



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Significance of apoptosis induced by tumor necrosis factor- α and/or interferon- γ against human gastric cancer cell lines and role of p53 gene

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: 福井, 貴巳 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/14934

氏名(本籍) 福井貴巳(岐阜県)
学位の種類 博士(医学)
学位授与番号 乙第 1352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 Significance of apoptosis induced by tumor necrosis factor- α and/or interferon- γ against human gastric cancer cell lines and role of p53 gene
審査委員 (主査) 教授 佐治重豊
(副査) 教授 森 秀樹 教授 森脇久隆

論文内容の要旨

癌微小環境でアポトーシスによる細胞死は、死細胞がマクロファージにより貪食処理されるため生体反応が少なく、ネクローシスによる細胞死より薬剤有害反応が少なく悪液質等を誘導し難いと推察されている。この観点から、癌薬物療法でもDNA阻害以外にアポトーシス誘導に着目した抗癌療法が注目され、アポトーシス関連遺伝子群の解析と共に解明が進んでいる。教室でも低用量の化学療法や抗腫瘍性サイトカインによるアポトーシス誘導の可能性を種々検索してきた。特に、抗腫瘍性サイトカインでtumor necrosis factor(TNF)- α は、腫瘍細胞傷害作用、heat shock proteinの誘導、腫瘍血管傷害作用、抗腫瘍免疫賦活作用などが、interferon(IFN)- γ は抗ウイルス作用、癌細胞の増殖を抑制する直接作用、マクロファージやNK細胞の活性増強、免疫応答調節作用などにより腫瘍増殖を抑制する間接作用が知られている。一方、アポトーシスとの関連でTNF- α は、カスパーゼ8を活性化させ、更に下流のカスパーゼ3やBcl-2 familyを活性化させてアポトーシスを増幅させることが知られている。そこで、申請者らはヒト胃癌細胞株を用いTNF- α とIFN- γ の抗腫瘍効果を細胞増殖能、アポトーシス誘導能及びcDNA microarrayを用いたアポトーシス関連遺伝子群の変化から検索し、作用機序の解明を試みた。

研究対象と研究方法

ヒト胃癌培養細胞株：肝転移巣由来MKN-45(wild type p53)と転移リンパ節由来MKN-28 (mutant type p53)を用いた。

細胞増殖程度：TNF- α (100ng/ml)或いはIFN- γ (100ng/ml)を単独または併用添加した場合の、細胞増殖程度をトリパンブルー生体染色にて算定した。

アポトーシス誘導能： 1×10^6 個のMKN-45及びMKN-28にTNF- α 或いはIFN- γ を0, 50, 100, 200ng/ml濃度で添加後24, 48時間培養し、Hoechst染色にてアポトーシス誘導の有無を判定した。結果は、陽性細胞比率(apoptotic index, AI値)で表示し、併用添加の場合は100ng/mlのTNF- α に各濃度のIFN- γ 添加し各AI値を算出した。

cDNA microarray：MKN-45を100ng/mlのTNF- α とIFN- γ 併用添加培地で48時間培養後total RNA, mRNAを精製しハイブリダイゼーションを施行し、薬剤非添加群との間でglobal normalizationを解析した。

Western blotting法：MKN-45にTNF- α 或いはIFN- γ を50, 100, 200ng/mlの単独或いは100ng/mlのTNF- α とIFN- γ を併用添加し、24, 36, 48, 60時間培養後にinsulin-like growth factor binding protein (IGF-BP) 3抗体を反応させ蛋白発現の有無を抗原抗体反応により確認した。

研究結果

TNF- α とIFN- γ の抗腫瘍効果：細胞増殖は、MKN45はIFN- γ の単独あるいはTNF- α とIFN- γ の併用添加で有意に抑制され、TNF- α 単独添加でも有意の抑制が観察された。一方、MKN28は同時併用時のみに抑制が観察されたが、単独添加群では抑制は軽度であった。

