

氏名(本籍)	野澤 聡 (愛知県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 627 号
学位授与日付	平成 17 年 9 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Inhibition of platelet-derived growth factor-induced cell growth signaling by a short interfering RNA for EWS-Fli1 via down-regulation of phospholipase D2 in Ewing sarcoma cells
審査委員	(主査) 教授 清水 克時 (副査) 教授 中島 茂 教授 清島 満

### 論文内容の要旨

ユーイング肉腫は小児にみられる悪性骨軟部腫瘍であり、骨肉腫に次いで頻度が高く、現在でもなお生命予後不良な疾患である。また85%以上のユーイング肉腫において、染色体相互転座t(11;22)による融合遺伝子EWS-Fli1の発現がみられることはユーイング肉腫の特徴といえる。遺伝子産物であるEWS-Fli1蛋白は強力な転写因子であり、アンチセンスを用いたEWS-Fli1の発現抑制実験より腫瘍増殖を抑制できることが判明している。一方、ホスホリパーゼD (PLD) は細胞膜構成主要リン脂質であるホスファチジルコリン (PC) を加水分解してホスファチジン酸 (PA) とコリンを産生するリン脂質分解酵素である。PLDは特に腫瘍細胞内において活性化されていることが知られており、現在注目されている細胞内シグナル伝達酵素である。

今回用いたsiRNA (short interfering RNA) とは、分子標的となる遺伝子 (mRNA) の一部と同じ配列をもつ約21merからなる短い二本鎖RNAのことであり、特異的にRNA鎖を切断する特性がある。この特性を利用して、悪性腫瘍の治療に応用しようとする試みが研究されている。本研究ではEWS-Fli1あるいはPLD2に対するsiRNAを用いて、EWS-Fli1融合遺伝子をもつユーイング肉腫細胞株TC-135での細胞内増殖シグナルについて検討した。

#### 研究対象と研究方法

- 1) mTORの阻害剤であるRapamycin (1-10 ng/ml) の存在下でTC-135細胞をPlatelet-derived Growth Factor-BB (PDGF-BB) (10 ng/ml) にて刺激し、ERK・P70S6Kのリン酸化に対するmTORの影響をウエスタンブロット法にて解析した。
- 2) ERKの上流に存在するMEKの阻害剤U0126 (5 μM), もしくはAktの上流に存在するPI3Kの阻害剤LY294002 (10 μM) の存在下でTC-135細胞をPDGF-BB (10 ng/ml) にて刺激し、ERK・Akt・P70S6Kのリン酸化への影響をウエスタンブロット法にて解析した。同時に、①U0126のみの投与②LY294002のみの投与③Rapamycinのみの投与④上記3種の阻害剤を混合投与したものについて、48時間後における細胞増殖の抑制効果をWST-8 kitを用い450nmの波長にて測定し解析した。
- 3) TC-135細胞にsiRNA EWS-Fli1発現プラスミドもしくはsiRNA PLD2 (CUGA siRNA synthesis Kitによる合成) を遺伝子導入し、48時間後における細胞内のERK・Akt・P70S6Kのリン酸化への影響とCyclinD3の発現をウエスタンブロット法にて解析した。同時に、細胞増殖の抑制効果をWST-8 kitを用い450nmの波長にて測定し解析した。
- 4) TC-135細胞にsiRNA EWS-Fli1発現プラスミドを遺伝子導入した後、PDGF-BB刺激 (10ng/ml, 10分) を加えたサンプルにおけるPLD活性を<sup>3</sup>H palmitic acidを用いて測定した。
- 5) PLDの阻害剤1-butanol (0.3 %), もしくは阻害作用の無いt-butanol (0.3%) の存在下でTC-135細胞をPDGF-

BB (10ng/ml) にて刺激し、ERK・Akt・P70S6Kのリン酸化への影響及びCyclinD3の発現についてウェスタンブロット法にて解析した。

## 結果

- 1) Rapamycin存在下でTC-135細胞をPDGF-BBにて刺激したところ、ERKのリン酸化は阻害されなかったが、P70S6Kのリン酸化は濃度依存性に阻害された。
- 2) U0126の投与によりERKのリン酸化は阻害されたが、Aktのリン酸化は阻害されなかった。LY294002の投与によりAktのリン酸化は阻害されたが、ERKのリン酸化は阻害されなかった。P70S6Kのリン酸化はいずれも阻害された。同時にU0126のみ、LY294002のみ、Rapamycinのみの投与にても細胞増殖は抑制されたが、上記3種の阻害剤を混合投与したものについては、さらにその約50%にまで細胞増殖が抑制された。
- 3) TC-135細胞にsiRNA EWS-Fli1発現プラスミドもしくはsiRNA PLD2を遺伝子導入したところ、細胞内のERK・Akt・P70S6Kのリン酸化はいずれもコントロールに比し低下した。前者ではPLD2及びCyclinD3の発現も低下していたが、PDGFレセプターの発現には変化が見られなかった。
- 4) TC-135細胞にsiRNA EWS-Fli1発現プラスミドを遺伝子導入したサンプルにおいて、PDGF-BB刺激に対するPLD活性はコントロールに比し低下していた。
- 5) 1-butanol (0.3%) の存在下では、細胞内のERK・Akt・P70S6Kのリン酸化はいずれもコントロールに比し低下していた。またCyclinD3の発現も低下していた。一方t-butanol (0.3%) の存在下ではERK・Akt・P70S6Kのリン酸化とCyclinD3の発現には変化が見られなかった。

## 結語

ユーイング肉腫細胞TC-135にsiRNA EWS-Fli1あるいはsiRNA PLD2を遺伝子導入したところ、細胞増殖は抑制され、またPDGF-BB投与下において細胞内増殖シグナルであるERK, Akt, P70S6Kのリン酸化は低下していた。同時にPLD2の発現と活性が低下していたが、PDGFレセプターの発現には変化はみられなかった。以上よりEWS-Fli1蛋白は、PLD2の発現を制御することにより、さらにその下流に存在する増殖シグナル (ERK・Akt・P70S6K・CyclinD3) を制御している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 野澤 聡は、siRNAを用いてユーイング肉腫の遺伝子治療の基礎的研究を行った。ユーイング肉腫細胞へのsiRNA EWS-Fli1及びsiRNA PLD2の導入により、細胞増殖が抑制されることを示し、同時に細胞増殖の抑制は細胞内増殖シグナルの活性低下に基因することを示した。これらの結果はsiRNAを用いたユーイング肉腫に対する治療の可能性を示唆すると共に、ユーイング肉腫細胞における細胞増殖シグナル機構をさらに解明したものと考えられる。本研究の成果はユーイング肉腫に対する治療ならびに細胞内シグナル伝達研究の進歩、発展に少なからず貢献するものと認める。

---

[主論文公表誌]

Inhibition of platelet-derived growth factor-induced cell growth signaling by a short interfering RNA for EWS-Fli1 via down-regulation of phospholipase D2 in Ewing sarcoma cells

Journal of Biological Chemistry 280 (30), 27544-27551 2005.