

氏名(本籍)	奥村三恵(岐阜県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第 1317号
学位授与日付	平成14年12月18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	Leptin and high glucose stimulate cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells: reciprocal involvement of PKC- $\alpha$ and PPAR expression
審査委員	(主査) 教授 安田 圭吾 (副査) 教授 石塚 達夫 教授 岡野 幸雄

### 論文内容の要旨

レプチンは脂肪組織より分泌される蛋白で食欲調整に重要な役割を有し、主に視床下部を介して肥満などに関与していると考えられているが、その機序については未だ明らかではない。血中レプチン濃度は閉経前の女性乳癌患者の TMN staging と相関するという。また、疫学的にも、肥満は乳癌のリスクファクターであり、最近、血中レプチン濃度が乳癌の clinical marker となり得る可能性も示唆されている。乳癌細胞はレプチン受容体の mRNA および蛋白を発現しており、レプチンが乳癌細胞増殖に関与していると推測されるが、その役割は不明である。

一方、糖尿病患者において乳癌発生頻度が高いという疫学的報告が存在し、高血糖状態もまた乳癌細胞増殖に影響を与えていると推測される。我々は既に高ブドウ糖濃度下において乳癌細胞増殖が促進することを報告してきた。そこで、高濃度ブドウ糖やレプチンが乳癌細胞増殖に与える影響を明らかにするため、ブドウ糖やレプチンの乳癌細胞 (MCF-7 および NCI/ADR-RES) 増殖への影響を検討すると共に、細胞内情報伝達機構において重要な役割を担っている protein kinase C(PKC)各種分子種、核内受容体である peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR)、細胞周期関連蛋白である cdk2,cyclinD1 の関与について検討した。

#### 1. 方法

ヒト乳癌細胞薬剤感受性株 (MCF-7) と薬剤耐性株 (NCI/ADR-RES) を用いて高濃度ブドウ糖およびレプチンの影響を比較検討した。正常ブドウ糖濃度 (5.5mmol/L) および高ブドウ糖濃度 (25mmol/L) の2条件にて培養し、レプチンと TNF- $\alpha$  を  $1\mu\text{mol/L}$  とし、細胞の生細胞数測定を6日間連日実施した。また、レプチンの血中濃度が MCF-7 細胞増殖に与える影響を確認するため、各種 ( $10^{-9}\text{M}\sim 10^{-5}\text{M}$ ) 濃度条件で培養し、生細胞数を計測した。また、細胞をレプチンと TNF- $\alpha$  で24時間刺激し、DNA合成を $^3\text{H}$ -thymidine(dThd)の取り込みにより評価した。また、72時間刺激による細胞増殖を、細胞周期関連蛋白である cdk2,cyclinD1 を指標とし検討、同時に各種 PKC 分子種、および PPAR 分子種の発現変化を Western blot 法により解析した。

#### 2. 結果

- 1) 生細胞数: MCF-7 細胞において、生細胞数はレプチン刺激により濃度依存性に有意に増加し、 $10^{-6}\text{M}$ で最高値となった。高濃度ブドウ糖刺激によりさらに相加的に増加した。TNF- $\alpha$  は正常又は高濃度ブドウ糖いずれの条件下でも細胞増殖を抑制した。一方、NCI/ADR-RES 細胞では、レプチン刺激、高濃度ブドウ糖濃度によって有意な生細胞数の増殖を認めなかった。
- 2) DNA合成: レプチン刺激により $^3\text{H}$ -thymidine (dThd)取り込みが有意に増加したが、NCI/ADR-RES 細胞では有意な影響は認めず、生細胞数増殖に一致する結果であった。
- 3) 細胞周期関連蛋白: MCF-7 細胞では、cyclinD1, cdk2 の蛋白発現量は、高濃度ブドウ糖、レプチン刺激によ

