



Protein-tyrosine kinase Lyn mediates apoptosis induced by topoisomerase II inhibitors in DT40 cells

圓尾, 明弘

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2108

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002108>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



| | | |
|------------|--|-------|
| 氏名・（本籍） | まる お あき ひろ 圓 尾 明 弘 | （兵庫県） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（医学） | |
| 学位記番号 | 博い第1251号 | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 | |
| 学位授与の日付 | 平成12年3月31日 | |
| 学位論文題目 | Protein-tyrosine kinase Lyn mediates apoptosis induced by topoisomerase II inhibitors in DT40 cells （Bリンパ球系細胞（DT40細胞）においてチロシンキナーゼ Lyn はトポイソメラーゼII阻害剤によるアポトーシスを仲介する） | |
| 審査委員 | 主査 教授 山 村 博 平 教授 水 野 耕 作 教授 中 村 俊 一 | |

論文内容の要旨

〈要約〉

細胞増殖において必須の役割を担う非受容体型チロシンキナーゼは様々な細胞外ストレスにより引き起こされるアポトーシスにおいても重要な役割を担っている。細胞にとってストレスと考えられる多くの抗癌剤は、DNAの損傷などの細胞障害性によりアポトーシスを引き起こすと考えられる。抗癌剤により誘導されるアポトーシスにおける非受容体型チロシンキナーゼの役割について解析を行う為に、我々はニワトリB細胞株DT40細胞ならびに、非受容体型チロシンキナーゼLyn, Syk, Btkそれぞれを欠損させたDT40細胞を用いて、異なった作用機序を持つ抗癌剤によるアポトーシスを系統的に解析した。その結果、野生型細胞株においては、用いた全ての抗癌剤により濃度依存的に細胞死が誘導され、これらの細胞死はDNAの断片化やTUNEL法によってアポトーシスであると確認できた。興味深いことに、Lyn欠損株においてトポイソメラーゼII阻害活性を持つ抗癌剤による細胞死の誘導のみが選択的に強く抑制された。さらに、このLyn欠損株に同じSrcファミリーチロシンキナーゼに属するFynを高発現させた細胞株では、トポイソメラーゼII阻害剤によるアポトーシスの誘導は野生型とほぼ同様のレベルまで回復した。加えて、いくつかの細胞外ストレスによって活性化されるJNKの活性を指標に、野生型細胞株並びにLyn欠損株のアポトーシスシグナル伝達系の解析を行ったところ、いずれの細胞株においてもトポイソメラーゼII阻害剤によって同程度のJNK活性の微弱な上昇を認めた。

これらのことにより、LynがトポイソメラーゼII阻害剤によるアポトーシスにおいて機能的に重要な役割を果たしており、そのシグナル伝達はJNKの活性化に非依存的であることが示された。

〈結果〉

我々は抗癌剤によるアポトーシス誘導過程における非受容体型チロシンキナーゼの役割を系統的に調べるために、以下のテーブルに示すように作用機序の異なる抗癌剤と、ニワトリB細胞株DT40細胞ならびに非受容体型チロシンキナーゼLyn, Syk, Btkそれぞれを欠損させたDT40細胞を用いて、各細胞に対する薬剤の効果を検討した。

| | 作用機序 | 野生型 | Syk 欠損株 | Lyn 欠損株 | Btk 欠損株 |
|----------------|-----------------------|-----|------------|------------|------------|
| Ara-C | アルキル化剤 | 細胞死 | 細胞死 | 細胞死 | 細胞死 |
| CDDP シスプラチン | アルキル化剤 | 細胞死 | 細胞死 | 細胞死 | 細胞死 |
| VBL ビンブラスチン | 微小管重合阻害 | 細胞死 | 細胞死 | 細胞死 | 細胞死 |
| ADR アドリマイシン | アルキル化剤 トポイソメラーゼⅡ阻害 | 細胞死 | 細胞死 | 細胞死 抑制 | 細胞死 |
| VP-16 エトポシド | トポイソメラーゼⅡ阻害 | 細胞死 | 細胞死 | 細胞死 抑制 | 細胞死 |

野生型細胞株においては用いた全ての抗癌剤により、クロマチンの凝集、細胞膜の陥入、アポトーシス小体の形成等一連の典型的なアポトーシスの特徴が観察された。また他の細胞株についても同様の解析を行ったところ、トポイソメラーゼⅡ阻害作用のある抗癌剤で、Lyn 欠損株においてのみ、細胞死が抑制されることが観察された。これは Lyn 欠損株にのみ見られる現象であり、Syk および Btk 欠損株では認められなかった。

次にこれらの細胞死がアポトーシスによって起こっていることを確認するために、それぞれの抗癌剤で処理した細胞における DNA 断片化を検討した。アルキル化剤の Ara-C で処理した場合、全ての細胞株において同様に DNA の断片化が見られるが、トポイソメラーゼⅡ阻害作用のある抗癌剤では、Lyn 欠損株において DNA の断片化がほとんど認められなかった。また、細胞内の DNA 断片を蛍光色素で標識する TUNEL 法によっても同様の結果が得られた。

