

植田 裕 氏の学位論文審査の要旨

論文題目

タンパク質導入法によるグリオーマ幹細胞の細胞死誘導とその分子メカニズムについての検討
(Molecular mechanism on induction of cell death of glioma-initiating cells by protein transduction therapy)

悪性グリオーマは、化学療法や放射線治療に抵抗性を示す予後不良な脳腫瘍である。近年、治療抵抗性の原因としてグリオーマ幹細胞の存在が注目されているが、グリオーマ幹細胞に対する有効な治療法は無い。癌抑制遺伝子 p53 の翻訳産物である p53 タンパク質のカルボキシル末端 (C 末端) ペプチドは、癌細胞増殖抑制とアポトーシスの誘導効果を示す。近年、主に塩基性アミノ酸から構成される膜透過性ペプチドをタンパク質やペプチドに付加することにより細胞内に効率よく導入する技術であるタンパク質導入法が確立されている。膜透過性ペプチドの 1 種であるフロックスハウスウイルス (FHV) 由来ペプチドに p53C 末端ペプチドならびに膜透過促進ペプチド (Pas) を付加したペプチドを右旋性光学異性体で合成したペプチド (dPasFHV-p53C') が、グリオーマ細胞の増殖抑制とアポトーシス作用を促進することをこれまで示してきた。しかし、同ペプチドのグリオーマ幹細胞に対する効果は不明である。本研究では dPasFHV-p53C' のグリオーマ幹細胞に対する効果について検討を行った。

悪性グリオーマ患者からヒトグリオーマ幹細胞株を樹立し、dPasFHV-p53C' の増殖抑制効果を WST アッセイ、アポトーシス促進効果を TUNEL アッセイで解析した。LC3 の免疫染色とウェスタンブロッティングによる LC3-II 量に対する LC3-I 量を指標にオートファジーを同定した。さらに電子顕微鏡によりオートファゴソームを確認した。オートファジーの阻害には Atg5 の siRNA を用いた。ペプチド投与したヒトグリオーマ幹細胞株を免疫不全マウスへ移植することにより、生体におけるペプチドの効果を生存期間延長と腫瘍抑制効果の観点から検討した。

dPasFHV-p53C' はグリオーマ幹細胞に効率良く導入され、濃度依存的に増殖抑制効果を示した。さらにグリオーマ幹細胞のオートファジー細胞死を誘導した。しかし、53C' ペプチドを付加していない dPasFHV も同様のオートファジー細胞死を示した。この系においてオートファジーを阻害すると、dPasFHV-p53C' では細胞増殖抑制効果が認められたが、dPasFHV 単独では認められなかった。dPasFHV-p53C' 投与したヒトグリオーマ幹細胞株を免疫不全マウスへ移植した生体における効果の検討では、生存期間延長と腫瘍抑制効果が認められた。

審査において、(1) 今回用いた細胞株の p53 の変異 (2) p53C 末端ペプチドの作用機序 (3) オートファジー阻害時の細胞死のメカニズム (4) アポトーシスとオートファジーの関連 (5) 正常幹細胞に対するペプチドの影響 (6) 臨床応用を視野に入れ、正常脳組織に対するペプチドの作用 (7) 抗腫瘍効果を示したペプチドの各ドメインの働きについて (8) グリオーマ幹細胞の特性について (9) 臨床応用に向けた投与方法等について活発な質疑が行われ、申請者からは適切な回答と考察が得られた。

本論文は、グリオーマ幹細胞に対する p53C 末端ペプチドの有効性に加え、タンパク質導入法による新規抗腫瘍効果を明らかにした。タンパク質導入法による悪性グリオーマの新規治療法の開発に向けた可能性を示したものであり、学位の授与に値するものと評価した。

審査委員長

分子遺伝学担当教授

尾 池 雄 一