



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Difference of apoptosis-associated gene expression using DNA microarray analysis in gastric cancer cell lines according to p53 status induced by low-dose CDDP+5FU, or TNF α +IFN γ

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2008-02-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松井, 康司 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/14907

氏名(本籍)	松井康司(岐阜県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第 1375 号
学位授与日付	平成 15 年 3 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Difference of apoptosis-associated gene expression using DNA microarray analysis in gastric cancer cell lines according to p53 status induced by low-dose CDDP+5FU, or TNF α +IFN γ
審査委員	(主査) 教授 佐治重豊 (副査) 教授 江崎孝行 教授 森脇久隆

論文内容の要旨

癌薬物療法の治療効果は、血中最高濃度(C-Max)に依存するとの考えで短期大量投与方法が採用されている。しかし、抗腫瘍効果は未だ不良のため、total cell killingは困難との考えで副作用が少ない低用量の抗癌剤を可及的長期間投与すべきとの考えが最近注目されている。すなわち、抗腫瘍効果はDNA阻害が主流で、それゆえC-Maxに依存するとの考えであるが、他に血管新生抑制やアポトーシスの誘導など様々な薬理作用の存在が推察されている。そこで、教室では、進行胃、大腸癌患者に対し低用量のcisplatin(CDDP)とfluorouracil(5-FU)を併用するlow dose CF療法を採用し、高いコンプライアンスのもとで、比較的良好な奏効率を得てきた。作用機序は、CDDPによる5-FUのmodulation効果と推察されているが、詳細不明な部分も多い。一方、教室でのCD-DST法を用いた制癌剤感受性試験では、低用量のCDDPと5-FUは、単剤では増殖抑制効果は軽微であったが、併用により有意に高い感受性を示した。また、flow cytometryとthin layer collagen gel法を用いた同一細胞でのHoechst 33258染色とHematoxylin eosin染色併用によるアポトーシス判定法での検索でも、併用により有意にアポトーシス細胞の増加が観察された。そこで、申請者らは一度に大量の遺伝子情報の解析が可能なcDNAマイクロアレイを用い、low dose CF療法によるアポトーシス誘導経路を、二種類のヒト胃癌細胞株を用いて検索し、アポトーシス関連遺伝子の変化から薬理作用を推察せんと試みた。また、教室の検討では、抗腫瘍性サイトカインであるtumor necrosis factor(TNF) α とinterferon(IFN) γ もこれら胃癌細胞株に対し同程度のアポトーシスを誘導可能であるので、low dose CFとの関連でアポトーシス関連遺伝子の発現様式の差異を比較検討した。

研究対象と研究方法

[対象] 二種類のヒト胃癌細胞株、MKN45(wild type p53)とMKN28(mutant type p53)を用い、抗癌剤として、5-FU(20 μ g/ml)とCDDP(100 μ g/ml)を24時間接触、あるいは抗腫瘍性サイトカインであるTNF α (100ng/ml)とIFN γ (100ng/ml)を同様接触させ、無接触群を対照群として比較検討に用いた。[方法] アポトーシスの程度はHoechst染色を用い、apoptotic index(AI)を算定した。cDNAマイクロアレイは薬剤接触前後の各細胞からtRNAを抽出し、mRNAを精製後、薬剤接触前はCy5-dUTPで、接触後はCy3-dUTPでラベリングした。ヒト由来アポトーシス関連遺伝子として164種類をスポットしたIntelliGene™ Human Apoptosis CHIP Version 1.1(TaKaRa)を用いて、65°C、16時間のハイブリダイゼーションを行った。解析は、ScanarrayR4000によりスキャンし、QuantArray[®]を用いて解析した。薬剤接触前後で2倍以上の発現変化を示したものを高発現、1/2倍以下の変化を低発現とした。さらに、高発現および低発現となる変化を示した遺伝子のうち、発現量の多いもの数種類について、半定量RT-PCR法にて遺伝子産物の確認を行った。