これらの現象を詳細に解析するために、野生型及び Lyn 欠損株でトポイソメラーゼⅡ阻害剤によるアポトーシス誘導の濃度、時間依存性を DNA の断片化を指標として検討した。野生型では、濃度、時間依存的に DNA の断片化が増強されたが、Lyn 欠損株においては、高濃度、長時間処理下でわずかな DNA の断片化が見られるにすぎなかった。

これまでに、紫外線照射、ガンマ線照射、高浸透圧ストレスなど様々な細胞外ストレスによって、JNK が活性化され、アポトーシスが誘導されるとの報告がある。我々は、野生型および Lyn 欠損株において、トポイソメラーゼⅡ阻害剤による JNK の活性を検討した。野生型では薬剤刺激によって JNK の活性の上昇が認められるが、高浸透圧ストレスによる JNK 活性化と比較すると微弱である。Lyn 欠損株においてもトポイソメラーゼⅡ阻害剤により野生型と同様、わずかな活性の上昇が認められた。このため、トポイソメラーゼⅡ阻害剤によって引き起こされるアポトーシスにおいて JNK 非依存性に Lyn が機能していると考えられる。

つぎに、トポイソメラーゼⅡ阻害剤によるアポトーシスにおける Lyn の機能を確認するため、Lyn 欠損株に同じ Src ファミリーチロシンキナーゼに属する Fyn を遺伝子導入により高発現した細胞株を用いて、トポイソメラーゼⅡ阻害剤によるアポトーシスを比較検討した。Fyn は T 細胞において主に発現しているチロシンキナーゼである。これまでの報告では、Lyn 欠損細胞株に Fyn を高発現させた場合、BCR 刺激に対して Lyn の役割を代償することが明らかとなっている。我々は野生型、Lyn 欠

損株に Fyn を高発現した細胞株を用いてトポイソメラーゼⅡ阻害剤によるアポトーシスを比較検討した。Lyn 欠損株に Fyn を高発現した細胞株では野生型とほぼ同程度にトポイソメラーゼⅡ阻害剤によるアポトーシスが観察された。DNA 断片化, TUNEL 法においても同様の結果が得られた。これらのことにより, Fyn が少なくとも部分的に Lyn の役割を補っていることが示され, トポイソメラーゼⅡ阻害剤によるアポトーシスにおいて Lyn が機能的に重要な役割を果たしていることが示唆された。

様々な非受容体型チロシンキナーゼは, T 細胞, B 細胞の細胞内シグナル伝達において重要な働きをしており, 細胞の増殖, 分化, アポトーシスを制御している。また, いくつかの非受容体型チロシンキナーゼは様々な細胞外ストレス (紫外線, ガンマ線照射, 高浸透圧, 過酸化水素等) によって活性化され, それに引き続くアポトーシスを誘導する上で重要な働きをしていると考えられている。これまでに, 紫外線照射では ZAP-70, Lyn, Syk, Btk が, ガンマ線照射では Syk, Lyn, Abl, Btk が, 過酸化水素刺激では Syk, ZAP-70, Lck, Src が, 高浸透圧刺激で Syk, Lyn, Pyk 2 がそれぞれ活性化されアポトーシスに関与するが示されている。最近, 抗癌剤やガンマ線照射によって Lyn が活性化され, 細胞内の cdc 2 をリン酸化し, 細胞周期を停止させることが報告されているが, トポイソメラーゼⅡ阻害剤によっては明らかなチロシンリン酸化は検出されなかった。

トポイソメラーゼは DNA の高次構造の維持を制御している酵素でⅠ型とⅡ型が報告されている。Ⅰ型は一本鎖 DNA を切断し, DNA の過剰なねじれを補正し再び接合し, Ⅱ型は二本鎖 DNA を切断し, 他の DNA を通して再び接合することでそれぞれ DNA の高次構造を維持している。トポイソメラーゼ阻害剤は, この一時的な DNA の切断部を安定化させることで, 結果的に DNA を切断し細胞死を引き起こすとされている。今回我々の実験でトポイソメラーゼⅡ阻害剤によるアポトーシスの経路において Lyn が重要な働きをしていることが示され, 直接あるいは間接的に Lyn とトポイソメラーゼが共役していることが示唆される。

JNK は様々な細胞外刺激で活性化されることが報告されている。pyk 2, abl の欠損株では, ガンマ線照射や抗癌剤で JNK の活性化が見られず, それに引き続くアポトーシスも見られないことから, これらのキナーゼが JNK の活性化及びそれに引き続くアポトーシスに必須であることが示された。われわれも, 抗癌剤刺激による JNK の活性を測定したが, 野生型と Lyn 欠損株では活性化に大きな差が認められず, 高浸透圧刺激の活性と比べてもわずかなものであった。

