

氏名 (本籍)	中 村 憲 昭 (岐阜県)
学位の種類	博 士 (医学)
学位授与番号	甲 第 3 0 8 号
学位授与日付	平成 8 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	非環式レチノイドによる肝発癌の抑制, とくにアポトーシスの誘導とそのメカニズムに関する研究
	1) Induction of apoptosis by acyclic retinoid in the human hepatoma-derived cell line, HuH-7
	2) Apoptosis in human hepatoma cell line induced by 4, 5-didehydro geranylgeranoic acid (acyclic retinoid) via down-regulation of transforming growth factor- α
審 査 委 員	(主査) 教授 武 藤 泰 敏 (副査) 教授 野 澤 義 則 教授 森 秀 樹

論 文 内 容 の 要 旨

悪性新生物の死亡率は、わが国における死亡原因の第一位となって久しく、さらに増加の一途を辿っている。これに対して、癌に対する治療のみならず、いわゆる癌の化学予防を目標にした安全で、かつ有効な物質の開発が待ち望まれている。非環式レチノイド (acyclic retinoid, all-trans-3, 7, 11, 15-tetramethyl-2, 4, 6, 10, 14-hexadecapentaenoic acid) は、肝癌組織に新たに出現する細胞内レチノイド結合タンパク (cellular retinoid-binding proteins) に対して、all-trans retinoic acid (ATRA) と同等の結合能を示す合成レチノイドである。また非環式レチノイドを生後11ヶ月の自然肝発癌症マウス (C3H/HeNCrj) に単回投与するのみで、2年後の肝癌発生を著明に抑制するという抗発癌効果が見出されている。一方近年、アポトーシスという細胞死の一つが、発癌と密接に関連しているという報告があり、アポトーシスの誘導による癌の化学予防の可能性も検討されるようになってきている。またレチノイドは、発生過程においてアポトーシスを誘導し、形態形成に重要な役割を果たしていることは、よく知られている。

そこで申請者は、非環式レチノイドによる肝癌発生抑制のメカニズムを明らかにするため、ヒト肝癌由来細胞株であるHuH-7を用いて、非環式レチノイドによるアポトーシス誘導能の確認、およびその分子生物学的機序をATRA, 9-cis retinoic acid (9CRA) と対比しながら検討した。

対象および方法

HuH-7細胞は、RPMI-1640を基本培地とし、これに1%FCS, 2%ラクトアルブミンの濃度となるように添加、播種した。24時間後培養液を除去、Hanks 洗浄液にて3回洗浄後、FCS-free培養液を用いて48時間培養した。その後再び培養液を除去、各レチノイドを含むFCS-free培養液を添加した。各レチノイド (非環式レチノイド, ATRA, 9CRA) を5 μ M添加し、添加後の生細胞数をカウントした。非環式レチノイドは、ラット初代培養肝細胞を対照に同様の実験をおこなった。また各レチノイドの濃度を変え、その16時間後に生細胞数をカウントした。生細胞数のカウントは、トリパンブルー色素排除法を用いた。アポトーシス誘導の証明として、各レチノイド添加後の細胞よりゲノムDNAを抽出し電気泳動を行った。レチノイド添加24時間後の細胞をカルノア固定液にて固定後、Hoechst 33258染色液にて細胞を30分間染色、蛍光顕微鏡を用いて、クロマチンの濃縮像を観察した。FCS濃度を変更、あるいはhepatotrophic factorsとしてtransforming growth factor- α (TGF- α), epidermal growth factor (EGF), insulin, insulin like growth factor-II (IGF-II), triiodothyronine (T₃), hepatocyte growth factor (HGF) を100ng/mlとなるように培養液に加え、非環式レチノイドによるHuH-7細胞に対する効果への影響を検討した。レチノイド無投与群および非環式レチノイド, ATRA 投与群の細胞から、AGPC法を用いてRNAを抽出した。得られたRNAより1 μ gを用いて、RT-PCR (reverse transcriptase-based polymerase chain reaction) 法によりTGF- α のmRNAの発現量の変動を解析した。同様にRNA 10 μ gを用いて、プローブに³²Pにて標識したc-myc oncogene exon-2のcDNAを用いノーザンブロット法による解析をおこなった。HuH-7細胞に対して、TGF- α またはEGF受容体に対するモノクローナル抗体を培養液に100 μ g/mlの濃度となるように添加し、1, 2, 3日後の生細胞数をカウントした。

結 果

1) ヒト肝癌由来細胞株HuH-7に対するレチノイドの効果: HuH-7細胞は、レチノイド無投与群, ATRAあるいは9CRA群では、生細胞数が経時的に増加するのに対して、非環式レチノイド群では、投与8時間目にすでに生細胞数の減少が見られ、36時間目には生細胞数0と著明な殺細胞効果を認めた。またこの非環式レチノイドによる殺細胞効果は、0.5 μ Mといった低濃度より認められた。

