

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
沖 香 奈 子	主 査 教 授 勝 岡 洋 治 副 査 教 授 芝 山 雄 老 副 査 教 授 朝 日 通 雄 副 査 教 授 岡 田 仁 克
主論文題名 Riluzole induces apoptotic cell death in human prostate cancer cells <i>via</i> endoplasmic reticulum stress (Riluzole のヒト前立腺癌細胞に対する小胞体ストレスによるアポトーシス誘導能)	
学位論文内容の要旨	
<p>《目 的》</p> <p>前立腺癌の患者数は年々増加傾向にあり、アンドロゲン非依存性癌として再発した場合の予後は悪く、治療法も確立していない。Riluzole は Na⁺チャネル阻害作用と K⁺チャネル活性化作用を有し、細胞容量調節や細胞増殖・分化・死の制御にも重要な役割をもつ化合物として知られている。Riluzole をはじめとするイオンチャネル作動薬は、種々の癌細胞に対して細胞周期や細胞増殖に影響を及ぼし、またアポトーシスを誘導し、癌の治療薬として期待されているが、そのアポトーシス経路について詳細に検討した報告はない。そこで本研究では Riluzole の前立腺癌細胞に対するアポトーシス誘導能とその経路について詳細に検討した。</p> <p>《方 法》</p> <p>細胞株にはアンドロゲン依存性 (LNCaP) およびアンドロゲン非依存性 (C4-2) のヒト前立腺癌細胞を用いた。0~50μM の濃度範囲の Riluzole を添加し、24 および 48 時間後の細胞生存率を求めた。細胞生存率が約 50%を示した濃度を以下の実験に用いた。Riluzole による細胞増殖抑制を解析するために、BrdU 標識率を指標とした DNA 合成を測定した。細胞死を定量的に解析するために TUNEL 染色を行い、陽性細胞数を測定した。アポトーシス経路を特定するために、Caspase-3、8 および 9 の活性測定、ミトコンドリア膜電位の測定、チトクローム <i>c</i> の細胞質への放出の測定ならびに Bid の限定分解の解析を行った。また、Caspase-3、8 および 9 の特異的阻害剤を用いて、Riluzole による細胞死の回復を検討した。次いで小胞体ストレスによる経路を調べるために、Caspase-4 の活性測定、Caspase-4 特異的阻害剤による細胞死の回復を測定した。さらに、細胞死の形態を透過型電子顕微鏡を用いて観察し、カルシウムの細胞質中への放出を Fluo-3 を用いた蛍光染色により観察した。</p> <p>《結 果》</p> <p>Riluzole 添加後、24 および 48 時間後の生存率を検討したところ、LNCaP および C4-2 細胞株ともに濃度依存的に細胞生存率が減少した。BrdU 標識率では、Riluzole の 10μ M および 50μ M で、両細胞株ともに濃度依存的に DNA 合成の有意な低下が観察された。TUNEL 染色では、Riluzole 処置により、両細胞株で TUNEL 陽性細胞の有意な増加が示めされた。Caspase 活性測定では、Riluzole 処置の両細胞株で Caspase-3、8 および 9 活性の上昇がみられたが、ミトコンドリア膜電位の低下、チトクローム <i>c</i> の放出、Bid の限定分解は観察されなかった。Caspase-3、8 および 9 の特異的阻害剤による細胞死の回復を観察したところ、細胞死の有意な回復がみられた。次いで Caspase-4 の活性測定では、Riluzole により両細胞株で Caspase-4 活性の有意な上昇が示され、Caspase-4 特異的阻害剤により、細胞死の有意な回復が観察された。電子顕微鏡で細胞死の形態を観察したところ、Riluzole 添加した細胞では、内腔が拡張し電子密度が上昇しているものや、配列の乱れや網目状を呈している小胞体が観察された。また、Riluzole 処置</p>	

後の細胞では、細胞質中のカルシウムは増加傾向にあった。

《考 察》

Riluzole はヒト前立腺癌のアンドロゲン依存性・非依存性の両細胞株に対して、細胞増殖を抑制し、小胞体ストレスを介したアポトーシスを誘導した。近年の報告では、Caspase-4 の活性化が Caspase-9 および 3 の活性化を引き起こすと報告されている。これまで薬剤で誘導されたアポトーシスの多くはミトコンドリア経路が主であることが知られているが、本研究では、小胞体ストレスを介したアポトーシス誘導経路を明らかにした。また、Riluzole が悪性度の高いアンドロゲン非依存性の前立腺癌にもアポトーシスを誘導したことから、Riluzole が前立腺癌の有効な治療薬として期待されると考えている。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	沖 香 奈 子
論文審査担当者		主 査 教 授 勝 岡 洋 治 副 査 教 授 芝 山 雄 老 副 査 教 授 朝 日 通 雄 副 査 教 授 岡 田 仁 克	
主論文題名 Riluzole induces apoptotic cell death in human prostate cancer cells <i>via</i> endoplasmic reticulum stress (Riluzole のヒト前立腺癌細胞に対する小胞体ストレスによるアポトーシス誘導能)			
論文審査結果の要旨			
<p>本研究はアンドロゲン依存性ならびに非依存性前立腺癌細胞に対して、Riluzole の細胞増殖抑制効果、アポトーシス誘導能とその経路について詳細に検討したものである。その結果、Riluzole の投与に対して両細胞株は、①アンドロゲン依存性ならびに非依存性の両前立腺癌細胞に対して、細胞増殖抑制を示し、アポトーシスを誘導した。②Caspase-3、8、9 活性の上昇が示されたが、ミトコンドリア膜電位の低下やチトクローム c の放出、Bid の限定分解が観察されず、ミトコンドリア以外の経路が示唆された。③小胞体ストレス経路に関わる Caspase-4 の活性が上昇し、またその特異的阻害剤により細胞死が抑制された。⑤電顕的に小胞体の超微形態学的変化が観察された。⑥細胞質へのカルシウム放出が認められた。以上のことから、Riluzole により誘導されるアポトーシスは、少なくとも小胞体ストレス経路によるものであることが明らかとなった。</p> <p>これまで薬剤処置により誘導されるアポトーシスの多くは、ミトコンドリア経路が主要な経路であることが知られているが、申請者は薬剤誘導のアポトーシス経路として小胞体ストレスの経路が存在することを明らかにしている。さらに、Riluzole が悪性度の高いアンドロゲン非依存性の前立腺癌にもアポトーシスを誘導したことから、Riluzole が前立腺癌の有効な治療薬として期待されると考えている。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Anticancer Research 29(6): 2009, in press</p>			