

論文第190号


(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Ras-mediated Up-regulation of Survivin Expression in Cytokine-dependent
Murine Pro-B Lymphocytic Cells

(サイトカイン依存性マウス B リンパ球前駆細胞における Ras 癌遺伝子による
survivin の発現)

氏 名 新城哲治 

【目的】

survivin はアポトーシス抑制因子の一つである。survivin は悪性腫瘍で発現する。survivin は有糸分裂時の細胞周期を調節し、アポトーシスを抑制する。survivin の発現は治療抵抗性と予後の悪化に関連する。造血細胞で Ras 経路が活性化し survivin が発現する。サイトカイン依存性マウス B リンパ球前駆細胞に Ras 遺伝子を導入し、survivin の発現機構を解析した。

【方法】

① Baf-3 細胞に Ras 遺伝子の変異体である Ras(G12V)及び Ras(G12V/V45E)遺伝子を導入した。Baf-3 細胞はインターロイキン 3 (IL-3) 依存性マウス B リンパ球前駆細胞である。② Ras(G12V)発現細胞で mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路と phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K) 経路を解析した。③ Ras(G12V/V45E)発現細胞で PI3-K 経路を解析した。④ Ras 発現細胞に MAPK、PI3-K 及び

mammalian target of rapamycin (mTOR)経路の阻害剤を加え survivin の発現を解析した。⑤ survivin の発現を immunoblot で検討した。⑥ Ras 発現細胞をエルトリエーション法にて各細胞周期 (G1、G2/M、S 期) に分離した。⑦ 分離した各細胞周期の細胞の survivin の発現を検討した。⑧ survivin プロモーター領域を含むルシフェラーゼ発現プラスミドの欠失変異体を作成した。これらのプラスミドを Ras 発現細胞に導入しルシフェラーゼアッセイを行った。

【結果】

① Ras 発現細胞で survivin の持続的な発現を認めた。② MAPK と PI3-K 経路による survivin の発現は各々独立している。MAPK と PI3-K は独立に survivin の発現を誘導した。③ PI3-K 経路の下流では mTOR 経路が survivin の発現を誘導した。④ survivin の発現に Akt 経路は関与していなかった。⑤ Baf-3 親株細胞では G2/M 期に優位に survivin の発現が認められた。⑥ Ras 遺伝子を導入しても G2/M 期優位の

survivin 発現は変化しなかった。⑦プロモーター解析では転写開始点より 124 塩基から 190 塩基の間に存在するエンハンサー領域が Ras 遺伝子による survivin の発現増強に関与していた。

【考察】




Bim は BH3-アポトーシス誘導因子である。Baf-3 細胞では MAPK 及び PI3-K/mTOR 経路は Bim の発現を抑制し、Akt 経路は関与しない。Ras による survivin の発現亢進は MAPK 及び PI3-K/mTOR 経路を介したもので、Akt 経路は関与しておらず、Bim の発現抑制と survivin の発現促進が同じ経路を介している。Ras 発現細胞でも G2/M 期優位 survivin の発現は維持されていた。Ras 経路は -190 から -124 塩基の間に存在する CDE エLEMENTの転写を特異的に亢進するため細胞周期依存性は維持される。

【結語】

Ras 経路の活性化による survivin の発現増強の機序を解明した。

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 第 号 論文博	氏名	新城 哲治
論文審査委員	審査日	平成 20 年 9 月 19 日	
	主査教授	藤田 次郎 	
	副査教授	森 直樹 	
	副査教授	苅谷 研一 	
(論文題目)			
Ras-mediated Up-regulation of Survivin Expression in Cytokine-dependent Murine pro-B Lymphocytic Cells.			
(論文審査結果の要旨)			
<p>上記論文に関して、研究に至る背景、研究内容、研究成果の意義、学術的水準について検討し、以下のような審査結果を得た。</p>			
<p>1. 研究の背景</p> <p>survivin はアポトーシス抑制因子の一員であり、悪性腫瘍において発現するため広く研究が行われている。survivin は有糸分裂時の細胞周期の調節、アポトーシスの抑制などの機能を持っている。臨床研究では survivin の発現は治療抵抗性と予後の悪化に関連していることが明らかになっている。最近、造血細胞において Ras 経路の活性化による survivin の発現の増強が報告された。本研究は Ras 下流の経路による survivin の発現機序を検討している。さらに survivin のプロモーター領域の解析、各細胞周期の発現も検討しており、Ras による survivin の発現メカニズムを詳細に解析している。</p>			
<p>2. 研究内容</p> <p>サイトカイン依存性マウス B リンパ球前駆細胞である Baf-3 細胞に Ras 遺伝子変異体を導入した。Ras(G12V)により mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路と phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)経路の両者を活性化、Ras(G12V/E45E)により PI3-K 経路を活性化した。その際の survivin の発現を比較検討し、以下の新たな知見を得た。</p>			

- (1) Ras 経路の下流では MAPK 経路と PI3-K 経路の両者が独立して survivin の発現を誘導する。
- (2) PI3-K 経路下流では mammalian target of rapamycin (mTOR)経路が survivin の発現に関与していた。
- (3) エルトリエーション法にて各細胞周期ごとに分離した細胞では survivin の発現は Baf-3 親株細胞において G2/M 期に強く認められたが、Ras 発現細胞でもその発現は同様である。
- (4) survivin のプロモーター領域の解析では cis 作用領域が Ras のシグナルに関与しており、Ras は特異的なエンハンサーエレメントを介して survivin の転写を促進している。

3. 研究成果の意義と学術水準

本研究は Ras 経路による survivin の発現機序を解析している。Ras 遺伝子変異体を使う事によって選択的に Ras 下流の経路による survivin の発現を解析することができた。また survivin の発現誘導が転写活性の増強によるものであることを初めて示した論文である。survivin を標的として種々の治療法が検討されているが本研究成果は腫瘍発生の機序の解明のみならず治療法の研究にも有用であり、学術的にも貴重である。

以上により、本論文は学位授与に十分に値するものであると判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
 - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
 - 3 *印は記入しないこと。