



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

ヒト乳癌細胞における,
高濃度ブドウ糖および高浸透圧刺激によるアルドース還元酵素mRNA発現と細胞の形質変化との関連について -- プロテインキナーゼC分子種の関与 --

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-02-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 丸山, 貴子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/14919

氏名(本籍) 丸山貴子(岐阜県)
 学位の種類 博士(医学)
 学位授与番号 乙第 1337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 ヒト乳癌細胞における、高濃度ブドウ糖および高浸透圧刺激によるアルドース還元酵素mRNA発現と細胞の形質変化との関連について
 —プロテインキナーゼC分子種の関与—
 審査委員 (主査) 教授 安田 圭吾
 (副査) 教授 中島 茂 教授 柴田 敏之

論文内容の要旨

アルドース還元酵素(aldose reductase; AR)はNADPHを補酵素としてブドウ糖をソルビトール(ポリオール)に変換する酵素で、糖代謝の副路ポリオール経路を構成する。ARは生体内で多様な生理機能を有していると考えられているが、その役割については依然不明な点が多い。ARの発現は、高濃度ブドウ糖や高浸透圧あるいは酸化ストレスやある種のサイトカイン、advanced glycation end-products (AGEs)など、高血糖に伴う代謝異常によって誘導され、糖尿病性神経症との関与が報告されている。AR阻害剤は、既に糖尿病性神経症の治療薬として実地臨床で使用されている。AR誘導に関わるARの機能遺伝子は第7染色体に位置し、その上流約1.1 kbpには高浸透圧刺激に対応するosmotic response element (ORE)と呼ばれる領域が存在し、その結合蛋白も同定された。近年、血管平滑筋細胞や腎ではポリオール代謝経路とプロテインキナーゼC (PKC)シグナル経路との関与が明らかとなり、ポリオール代謝系には、PKCの活性異常、AGEの産生など、種々の代謝異常とのクロストークが存在することが注目されつつある。また、ラット肝癌細胞では、薬剤耐性の獲得にARの発現増加が関与していることが示され、肝癌細胞を高浸透圧で刺激してARを誘導すると、薬剤耐性が誘導されることも示された。

我々は、高濃度ブドウ糖やレプチンが、PKCを介してヒト乳癌細胞(MCF-7)の増殖を促進することを報告してきた。糖尿病患者では乳癌発症率が増加しているという疫学的報告があり、糖尿病状態におけるPKCシグナルの変動により乳癌細胞増殖の制御が破綻している可能性がある。

以上より、我々は、糖尿病状態においては、誘導されたAR発現が乳癌細胞の増殖促進機序に関与している、という仮説をたて、高濃度ブドウ糖や高浸透圧刺激時のARの発現、細胞増殖、薬剤感受性、PKC分子種の発現の各変化について、ヒト乳癌細胞(MCF-7)を用いて検討した。

研究方法

薬剤感受性ヒト乳癌細胞(MCF-7)および多剤耐性ヒト乳癌細胞(NCI/ADR-RES)を、10 mMブドウ糖環境下で培養後、実験に供した。低濃度ブドウ糖(10 mM)、高濃度ブドウ糖(30 mM)、高浸透圧刺激(100 mM塩化ナトリウムおよびラフィノース)の各条件で所定時間培養し、細胞増殖、AR発現、薬剤感受性、およびPKC分子種の発現について検討した。細胞増殖は、 ^3H 標識チミジンの取り込み測定によるDNA合成の検討と、ウエスタンブロット法による細胞周期関連蛋白のcdk2の発現変化の検討により評価した。AR mRNA発現はリアルタイムPCR法で計測し、その発現が高浸透圧刺激に対して時間依存性、濃度依存性を有するかについても検討した。また、高浸透圧刺激によるダウノルピシンに対する薬剤感受性の変化を、細胞培養液中のLDH活性の測定により評価した。さらに、高濃度ブドウ糖や高浸透圧刺激による各種PKC分子種の発現について、ウエスタンブロット法により検討した。