りともに有意に増加し、TNF- $\alpha$ では減少した。一方、NCI/ADR-RES細胞では、有意な変化を認めなかった。

4) 各種 PKC 分子種発現：MCF-7細胞では、レプチン刺激によって PKC- $\alpha$ の発現量が有意に増加し、高濃度ブドウ糖刺激によりさらに相加的に増加した。TNF- $\alpha$ 刺激では有意に抑制された。一方、PKC- $\theta$ および- $\zeta$ は TNF- $\alpha$ により発現が抑制されたが、レプチンおよび高濃度ブドウ糖刺激では有意な変化を認めなかった。NCI/ADR-RES細胞では、各種刺激による PKC- $\alpha$ 、- $\theta$ および- $\zeta$ 発現量はいずれも変化しなかった。

5) PPAR 分子種の発現：MCF-7細胞は、レプチン及び高濃度ブドウ糖濃度で PPAR $\gamma$  および PPAR $\alpha$ ともに発現量が増加し、TNF- $\alpha$ では完全に抑制された。NCI/ADR-RES細胞では、ともに有意な変化を認めなかった。

### 3. 考察

疫学的研究では肥満や高レプチン血症は乳癌発症のリスクファクターであり、乳癌患者では正常人に比べ血中レプチン濃度が高値を示すとされているが、レプチンの乳癌細胞における役割は全く不明であった。

今回我々は、レプチンが直接乳癌細胞の増殖を刺激、促進させる事をはじめて明らかにした。すなわち、レプチンが MCF-7細胞の細胞周期回転を促進することによって細胞増殖をうながしている事が示唆された。cyclinD1の異所性発現は細胞の癌化を誘発するとの報告がなされているが、MCF-7細胞の細胞周期においても増殖刺激のチェックポイントとなる cdk2や cyclinD1の発現を高濃度ブドウ糖およびレプチンが増強させることを明らかにした。しかし、薬剤耐性株である NCI/ADR-RES細胞では高濃度ブドウ糖およびレプチンによる影響は認めなかった。

PKCは、あらゆる細胞で細胞増殖、蛋白合成などの機能発現に重要な役割を担っているが、組織によってその作用は異なる。今回の結果では、レプチンにより誘導される細胞増殖、特に cdk2及び cyclinD1がチェックポイントとして働いている細胞増殖周期において PKC- $\alpha$ の過剰発現が何らかの役割を担っていることを明らかにした。一方、NCI/ADR-RES細胞では、過去の報告同様 PKC- $\alpha$ の発現量が MCF-7細胞に比して増加していた。しかし、この PKC- $\alpha$ の量は、レプチン、高濃度ブドウ糖のいずれによっても変化を認めなかった。

PPARsは脂質代謝制御に関連する多種の遺伝子の発現をコントロールする転写制御因子である。今回の検討において、高濃度ブドウ糖およびレプチンが MCF-7細胞の PPAR $\gamma$ および PPAR $\alpha$ 発現を増加させた。PPAR $\gamma$ は発癌に重要な関連性があると考えられている。今回の検討でも PPAR $\gamma$ および PPAR $\alpha$ の発現増加とレプチン、高濃度ブドウ糖による細胞増殖増加の関連が示唆された。PPARsの過剰発現と PKC分子種の発現との関連は今後さらに検討すべき重要な課題と思われる。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 奥村三恵は、MCF-7細胞では高濃度ブドウ糖およびレプチンが PKC- $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  および PPAR $\alpha$ の発現増加を介して細胞増殖を促進していることを明らかにし、糖尿病患者における高血糖状態や肥満に伴う高レプチン血症が、乳癌細胞増殖を促進させる可能性を示唆した。しかし、NCI/ADR-RES細胞では、高濃度ブドウ糖、レプチンいずれの存在下でも増殖能は変化せず、乳癌細胞がいったん薬剤耐性を獲得すると高血糖、高レプチン血症による細胞増殖促進作用の影響は消失、薬剤耐性獲得により細胞内の PKC 各種分子種、核内受容体の機能が変化する事が予想された。

本研究は糖尿病および肥満患者における乳癌増殖機序を分子生物学的に解明した数少ない研究で、乳癌発症予防、進展阻止、再発予防および今後の治療法開発の可能性を示唆した、価値ある研究と思われる。

---

[主論文公表誌]

Leptin and high glucose stimulate cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells: reciprocal involvement of PKC- $\alpha$  and PPAR expression

Biochimica et Biophysica Acta 2002; 1592:107-116