研究結果

Hoechst染色によるアポトーシス誘導能：抗癌剤およびサイトカイン処理群とも、p53遺伝子が野生株であるMKN45は、p53遺伝子が変異株であるMKN28に比べ有意($p < 0.05$)に高いアポトーシスの誘導が確認された。

cDNAマイクロアレイ：① CDDPと5-FU処理で、junBの高発現、FADDの低発現がMKN45およびMKN28ともに観察された。② MKN45で特徴的であったのはprefoldin、caspase3などの高発現で、caspase8の発現変化はみられなかった。以上の結果、junBの高発現、FADDの低発現はアポトーシス誘導の頻度にかかわらず、抗癌剤処理による変化であると推察された。

③ low dose CFで誘導されるアポトーシスは、Fasレセプターからcaspase8を介さず、直接caspase3を活性化する経路の存在が報告されているが、この所見と矛盾しない結果であった。④ low dose CFによるアポトーシス誘導において、転写因子のひとつであるprefoldinが重要な役割を果たす可能性が示唆された。⑤ サイトカイン処理群では、抗癌剤処理で発現低下したFADDの発現変化は観察されなかった。⑥ サイトカイン処理では、アポトーシスが有意に誘導されたMKN45でのIGFBP2の発現低下が特徴的であった。以上の結果、サイトカイン($TNF\alpha + IFN\gamma$)で誘導されるアポトーシスにおいてもIGFBP2の発現低下が重要である可能性が示唆された。また、RT-PCR法でjunB、FADD、prefoldin、IGFBP2の発現変化が確認されたが、この結果はマイクロアレイと矛盾しない所見であった。

考察と結語

近年、アポトーシスの分子機構に関する研究が急速に進み、抗癌剤のアポトーシス誘導機構が次第に解明されてきたが、その分子機構は複雑で、同じ抗癌剤でも癌腫あるいは標的細胞のp53遺伝子発現様式によりアポトーシスの程度や経路が異なる可能性が示唆されている。幸い、分子生物学的手法の導入・進歩により多量の遺伝子解析を一度に施行できるマイクロアレイが開発され、基礎・臨床両面で過大な成果がみられている。そこで、申請者も低用量CDDP+5FU療法で誘導されるアポトーシスの経路を遺伝子変異から解明する目的で、マイクロアレイを用いて詳細に検索した。その結果、転写因子prefoldinが関与する可能性、Fas受容体から直接caspase3を活性化する経路の存在が示唆された。また、抗腫瘍性サイトカイン($TNF\alpha + IFN\gamma$)で誘導されるアポトーシス経路では、IGFBP2の発現低下が観察された。以上の結果、アポトーシスのように複雑なネットワークをもつ細胞死機構の解析には、マイクロアレイは有用であり、今後、既知のアポトーシスネットワークをマップすることなどで、さらに詳細な薬理作用の解析が可能となり、癌治療分野で新しい知見が得られるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

申請者 松井康司は、低用量のCDDP+5FU、および抗腫瘍性サイトカインである $TNF\alpha + IFN\gamma$ により誘導されるアポトーシスの特徴を、二種類のヒト胃癌培養細胞株を用い、Hoechst染色でアポトーシス誘導程度を確認した上で、cDNAマイクロアレイを用いアポトーシス関連遺伝子群の変化を検索した。その結果、抗癌剤およびサイトカインによる細胞死で、各経路に関わる特徴的な遺伝子発現の変化が観察され、マイクロアレイの有用性が示唆された。これらの研究結果は、遺伝子による抗癌剤感受性試験の発展の分野に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

- 1) Difference of Apoptosis-associated Gene Expression using DNA Microarray Analysis in Gastric Cancer Cell Lines according to p53 Status induced by Low-dose CDDP + 5FU, or $TNF\alpha + IFN\gamma$