

論文内容要旨

細胞周期を制御する PRIP 機能の解析研究

主指導教員：入船 正浩 教授
(医歯薬保健学研究科 歯科麻酔学)

副指導教員：兼松 隆 教授
(医歯薬保健学研究科 細胞分子薬理学)

副指導教員：香西 克之 教授
(医歯薬保健学研究科 小児歯科学)

前谷 有香

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

細胞は細胞周期の G1 期において、細胞増殖刺激や細胞分裂抑制シグナルの強度バランスを判断し、細胞運命を決定する。この情報伝達機構の 1 つに AKT-GSK3B 伝達経路がある。増殖因子刺激によってホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) が活性化されると、ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 [PI(4,5)P₂] が、ホスファチジルイノシトール 3,4,5-トリリン酸 [PI(3,4,5)P₃] に代謝される。AKT は細胞膜の PI(3,4,5)P₃ に結合して移動し、ホスホイノシチド依存性キナーゼ 1 (PDK1) 等により活性化され、グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3B (GSK3B) をリン酸化して不活化し、相対的にサイクリン D1 の量が増え細胞周期が進行するという制御を示す。一方、静止期の細胞は GSK3B が活性化状態にあり、サイクリン D1 の分解を促して細胞周期進行を抑制する。すなわち、細胞周期進行のエンジンとして働くサイクリン D1 の情報伝達機構を制御する機構は、細胞分裂の開始を決定する重要な役割を担う。

申請者の研究グループは、PLC-related catalytically inactive protein (PRIP) という、PLC と似たドメイン構造を持ちながら PLC 酵素活性を持たない分子の細胞膜リン脂質代謝機構について研究してきた。PRIP は、PI(4,5)P₂ に結合し PI3K による PI(4,5)P₂ から PI(3,4,5)P₃ への代謝を調節する分子である。そこで、本研究では PRIP が PI(4,5)P₂ シグナルの下流で活性化される AKT-GSK3B 伝達経路を介し細胞周期を制御するのではないかと仮説を立てた。

PRIP には PRIP1 と PRIP2 の二つのサブタイプがある。まず、PRIP が PI(4,5)P₂ から PI(3,4,5)P₃ への産生に影響するかを調べた。*Prip1*, *Prip2* ダブルノックアウトマウスから調整したマウス線維芽細胞 (*Prip*-KO MEF) から抽出したリン脂質に含まれる PI(3,4,5)P₃ 量をドットプロット法で解析した結果、*Prip*-KO MEF では PI(3,4,5)P₃ 産生が亢進した。そこで PRIP が細胞周期に与える影響を検討するため、ヒト乳癌細胞 MCF7 (*PRIP1*⁺, *PRIP2*⁺) に対して siRNA を用いて *PRIP2* をノックダウンした si*PRIP2*-MCF7 を作製し、フローサイトメトリー解析を行った。その結果、si*PRIP2*-MCF7 では G1 期の細胞の割合が減少していた。逆に PRIP1 を過剰発現させた PRIP1-MCF7 を作製し同様に解析したところ、G1 期の細胞の割合が増加した。次に細胞外の増殖因子刺激強度が PRIP に仲介される細胞周期の進行に影響するかを検討するため、培地に添加する FBS 濃度を変えてフローサイトメトリー解析を行なった。10% FBS もしくは 2% FBS 存在下で解析した結果、PRIP の有無による G1 期での解析結果の差が 2% FBS 存在下でより顕著であった。この結果から、PRIP が細胞周期の G1 期から S 期への進行を負に制御し、その抑制調節は増殖因子が希薄な環境で顕著になることが明らかとなった。

PRIP の G1 期の調節が AKT-GSK3B 伝達経路を介するかを検討するためウェスタンブロット解析を行った。si*PRIP2*-MCF7 では、AKT-GSK3B 情報伝達経路は正に制御されサイクリン D1 の発現が亢進し、細胞周期がより活性化されていた。一方 PRIP1-MCF7 では、AKT-GSK3B 情報伝達経路は負に制御されサイクリン D1 の発現レベルが減少し、細胞周期の進行が抑えられていた。MEF やヒト乳癌細胞 HeLa を用いて検討し同様の結果を得ており、PRIP が仲介する細胞分裂抑制機構は、一般的な細胞機能であると考えられた。

PRIP は細胞周期の G1 期の分子機構を制御することが分かった。そこで PRIP が細胞増殖に与える影響を細胞数の計測により検討した。その結果、2% FBS 存在下では PRIP1-MCF7 の細

胞増殖が抑制された。また、EGFP-PRIP1-MCF7 でゼノグラフトモデルを作製し腫瘍塊形成能を解析したところ、EGFP-PRIP1-MCF7 の腫瘍成長が著しく抑制された。

本研究で、PRIP は AKT-GSK3 β 伝達経路を介し細胞周期の進行を負に制御し、癌細胞などの増殖を抑制することを明らかにした。PRIP 発現による細胞分裂の制御効果は、細胞外刺激が弱い場合に顕著に見られることから、血管新生が乏しく十分に増殖因子が届かない腫瘍に対し PRIP 機能ドメインを過剰に発現させるといった治療法を開発することにより、癌細胞増殖を抑制できる可能性がある。