アポトーシス誘導能：①AI値はTNF- α 単独添加の場合、MKN-45に対して24時間目のAI値は非添加群に比べ高値で、48時間目は50ng/mlで $9.22 \pm 3.57(\%)$ 、100ng/mlで 12.42 ± 2.53 、200ng/mlで 10.28 ± 2.42 と24時間目に比べ有意($p < 0.05$)に増加した。一方、MKN-28に対しては全期間を通して5%未満であった。②IFN- γ 単独添加の場合、AI値はMKN-45で24時間目は非添加群に比べ高値で、48時間目には50ng/mlで $8.32 \pm 4.67(\%)$ 、100ng/mlで 1.08 ± 4.34 、200ng/mlで 10.92 ± 3.66 と有意($p < 0.02$)に増加したが、各群間で濃度依存性はみられなかった。一方、MKN-28では全期間を通して4%未満と低値であった。③TNF- α とIFN- γ 同時併用添加の場合、AI値はMKN-45が48時間目に 36.6 ± 1.17 と単独添加群に比べ有意($p < 0.05$)の高値で、併用による相乗効果が認められた。④Mann-WhitneyのU検定でTNF- α (100ng/ml)単独、IFN- γ (100ng/ml)単独および併用の3群間で有意差($p = 0.0090$)が認められた。一方、MKN-28でもAI値は併用添加で 5.75 ± 2.52 と軽度増加したが、MKN-45に比べ明らかに低値であった。

cDNA microarray：アポトーシス関連遺伝子群でTNF- α とIFN- γ 同時併用添加でTNF superfamily, IGF-BP3, caspase 1, caspase 7, tumor protein 53などのup-regulateと、caspase 6, caspase 9等のdown-regulateが観察された。

Western blotting：TNF- α とIFN- γ 同時併用添加後のWestern blottingで24と60時間目でIGF-BP3抗体に対する蛋白の発現増強が観察された。

考察と結語

一般に、TNF- α はcaspase-8が直接caspase-3を活性化させてアポトーシスを誘導すると考えられている。また、IFN- γ にはcaspase依存性のアポトーシス誘導経路は不明の部分が多いが、炎症やアポトーシスの遂行に関与する末端のcaspase活性経路が関与する可能性が推察されている。一方、TNF- α とIFN- γ 併用投与により誘導される細胞死には、p53により誘導されるIGF-BP3を介するcaspase非依存性経路の関与が推察されている。このIGF-BP3遺伝子はゲノム配列上の第1および第2イントロンにp53REが存在し、正常なp53によりその発現が増強することが確かめられている。その機能は細胞の成長のnegative factorとして、あるいはproapoptotic factorとしての作用が示唆されている。今回の申請者らの検討でも、TNF- α とIFN- γ 同時併用添加でアポトーシスが誘導されたMKN45では、薬剤非添加対照群に比べIGF-BP3遺伝子の発現がcDNA microarrayでup-regulatedされており、更にWestern blottingによる検索でIGF-BP3抗体に対する蛋白発現の増強が確認された。それゆえ、TNF- α とIFN- γ の併用添加で誘導されるアポトーシスの経路にはIGF-BP3が関与している可能性が示唆された。また、この場合のアポトーシス誘導には標的細胞のp53遺伝子発現の有無が重要で、今後IGF-BP3を中心としたcaspase非依存性のアポトーシス誘導経路を解明することで、新たな抗癌療法の展開が可能になると推察される。

論文審査の結果の要旨

申請者 福井貴巳は、異なったp53遺伝子発現を有する二種類のヒト胃癌細胞株を用い、TNF- α とIFN- γ で誘導される抗腫瘍効果を詳細に検討した。その結果、p53 遺伝子がwild typeの場合はアポトーシスによる細胞死が主体で、その効果はTNF- α とIFN- γ 併用時に有意に増強され、cDNA microarrayとWestern blottingでの検索でinsulin-like growth factor binding protein 3 抗体を中心としたcaspase非依存性のアポトーシス誘導経路であることを明らかにした。これらの研究結果は腫瘍外科学、特に免疫サイトカイン療法の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Significance of Apoptosis Induced by Tumor Necrosis Factor- α and/or Interferon- γ against Human Gastric Cancer Cell Lines and Role of p53 Gene

Surgery Today. 2003 ; (in press)