

氏名(本籍)	いけ だ たつ ひこ 池 田 達 彦 (神奈川県)
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	博 甲 第 6605 号
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	<b>Inhibition of autophagy enhances sunitinib-induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma PC12 cells</b> (ラット褐色細胞腫細胞 PC12 においてスニチニブによる細胞傷害作用はオートファジー抑制により亢進する)
主査	筑波大学教授 博士(医学) 西山博之
副査	筑波大学教授 博士(理学) 入江賢児
副査	筑波大学准教授 博士(医学) 矢作直也
副査	筑波大学講師 博士(医学) 榎本佳治

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

#### (目的)

スニチニブは複数のチロシンキナーゼ型受容体の阻害剤である。最近、悪性褐色細胞腫の治療においても有効であるという報告が散見されている。今回は mTORC1 を介して作用を受けるオートファジーについて注目した。オートファジーの抑制によって抗癌剤等による抗腫瘍効果の改善につながったことが報告されている。この研究では PC12 を用いて、スニチニブによるオートファジーへの影響や、オートファジーを薬剤等を用いて抑制することでスニチニブによる抗腫瘍効果が亢進することを示し、褐色細胞腫の治療選択肢の一つにつながることを目的として行った。

#### (対象と方法)

ラット褐色細胞腫 cell line の PC12 を用いた。Immunoblotting は SDS-PAGE を行い、通常の方法でウエスタンブロッティングを行った。アポトーシスの測定は細胞質内のヒストン結合 DNA の断片化を ELISA の原理で検出し定量した。細胞増殖の指標として、細胞 DNA 中に取り込まれた 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を ELISA リーダーにて測定する方法を行った。

#### (結果)

PC12 にスニチニブを投与することにより、LC3- II のレベルが亢進し、同時に p62 のレベルが減弱した。siRNA を用いて Atg13 をノックダウンするとスニチニブによる LC3- II のレベルの亢進が認められなくなった。さらに、Atg13 のノックダウンによるオートファジーの抑制によって、スニチニブによるアポトーシス作用が増強することが示された。また、同様にオートファジーを抑制する薬剤(塩化アンモニウム)を使用することによってもアポトーシス作用が増強することが示された。同様にオートファジーの抑制により細胞増殖抑制作用が亢進することも確認された。これらの結果から、オートファジーの抑制はスニチニブによる PC12 における抗腫瘍効果を増強することが示唆された。

## (考察)

mTORC1の抑制とその下流のULK1/2-Atg13-FIP200複合体の構成がオートファジーの進行に関与していることが示唆されている。mTOR阻害剤と同様にスニチニブでmTORC1が抑制されることは以前に当研究室から報告している。今回の研究においてAtg13のノックダウンによりスニチニブによるオートファジーの亢進が減弱されたことは、スニチニブによるオートファジーはmTORC1とULK1-Atg13-FIP200を介した経路によって生じていることを示唆するものと考えられた。また、Atg13のノックダウンによってスニチニブによるアポトーシスや細胞増殖抑制効果が亢進することが示された。つまり、PC12においてはオートファジーの抑制によってスニチニブに対する薬剤感受性が高まる可能性が示された。褐色細胞腫の治療においてスニチニブの効果の増強と毒性の軽減に役立つ可能性が示唆された。

## 審査の結果の要旨

本研究では、PC12を用いて、スニチニブによるオートファジーが亢進すること、Atg13のノックダウンによってスニチニブによるアポトーシスや細胞増殖抑制効果が亢進することが明らかにされた。これらの研究成果は、褐色細胞腫の治療においてスニチニブの効果の増強と毒性の軽減に役立つ重要な知見であり、高く評価される。

平成25年1月7日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。