

氏名(本籍)	小島 則 昭 (愛知県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 536号
学位授与日付	平成 15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	Evaluation of carcinoembryonic antigen mRNA from gastric cells under necrotic or apoptotic condition by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)
審査委員	(主査) 教授 佐 治 重 豊 (副査) 教授 森 秀 樹 教授 清 島 満

論文内容の要旨

胃・大腸癌細胞ではcarcinoembryonic antigen (CEA)やcytokeratine20 (CK-20)のmRNAの発現が100%に観察されるが、転移陰性リンパ節ではこれらmRNAの発現を認めないのが原則である。教室におけるRT-PCR法を用いた郭清リンパ節でのCEAおよびCK20 mRNAの発現の有無に関する研究結果では、Stage I Aの早期胃癌で組織学的に転移陰性の領域リンパ節でも8.6%にこれら mRNAの発現が観察された。すなわち、微小転移の存在が推察されたわけであるが、これらPCR陽性細胞が即、癌の転移や再発を意味するかは未だ議論の多いところである。一般に、転移陽性リンパ節の中には、生きた癌細胞、アポトーシス状態にある癌細胞および壊死した癌細胞が混在しており、CEAやCK-20mRNAの発現が如何なる状態の癌細胞に由来するのかが未だに定かでなく、この問題に着目した研究は、検索した限りでは認められなかった。そこで、申請者らは各種細胞死状態の癌細胞でのCEA mRNAの発現程度を詳細に検索し、臨床的微小転移を惹起する症例の予測法としてRT-PCR法の検索意義を検討した。

研究対象と研究方法

細胞死状態としてapoptosis(AP)とnecrosis(NE)を作製し、以下の検討を行った。

①アポトーシス：MKN-45(wild type p53)に低用量の抗癌剤 (5FU 100 μ g/ml+CDDP 20 μ g/ml) を接触させると高率にapoptosisが誘導される。そこで、 1×10^6 個のMKN-45を5FU 200 μ gとCDDP 40 μ g/2ml添加培地に接触させ、24時間後(FC24)と48時間後(FC48)の細胞をAP群とした。同様にTNF α 100ng/mlとIFN γ 100 ng/mlを接触させた場合もapoptosisが高率に誘導されるため、接触24時間後の細胞(TI24)と48時間後の細胞(TI48)もAP群として実験に用いた。

②ネクローシス：液体窒素を用いて標定細胞を凍結融解処理すると、細胞膜が破壊されnecrosis状態になる。そこで、 1×10^6 個のMKN-45を液体窒素で10分間凍結・室温で自然融解する操作を5回繰り返して作製した細胞をNE群として用いた。なお、凍結融解処理直後をNE0h、処理後42°Cで3時間および6時間培養を継続したものを、それぞれNE3h、NE6hと3群に垂分類した。

③コントロール： 1×10^6 個のMKN-45を抗癌剤非添加培地で培養した(コントロール)群を作製した。なお、処置直後をControl 0h、通常培地で24時間培養した細胞をControl 24h、48時間培養したものをControl 48hとした。

なお、各処理細胞は一部をpropidium iodide (PI) とHoechstを用いて蛍光染色し、生細胞、アポトーシス細胞およびネクローシス細胞の割合を観察した。また、Apoptosis Ladder Detection Kitを用いて各sampleよりDNAを抽出し、SYBR Green Iにて染色し、電気泳動するとともに、ApoAlert DNA Fragmentation Assay Kitを用いてTUNEL法を利用したFACS(解析にはCell Quest computer softwareを使用)にて核の断片化状態を観察した。

RT-PCR法：ISOGENを用いて抽出したtotal RNAの2 μ gを用いて20 μ lの反応液を作製し、逆転写酵素に

MMLVを用い42°C, 1時間でcDNAを合成した。CEA mRNAのPCR productは, cDNA solution 2 μ lを用いて25 μ lの反応液を作製し, 95°Cで2分denaturation後, 95°C, 69°Cおよび72°Cで各1分間の反応を26cycles行い, 72°Cでfinal extensionを追加し, 166-bp DNA fragmentを作製した。また, GAPDH mRNAに対して24 cyclesの反応を行い, 328-bp DNA fragmentのPCR productを作製した。得られたPCR productを電気泳動し ethidium bromideで染色後, FASIIとATTO densitograph computer softwareを用いて解析した。

研究結果

①凍結融解処理群：凍結融解処理にて100%のネクロシス細胞が得られた。Control 0h, NE0h, NE3hおよびNE6hから抽出可能であったtotal RNAは, それぞれ74.4 μ g, 85.2 μ g, 4.08 μ g, および2.88 μ gで, 短時間で減少した。しかし, total RNA 2 μ gを用いたRT-PCRではNE0h, NE3hおよびNE6hにおけるGAPDHおよびCEA mRNAの発現はControl 0hと同程度であった。

②FC群：薬剤接触後経時的にアポトーシス細胞とネクロシス細胞の割合が増加し, GAPDHおよびCEA mRNA発現は減少する傾向を示した。また, GAPDHおよびCEA mRNA発現の減少はGAPDHよりCEA mRNAで著明であった。

③TI群：経時的に, アポトーシス細胞とネクロシス細胞の割合が増加したが, GAPDHおよびCEA mRNA発現はほぼ一定した値を示した。

考察と結語

結果の①より, ネクロシス細胞であってもRT-PCR法でCEA mRNA発現が観察される可能性が示されたが, mRNAは極めて短時間で崩壊するため, 郭清リンパ節を用いた検討でネクロシス細胞がCEA mRNAを発現した可能性は極めて低いと思われた。また, 結果の②・③から, アポトーシス細胞からはmRNAの発現を認めず, RT-PCR陽性のmRNAは生細胞と一部のネクロシス細胞由来であると仮定すると, 5FUとCDDP接触群でCEA mRNAの発現が减弱したが, これはアポトーシス細胞からのmRNAの発現ではなく, 抗癌剤との接触によって生細胞とネクロシス細胞からのmRNA発現が减弱した結果と推察される。一方, アポトーシス細胞からもmRNAの発現が観察されると仮定すると, 核の断片化を意味するアポトーシス細胞では, 断片化されたDNAの長さによってはmRNAを発現するものと, しないものが混在する可能性が推察された。この原因としてアポトーシス誘導経路の違いが関与している可能性は否定困難で, 今後の検索が必要である。

以上の結果, アポトーシス細胞ではmRNAを発現している細胞と発現していない細胞が混在する可能性が示されたため, 郭清リンパ節中にCEA mRNAの発現を認めても, アポトーシス由来細胞のみが存在していた可能性を否定することは困難である。しかし, 郭清リンパ節中にCEA mRNAの発現を認めた場合, 癌の生細胞が直前まで存在していた可能性は高いと推察されるので, この可能性を前提に, 慎重な術後の追跡と治療方針の決定が必要である。

論文審査の結果の要旨

申請者小島則昭は, ヒト胃癌細胞株, MKN-45を用い, low dose CDDP+5-FUあるいはTNF- α +IFN- γ との接触でアポトーシスを, 液体窒素を用いた凍結融解で壊死細胞を作製し, RT-PCR法でCEA mRNAの発現の有無を詳細に検索し, 臨床的微小転移の可能性を予測した。その結果, アポトーシス細胞ではCEA mRNAの発現を認める場合と認めない場合が混在する可能性を初めて示唆した。これらの研究結果は, 腫瘍外科学, とくに微小転移の診断法の分野で少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Evaluation of Carcinoembryonic Antigen mRNA from Gastric Cells under Necrotic or Apoptotic Condition by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)
Surgery Today. 2003 ; in press