

## 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 内分泌代謝内科学教育研究分野 中田 有紀
<p>(論文題目)</p> <p><b>Inhibitory effects of trichostatin A on adrenocorticotrophic hormone production and proliferation of corticotroph tumor AtT-20 cells</b> (Trichostatin AによるAtT-20腫瘍細胞におけるACTH産生と細胞増殖の抑制作用)</p>	
<p><b>【目的】</b> クッシング病は、adrenocorticotrophic hormone (ACTH) 産生下垂体腫瘍によって引き起こされるが、薬剤による有効な治療法は、現在まで確立されていない。Pituitary tumor-transforming gene 1 (PTTG1) は、下垂体腫瘍を含む腫瘍細胞で発現が亢進しているとされ、細胞周期や細胞増殖を促進させる腫瘍遺伝子である(1)。Histone deacetylase (HDAC) 阻害剤は、PTTG1 mRNA 抑制作用があるとされ、trichostatin A (TSA) は強力な HDAC 阻害剤である(2)。本研究では、TSA による下垂体 AtT-20 腫瘍細胞における ACTH 産生及び細胞増殖抑制効果を調べ、更に、同効果における PTTG1 の関与について検討した。</p> <p><b>【対象と方法】</b> マウス下垂体 ACTH 産生 AtT-20 細胞を継代培養し、TSA を添加し、proopiomelanocortin (POMC) mRNA および PTTG1 mRNA 発現量を定量 PCR 法で測定した。培養液中 ACTH 濃度を ELISA 法で測定した。WST-8 法で細胞増殖の変化を、Cell Death Detection ELISA Kit を使用して DNA fragmentation を検出し、アポトーシスを評価した。PTTG1 siRNA により PTTG1 発現をノックダウンさせ、細胞増殖への影響について検討した。統計学的処理は、ANOVA または unpaired Student's t-test を用いて、<math>P &lt; 0.05</math> をもって有意とした。</p> <p><b>【結果】</b> AtT-20 細胞において、<math>1 \mu\text{M}</math> TSA の添加によって、POMC mRNA は経時的に低下した。また、用量依存的な低下を認め、<math>100\text{nM}</math>– <math>1 \mu\text{M}</math> で有意差がみられた。培養液中 ACTH 濃度も同様に、TSA 添加により用量依存的に低下した。TSA と dexamethasone はいずれも POMC mRNA を低下させたが、TSA による POMC mRNA の低下作用は、dexamethasone を同時に投与しても変化を認めなかった。TSA 添加により、AtT-20 細胞の増殖抑制を認め、<math>100\text{nM}</math>– <math>10 \mu\text{M}</math> で有意差を認めた。また、TSA による DNA fragmentation の増加を認め、同様に <math>100\text{nM}</math>– <math>10 \mu\text{M}</math> で有意差を認めた。FACS 解析では、TSA 添加後、G0/G1 期の細胞の割合が増加し、S 期の細胞の割合は減少した。PTTG1 mRNA は、<math>1 \mu\text{M}</math> TSA 添加により経時的に低下し、また、用量依存的な低下を認めた。PTTG1 siRNA により PTTG1 発現をノックダウンさせると、細胞増殖は抑制され、更に POMC mRNA 及び ACTH 濃度の低下を認めた。</p> <p><b>【考察】</b> HDAC 阻害剤である TSA は、POMC mRNA と培養液中 ACTH 濃度を低下させた。これらの結果より、同 HDAC 阻害剤は ACTH 産生腫瘍細胞において ACTH の合成及び分泌を抑制させると考えられた。また、TSA は POMC mRNA を低下させ、その効果はグルココルチコイド存在下でも変化を認めなかったため、生体内でグルココルチコイド過剰状態においても有効な可能性が示唆された。TSA は AtT-20 細胞増殖を低下させ、</p>	

DNA fragmentation を増加させたことから、アポトーシスを誘導すると考えられた。FACS 解析で G0/G1 期の細胞が増加していた。TSA は細胞周期の進行を G0/G1 期で停止させることにより細胞増殖を抑制すると考えられた。HDAC 阻害剤の効果として、PTTG1 mRNA を抑制することが示されてきている。PTTG1 は細胞増殖促進作用に関わるとされ、下垂体 gonadotropin 産生細胞では、PTTG1 の過剰発現が同細胞増殖に寄与しているとの報告がある(3)。AtT-20 細胞で PTTG1 をノックダウンさせると、細胞増殖が阻害され、また POMC mRNA と ACTH 濃度も低下した。よって、PTTG1 の発現抑制は、細胞増殖や ACTH 産生の抑制に関与することが示唆された。

以上より、下垂体 ACTH 産生腫瘍細胞で、HDAC 阻害剤である TSA は、PTTG1 の発現抑制を介して、細胞増殖及び ACTH 合成/分泌を抑制させることが示された。

#### 【参考文献】

- 1) Chesnokova V, Zonis S, Wawrowsky K, Tani Y, Ben-Shlomo A, et al. (2012) Clusterin and FOXL2 act concordantly to regulate pituitary gonadotroph adenoma growth. *Mol Endocrinol* 26: 2092-2103.
- 2) Hernández A, López-Lluch G, Navas P, Pintor-Toro JA (2009) HDAC and Hsp90 inhibitors down-regulate PTTG1/securin but do not induce aneuploidy. *Genes Chromosomes Cancer* 48: 194-201.
- 3) Chesnokova V, Zonis S, Zhou C, Ben-Shlomo A, Wawrowsky K, et al. (2011) Lineage-specific restraint of pituitary gonadotroph cell adenoma growth. *PLoS One* 6: e17924.