2) 非環式レチノイドによるHuH-7細胞に対するアポトーシスの検討: 非環式レチノイド処理細胞から得られたゲノムDNA電気泳動所見では, 170-180bpの整数倍にバンドを認める, いわゆるステップラダーパターンが観察された。またHoechst 33258による蛍光染色では, 非環式レチノイド群において核クロマチンの濃縮所見が得られた。これらの生化学的および形態学的特徴から, 非環式レチノイドによるHuH-7細胞に対する殺細胞効果は, アポトーシスを誘導することによるものであることが明らかになった。しかしながら, レチノイド無投与群, ATRAあるいは9CRA群では, いずれの所見も得られなかった。

3) 非環式レチノイドによるラット初代培養肝細胞に対する影響: 非環式レチノイドは, ラット初代培養肝細胞に対する生存曲線に何ら影響を与えなかった。

4) FCSおよびhepatotrophic factorsによる非環式レチノイドのHuH-7細胞に対する効果への影響の検討: FCSは最終濃度2.0%で, また6種類のhepatotrophic factorsのうち, TGF- α およびEGFのみが, 非環式レチノイドによるHuH-7細胞への効果を阻害した。

5) 非環式レチノイドによるHuH-7細胞におけるTGF- α およびc-myc oncogene mRNA発現量に対する検討: レチノイド無投与群, あるいはATRA群においては, TGF- α mRNAの発現量に変化を認めないのに対して, 非環式レチノイド群では, 投与30分でその発現量の低下が認められた。またその発現量の低下は, 観察した6時間目まで継続していた。一方c-myc oncogene mRNAの発現量は, 非環式レチノイド, ATRA群あるいはレチノイド無投与群のいずれにおいてもその発現量, および経時的な発現量の変動に差は認められなかった。

6) TGF- α またはEGF受容体に対するモノクローナル抗体のHuH-7細胞に対する効果の検討: TGF- α またはEGF受容体に対するモノクローナル抗体を添加することにより, HuH-7細胞の生細胞数は, いずれも投与2日目以降で減少した。またこの時期の細胞から得られたゲノムDNAの電気泳動所見では, ともにステップラダーパターンが得られ, アポトーシスが誘導されることが示された。

考 察

本研究で用いた非環式レチノイドは, *in vivo*において優れた抗発癌効果を示す合成レチノイドでありその効果にアポトーシス関与の有無を検討することは, 非常に重要であると考え*in vitro*ではあるが, 非環式レチノイドによるアポトーシス誘導能を検討した。非環式レチノイドは, ATRAあるいは9CRAといった天然レチノイドと異なり, ヒト肝癌由来細胞株HuH-7に対して, 0.5 μ Mといった低濃度で著明な殺細胞効果を示した。この効果は生化学的ならびに形態学的特徴から, アポトーシスを誘導することによるものであることが示された。さらに, 非環式レチノイドによるこのアポトーシス誘導の分子生物学的機序を検討した。非環式レチノイドによるアポトーシス誘導は, 外因性にTGF- α , EGFを投与することにより阻害される。しかしながらHuH-7細胞では, TGF- α がautocrine loopを形成し, 自己のアポトーシスを防ぐ機構が働いていると考え, この結果は矛盾を生じている。そこで非環式レチノイドがHuH-7細胞のTGF- α 発現に何らかの影響を与えている可能性があると考え, その発現量の変動をRT-PCR法を用いて検討した。その結果, 非環式レチノイドは, 投与30分といったわずかな時間の後に, すでにその発現量を低下させることが明らかとなった。つまり非環式レチノイドは, HuH-7細胞に対して, TGF- α のautocrine loopを阻害することによりアポトーシスを誘導している可能性が示された。またこの仮説はTGF- α またはEGF受容体に対するモノクローナル抗体によりアポトーシスが誘導されることによっても裏付けられる。こうした非環式レチノイドにより示される遺伝子発現の変化は, ワイリーらが提唱したアポトーシス誘導の遺伝子発現の変化に一致した所見である。またTGF- α は, 正常肝細胞では発現しておらず, 前癌病変と考えられるaltered fociから発現し始め, 肝発癌に重要な役割を果たしていることは, 非環式レチノイドによるこのTGF- α のautocrine loop阻害によるアポトーシス誘導は, 肝癌細胞のみならず前癌細胞に対しても効果を発揮すると考えることができ, 肝癌の化学予防の研究の上で非常に興味深い成績である。

以上より, 非環式レチノイドは, ヒト肝癌由来細胞株に対してアポトーシスを誘導し, ヒト肝癌の化学予防に対しても有望な物質であり, 臨床応用の可能性が強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者中村憲昭は, 非環式レチノイドがヒト肝癌由来細胞株に対してアポトーシスを誘導すること, さらにその分子生物学的機序としてTGF- α autocrine loop機構の阻害によるものであることを示した。これらの新知見は肝臓病学, ビタミン学および腫瘍学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

- 1) Induction of apoptosis by acyclic retinoid in the human hepatoma-derived cell line, HuH-7
Biochemical and Biophysical Research Communications 207 (1) : 382~388, 1995
- 2) Apoptosis in human hepatoma cell line induced by 4, 5-didehydro geranylgeranoic acid (acyclic retinoid) via down-regulation of transforming growth factor- α
Biochemical and Biophysical Research Communications 219 (1) : 100~104, 1996