

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	腫瘍制御科学領域 婦人科腫瘍学教育研究分野 氏名 山内愛紗
<p>(論文題目)</p> <p>Functional role of tau protein in epithelial ovarian cancer cells (上皮性卵巣癌細胞におけるタウ蛋白の機能)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>卵巣癌患者や再発卵巣癌患者には、術前化学療法や術後化学療法としてパクリタキセルと白金製剤による化学療法がよく用いられる。パクリタキセルは微小管のβチューブリンに結合し、微小管を安定させることで細胞分裂を阻害し、細胞増殖抑制効果を発揮する。微小管関連蛋白タウ (MAPT) は過剰なリン酸化によりアルツハイマー病の原因となることが有名である。MAPTは微小管結合部位を持ち、パクリタキセルと同様に微小管のβチューブリンに結合することで微小管の重合を調整している。MAPTとパクリタキセルは微小管への結合部位が同じであるために競合する関係にあり、MAPTがパクリタキセルの感受性のマーカーとなる可能性がある。近年MAPTが乳癌や卵巣癌において、パクリタキセル感受性のマーカーになりうるという報告がされている。そこで本研究の目的は上皮性卵巣癌細胞におけるタウ蛋白の機能を明らかにすることとした。</p> <p>【方法】</p> <ol style="list-style-type: none"> 複数の卵巣癌細胞株 (OVCAR3、DISS、HRA、OVISE、TOV112D、MCAS) を用いて、タウ蛋白の発現レベルをウェスタンブロット法を用いて検討した。 1でタウ蛋白の発現がもっとも強かった上皮性卵巣癌細胞株 TOV112D とタウ蛋白の発現が認められなかった細胞株 HRA において MAPT DNA を導入することで、コントロール群と比較してパクリタキセルの細胞増殖抑制効果に差があるか cell counting Kit-8 を用いて、細胞増殖率を比較した。また、1でタウ蛋白の発現がもっとも強かった TOV112D とタウ蛋白の発現がわずかに認められた OVCAR3 において、MAPT siRNA を導入することでパクリタキセルの細胞増殖抑制効果に差があるか、同じく cell counting Kit-8 を用いて、細胞増殖率を比較した。 TOV112D において、MAPT DNA や MAPT siRNA を導入することでタウ蛋白を過剰発現、もしくはダウンレギュレーションさせた場合に細胞のアポトーシス率が変化するかどうかを、フローサイトメトリーを用いて検討した。 <p>【結果】</p> <ol style="list-style-type: none"> タウ蛋白の発現が最も高い細胞株は類内膜腺癌細胞株の1種である TOV112D 細胞であった。次いで漿液性腺癌細胞株の1種である OVCAR3 細胞でわずかにタウ蛋白の発現が認められたが、そのほかの細胞株ではタウ蛋白の発現は認められなかった。 タウ蛋白発現が強かった TOV112D 細胞において、パクリタキセル濃度 0,1,10 ug/ml の場合に MAPT DNA 導入群の方が有意差を持って細胞増殖抑制効果が増強した。一方タウ蛋白発現が認められなかった HRA 細胞においては TOV112D 細胞と同様の現象は認められなかった。MAPT siRNA 導入実験においては、TOV112D 細胞で、パクリタキセル濃度 0,1,10 ug/ml の場合にコントロール群に比較して si 	

RNA 導入群の方が有意に細胞増殖を抑制した。タウ蛋白発現レベルの低かった OVCAR3 細胞では同様の現象は認められなかった。

3. 細胞周期実験では TOV112D 細胞に MAPT DNA もしくは MAPT siRNA を導入した場合、コントロールに比較してアポトーシスにあたる sub G1 期細胞の割合が有意に増加していた (コントロール 4.1%、MAPT DNA 29%、MAPT siRNA 11.7% いずれも $p < 0.05$)。また Annexin-V 染色と PI 染色によるアポトーシス細胞の検討では、細胞周期実験同様に MAPT DNA もしくは MAPT siRNA を導入した場合、コントロールに比較してアポトーシス細胞の割合が有意に増加していた (コントロール 12.8%、MAPT DNA 72.8%、MAPT siRNA 29.9% いずれも $p < 0.05$)。

【考察】

1 の実験結果よりタウ蛋白の発現レベルは細胞の種類により異なる可能性が示唆された。しかし組織型とタウ蛋白発現レベルに有意な相関はなかったという報告もあり、タウ蛋白の発現は個人差がある可能性もある。タウ発現レベルに個人差、または細胞種による違いがある理由は不明である。タウ蛋白は前述したようにパクリタキセルと競合する関係にあることから、タウ蛋白の発現が多い場合パクリタキセルの効果が減弱することが予想されたが、TOV112D 細胞においては MAPT DNA または MAPT siRNA を導入した場合、パクリタキセルの作用なしでも細胞増殖が抑制されることがわかった。我々はこの現象に着目した。実験 3 の結果によると MAPT DNA または MAPT siRNA どちらを導入した場合でも、コントロールに比してアポトーシスが増加していることがわかった。タウ蛋白は微小管の重合や脱重合を調整していることから、MAPT DNA を導入した場合は重合が促進されて、脱重合が阻害されることにより、細胞分裂が抑制されアポトーシスに陥るのではないかと推測する。また MAPT siRNA を導入した場合は、微小管の重合自体が阻害されて細胞分裂できず、アポトーシスに陥るのではないかと推測する。アポトーシス率は MAPT DNA 群が MAPT siRNA 群より高くなっており、MAPT DNA 導入による細胞増殖抑制効果の方がより強いものと推測される。

【結語】

タウ蛋白の過剰発現もしくはダウンレギュレーションによりアポトーシスが増え、細胞増殖が抑制されることがわかった。今後新たな分子標的治療へ応用できる可能性が示唆された。