癌に対する治療において, 抗癌剤にせよ, ガンマ線照射にせよ, 癌細胞と正常細胞の感受性の違いを利用することによりこれらの治療効果を上昇させることが期待される。このように *in vitro* で一連の抗癌剤によるアポトーシスに対する感受性を規定する様々な分子を明らかにし, 臨床の症例で腫瘍細胞におけるその分子の発現レベルを正常細胞と比較することにより, より適切な抗癌剤治療を行うことができる可能性が示唆される。

論文審査の結果の要旨

様々な非受容体型チロシンキナーゼは, T 細胞, B 細胞の細胞内シグナル伝達において重要な働きをしており, 細胞の分化, 増殖, アポトーシスを制御していることが知られている。その中でいくつかの非受容体型チロシンキナーゼは様々な細胞外ストレス (紫外線, ガンマ線照射, 高浸透圧, 過酸化水素等) によって活性化され, ストレス応答あるいは, アポトーシス誘導過程において重要な働きをしていると考えられている。これまでに, 紫外線照射では ZAP-70, Lyn, Src, Pyk 2 が, ガンマ

線照射では Syk, Lyn, Abl, Btk が, 過酸化水素刺激では Syk, ZAP-70, Lck, Src が, 高浸透圧刺激で Syk, Lyn, Pyk 2 等のチロシンキナーゼがそれぞれ活性化されアポトーシスの制御に関わることが示されている。また, DT40細胞にガンマ線照射を行うとアポトーシスが誘導されるが, Btk 欠損 DT40細胞株にガンマ線照射を行ってもアポトーシスが誘導されないことから Btk はガンマ線照射におけるアポトーシスに必須であることが示された。また抗癌剤やガンマ線照射によって Lyn が活性化され, 細胞内の cdc 2 をリン酸化し, 細胞周期を停止させることが報告されている。

一方トポイソメラーゼは DNA の高次構造の維持を制御している酵素で I 型と II 型が報告されている。I 型は一本鎖 DNA を切断し, DNA の過剰なねじれを補正し再び接合し, II 型は二本鎖 DNA を切断し, 他の DNA を通して再び接合することでそれぞれ DNA の高次構造を維持している。トポイソメラーゼ阻害剤は, この一時的な DNA の切断部を安定化させることで, 結果的に DNA を切断し細胞死を引き起こすとされている。また II 型は α と β のサブタイプが報告されており, α は細胞周期を通して発現が認められるが, β は分裂期に発現の上昇を見ることが知られている。

JNK は様々な細胞外刺激で活性化されることが報告されている。Pyk 2, Abl の欠損株では, ガンマ線照射や抗癌剤で JNK の活性化が見られず, それに引き続くアポトーシスも見られないことから, これらのキナーゼが JNK の活性化及びそれに引き続くアポトーシスに必須であることが示されている。

申請者は抗癌剤により誘導されるアポトーシスにおける非受容体型チロシンキナーゼの役割について解析を行う為に, ニワトリ B 細胞株 DT40細胞ならびに, 非受容体型チロシンキナーゼ Lyn, Syk, Btk のそれぞれを欠損させた DT40細胞を用いて, 異なった作用機序を持つ抗癌剤によるアポトーシスを系統的に解析している。その結果, 野生型細胞株においては, 用いた全ての抗癌剤により細胞死が誘導され, これらの細胞死は DNA の断片化や TUNEL 法によってアポトーシスであると確認している。興味深いことに, Lyn 欠損株においてのみトポイソメラーゼ II 阻害剤を持つ抗癌剤による細胞死の誘導が著しく抑制されている。さらに, この Lyn 欠損株に同じ Src ファミリーチロシンキナーゼに属する Fyn を高発現させた細胞株では, トポイソメラーゼ II 阻害剤によるアポトーシスの誘導は野生型とはほぼ同様のレベルまで回復している。加えて, いくつかの細胞外ストレスによって活性化される JNK の活性を指標に, 野生型細胞株並びに Lyn 欠損株のアポトーシスシグナル伝達系の解析を行ったところ, いずれの細胞株においてもトポイソメラーゼ II 阻害剤によって JNK 活性の微弱な上昇を認めている。

これらのことにより, Lyn がトポイソメラーゼ II 阻害剤によるアポトーシスにおいて機能的に重要な役割を果たしており, そのシグナル伝達は JNK の活性化に依存しないことが示唆される。

本研究は抗癌剤によるアポトーシス誘導過程における非受容体型チロシンキナーゼの役割を系統的に調べた結果, 1) 野生型細胞株においては, 用いた全ての抗癌剤により細胞死が誘導され, これらの細胞死は DNA の断片化や TUNEL 法による解析によってアポトーシスであること。2) Lyn 欠損株においてのみトポイソメラーゼ II 阻害剤を持つ抗癌剤による細胞死の誘導が著しく抑制されること。3) 細胞外ストレスによる JNK の活性化においてはチロシンキナーゼが関与しないことなど, これまでほとんど解析が行われていなかった抗癌剤とアポトーシスの関連における非受容体型チロシンキナーゼの役割について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。