ストラテジーの有用性を探る。</p> <p>方法</p> <p>細胞として、T24 膀胱癌細胞を主に用いた。プロテアソーム阻害剤としては主にボルテゾミブ (BTZ) を用いた。</p> <p>(1) xCT mRNA 発現は RT-qPCR 法で調べた。また、xCT タンパク質発現はイムノブロット法で解析した。</p> <p>(2) プロテアソーム阻害剤による xCT 誘導に対する、転写因子 Nrf2、又は ATF4 の関与を、Nrf2 及び ATF4 siRNA によるノックダウンにより調べた。</p> <p>(3) ヒト xCT 遺伝子上の Nrf2 又は ATF4 の作用するシスエレメントを xCT 遺伝子プロモーター及び、第 2 イントロンを用いたレポーター解析、あるいは、Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP アッセイ) により調べた。Nrf2 および ATF4 の相互作用は、ChIP アッセイ及び GST プルダウンアッセイによって調べた。</p> <p>(4) プロテアソーム阻害剤感受性は、細胞生存率で評価した。プロテアソーム阻害剤感受性に対する xCT の効果については、xCT siRNA を用いたノックダウン、又は xCT 阻害剤 (スルファサラジン (SASP)、(S)-4-カルボキシフェニルグリシン (CPG)) を用いて調べた。細胞内のシステインとグルタチオン (GSH) 濃度は、高速液体クロマトグラフィーで解析した。</p>	
<p>結果</p> <p>(1) プロテアソーム阻害剤処理により、T24 細胞では時間依存的、濃度依存的に xCT mRNA、xCT タンパク質両方の誘導が見られた。このことから、プロテアソーム阻害により xCT 遺伝子発現が上昇すると考えられた。</p>	

- (2) 以前の報告から、マウス *xCT* 遺伝子発現調節において、酸化ストレス応答性の転写因子である NF-E2 related factor 2 (Nrf2) と、アミノ酸飢などのストレス応答性の転写因子である activating transcription factor 4 (ATF4) が関わることが示唆されている。T24 細胞においてプロテアソーム阻害剤処理によって Nrf2 と ATF4 が活性化されるかどうかイムノブロットにより調べたところ、どちらも強く誘導されることが示された。レポーター解析と ChIP アッセイの結果から、Nrf2 がヒト *xCT* 遺伝子のプロモーター領域と第 2 インترون上にそれぞれひとつずつ存在する ARE (antioxidant response element) に結合すること、ATF4 がプロモーター上に存在する二つの AARE (amino acid response element) に結合することが分かった。また、この時、Nrf2 と ATF4 が相互作用し、協調的に働くことが示唆された。
- (3) T24 細胞において、*xCT* siRNA を用いたノックダウンを行った結果、*xCT* ノックダウン時には、プロテアソーム阻害剤処理時の細胞生存率がコントロールに比べ減少した。また、*xCT* ノックダウンによって定常時の細胞内システイン量が減少し、それに伴ってグルタチオン量も減少した。一方、プロテアソーム阻害剤処理により細胞内システインおよび、グルタチオン量が増加するが、*xCT* のノックダウンにより増加量は著しく減少した。また、*xCT* の阻害剤である SASP や CPG 前処理によっても、*xCT* ノックダウンと同様にプロテアソーム阻害剤処理時の細胞内システインとグルタチオン濃度が大幅に減少し、プロテアソーム阻害剤に対する感受性は増加した。
- (4) T24 細胞のプロテアソーム阻害剤による細胞生存率の低下は、抗酸化物質である *N*-acetyl-L-cysteine により抑制された。

結論

以上の結果から、

- (1) T24 細胞におけるプロテアソーム阻害剤による *xCT* の誘導は、遺伝子発現レベルで行われ、*xCT* 遺伝子発現誘導は、転写因子 Nrf2 と ATF4 が協調して行うと考えられる。
- (2) *xCT* のノックダウンあるいは *xCT* 阻害剤による *xCT* 経路の阻害によって、T24 細胞のプロテアソーム阻害剤感受性が増加する。
- (3) プロテアソーム阻害によって誘導された *xCT* は、細胞内のシステイン、グルタチオン量を増加させ、酸化ストレスを低減することによりプロテアソーム阻害剤感受性を低減していると考えられる。
- (4) プロテアソーム経路と *xCT* 経路両方を標的とした化学療法は、膀胱癌治療において有効である可能性がある。