

論文内容要旨

論文題目

常時活性型カリウムチャネル (TASK3) の過剰発現が及ぼす細胞生存への影響

責任講座：放射線医学講座 (放射線診断学分野)

氏名： 紺野 義浩

【内容要旨】 (1,200 字以内)

緒言：

常時活性型カリウムチャネルである TASK3 は Two-pore domain カリウムチャネル (K2P) の 1 つで、リークチャネルとして働き、細胞の静止膜電位形成や膜興奮性の調節に関わる。一方で乳癌や肺癌など多様なヒト癌腫細胞における過剰発現が認められ、発癌能 (oncogenic potential) に関与する報告を踏まえ、oncochannel と呼ばれている。しかし、チャネルに依存した細胞死も報告されており、このチャネルが腫瘍形成や腫瘍抑制に関わる機序の詳細は明らかではない。本研究では、ヒト由来細胞を用いた異所性発現系で、TASK3 発現が細胞生存に及ぼす直接的な影響を一過性発現と安定発現の実験に分けて評価し、発癌能への関与や、それに関わる機序の解明を試みた。

方法：

ヒト胎児腎 HEK293 細胞とヒト由来の膵臓癌 PANC1 細胞を用いた。両細胞において TASK3 の一過性発現の影響を調べ、癌細胞の PANC1 細胞で TASK3 安定発現の影響を評価した。タイムラプスイメージング、 β -ガラクトシダーゼアッセイ、Cell counting アッセイにて細胞の増殖性や生存性を調べた。カスパーゼ活性化を調べる CellEvent アッセイと細胞周期解析にはフローサイトメーターを用いた。mRNA の発現量はリアルタイム PCR で定量し、ウェスタンブロットング分析で目的のタンパク質の発現量を評価した。

結果：

TASK3 を一過性発現させた HEK293 細胞はタイムラプスイメージング上、明らかに増殖が妨げられた。 β -ガラクトシダーゼアッセイにおいて、TASK3 を発現させると酵素活性が有意に低下したのに対し、TASK3 の非機能性変異体を発現させても活性低下を認めなかった。同様の結果が PANC1 細胞を用いた検討でも確認された。TASK3 発現細胞ではカスパーゼ-3/7 の活性化が認められ、ストレス応答カスケードに関わる p38-MAPK の活性化が起きていた。定量 PCR では、TASK3 安定発現 PANC1 細胞でのチャネル mRNA 発現量は一過性発現よりも 1/30 程度であった。TASK3 安定発現細胞はコントロールとの比較で、静止膜電位が過分極側へシフトしていたが、細胞の増殖性や細胞周期の分布に明らかな差を認めなかった。しかし TASK3 安定発現細胞は高濃度マンニトール存在下での生存率が高く、高浸透圧ストレスで誘導されるアポトーシスが起こりにくかった。定量 PCR 上、Bax/Bcl-2 比が TASK3 安定発現細胞では低下しており、タンパクレベルでも Bcl-2 の発現増強が確認された。調節性容積増加に関わる遺伝子については mRNA レベルでの発現量変化を認めなかった。

結論：

本研究において、一過性発現で TASK3 を発現させた細胞では、恐らく急激で過剰な K^+ の細胞外流出を生じて、p38-MAPK 経路に関わるカスパーゼ依存性のアポトーシスが誘導されたものと思われた。しかし一定レベルの TASK3 安定発現 PANC1 細胞では高浸透圧ストレスで誘導されるアポトーシスへの抵抗性と Bcl-2 の発現増強を認め、発癌能との関わりが考えられた。このような TASK3 発現量の違いによる細胞生存への影響の変化は、p38-MAPK 経路の活性化の程度で説明されるのかもしれない。(1145 文字)

2019年 8月 19日

山形大学大学院医学系研究科長殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名：紺野義浩

論文題目：常時活性型カリウムチャネル（TASK3）の過剰発現が及ぼす細胞生存への影響

審査委員：主審査委員 土谷 順彦

副審査委員 藤井 聡

副審査委員 石澤 賢一



審査終了日：2019年8月8日

【論文審査結果要旨】

常時活性型カリウムチャネルは、TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel 3 (TASK3)は、two-pore domain カリウムチャネル(K2P)の一つで、細胞の静止膜電位の形成や膜興奮性の調節に関与している。近年、癌細胞において過剰発現していることが知られており、細胞増殖やアポトーシス抵抗性への関与が報告されている。本研究では、非癌細胞株(ヒト胎児腎 HEK293 細胞)と癌細胞株(ヒト膵臓癌 PANC1 細胞)に TASK3 を強制発現させることにより、細胞に与える影響とその機序を明らかにすることを目的とした。

はじめに、HEK293とPANC1にTASK3ならびにその変異体(AAA)の発現ベクターを導入し、一過性に過剰発現させた際の細胞増殖能とアポトーシスを比較検討した。その結果、TASK3 強制発現株は有意に細胞増殖が亢進し細胞死は減少した。アポトーシスの検討では、TASK3 で有意にカスパーゼの活性化とcPARPの亢進、P38のリン酸化の亢進が認められた。すなわち、一過性のTASK3の過剰発現はカスパーゼの活性化を惹起し、p38のリン酸化を介したアポトーシスにより、細胞死をもたらす可能性が示唆された。さらに、癌におけるTASK3の発現の意義を、TASK3を安定発現させたPANC1細胞を用いて検討した。TASK3の安定発現は一過性発現とは異なり細胞増殖に影響を与えず、細胞周期への影響もみられなかった。一方、高浸透圧ストレスとしてマンニトール投与下での細胞生存を検討したところ、TASK3安定細胞株において有意に細胞生存が高かった。TASK3安定細胞株ではBaxの発現低下とBcl-2の発現亢進が認められたが、細胞容量調節に関わる膜タンパクの発現には影響を与えなかったことから、Bcl-2発現亢進によるアポトーシス抵抗性を獲得していることが明らかにされた。以上の結果について、これまでの知見を踏まえて適切な考察が行われており、これまでの報告にはない、TASK3の発現量による細胞生存への影響の違いに関する新たな仮説を立てている。本論文はTASK3の機能の一部を明らかにした医学的意義の高いものである。研究手法と結果の解釈に問題はなく、論理的に考察されており、学位を授与するに値すると判断した。なお、以下の指摘に対する内容を論文と最終発表に加えることをその条件とする。

1. 使用した細胞株でのTASK3の発現とTASK3導入時のTASK3発現を定量的に示すこと。
2. TASK3による静止細胞膜電位の低下(過分極)による細胞内Ca⁺⁺の意義について言及すること。