結果

1) 細胞増殖

MCF-7では、細胞増殖は高濃度(30 mM)ブドウ糖により増加したが、高浸透圧刺激(100 mM NaClおよびラ

フィノース)では抑制された。NCI/ADR-RESではいずれの刺激でも細胞増殖に有意な変化を認めなかった。

2) ARのmRNA発現量

無刺激状態でのAR mRNA発現はMCF-7に比しNCI/ADR-RESで200倍増加していた。MCF-7では高濃度ブドウ糖、高浸透圧刺激ともにAR mRNA発現を有意に増加させ、高濃度ブドウ糖で2.3倍、塩化ナトリウムで8.2倍であった。NCI/ADR-RESでは高浸透圧刺激のみで有意に増加し、塩化ナトリウムでは16.7倍となり、その増加率はMCF-7の2倍であった。両細胞とも、AR mRNA発現の誘導は塩化ナトリウム刺激に対して時間、濃度依存性であり、最大値における増加率はMCF-7に比しNCI/ADR-RESでそれぞれ8倍、10倍であった。

3) 薬剤耐性の変化

両細胞とも、ダウノルビシンで3時間処置した際の細胞培養液中のLDH活性は有意に増加し、細胞障害を反映したが、塩化ナトリウムによる高浸透圧刺激では低値となり、ダウノルビシンによる細胞障害の抑制が示された。高浸透圧刺激によってAR mRNA発現が増加すると、薬剤耐性が誘導される可能性が明らかとなった。

4) PKC分子種の蛋白発現量

PKC- α と- β IはMCF-7に比しNCI/ADR-RESで発現が有意に増加していた。また、高浸透圧刺激は、両細胞でPKC- ϵ を、NCI/ADR-RESでPKC- θ を有意にダウンレギュレートした。

考察

今回我々は、ヒト乳癌細胞でAR遺伝子が発現しており、高浸透圧刺激でその発現が誘導されることをはじめて明らかにした。この浸透圧刺激によるAR遺伝子の誘導は、時間依存性、濃度依存性であった。また、薬剤感受性株(MCF-7)に比し、多剤耐性株(NCI/ADR-RES)でAR遺伝子はより多く発現し、浸透圧刺激時間および濃度による誘導もより高度であった。さらに、高浸透圧刺激でAR遺伝子が増加すると、ダウノルビシンによる細胞障害が阻害され、薬剤耐性が誘導されることも明らかとなった。一方、高濃度ブドウ糖刺激では、MCF-7においてのみ、我々の既報のごとく細胞増殖が促進し、AR遺伝子の誘導を認めた。その発現誘導は高浸透圧刺激によるものと比較すると極めて小さく、OREを介さない機序による可能性が考えられた。

癌細胞が多剤耐性を獲得する際に重要な役割を担うmultidrug resistance (MDR)遺伝子のプロモーター領域の転写はPKC- α と- θ が調節しているという報告をはじめ、PKCの各分子種は乳癌細胞の増殖や形質変化の調節に大きく関与している。PKC- α や- β Iの発現変化が薬剤耐性の変化に深く関与し、高浸透圧刺激による性質の変化はMCF-7ではPKC- ϵ の変化と、NCI/ADR-RESではPKC- ϵ 、- θ の変化と深く関与していることが示された。PKC分子種に特異的な阻害剤の使用により、癌細胞の増殖や形質調節の可能性が示唆された。

ヒト乳癌細胞におけるAR発現と薬剤耐性獲得の関係やPKC分子種の役割について詳細に検討した報告は、これまでない。今回の結果は、乳癌治療におけるAR阻害剤やPKC阻害剤の応用の可能性をも示唆するものである。

論文審査結果の要旨

申請者 丸山貴子は、ヒト乳癌細胞における高濃度ブドウ糖や高浸透圧刺激時のAR発現、細胞増殖、薬剤感受性、PKC分子種の発現の各変化について検討した。その結果、高濃度ブドウ糖によるAR mRNAの発現誘導は細胞増殖と関連し、また高浸透圧によるAR mRNA発現誘導は薬剤耐性の誘導を引き起こすこと、および高浸透圧によるPKC- ϵ 、- θ のダウンレギュレーションが薬剤耐性誘導に関与している可能性が示された。これらの結果は新しいARの機能を示したものであり、乳癌の病態に関する基礎的解明に資するばかりでなく、治療法の発展にも少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

ヒト乳癌細胞における、高濃度ブドウ糖および高浸透圧刺激によるアルドース還元酵素mRNA発現と細胞の形質変化との関連について —プロテインキナーゼC分子種の関与—