

氏名	ほんじょう そういちろう 本城 総一郎
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第494号
学位授与年月日	平成17年 3月11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	COX-2 inhibitor, NS398, enhances Fas-mediated apoptosis via modulation of PTEN-Akt pathway in human gastric carcinoma cell lines (COX-2 阻害剤 NS398 はヒト胃癌細胞株において PTEN-Akt を調節することにより Fas 誘導アポトーシスを引き起こす)
学位論文審査委員	(主査) 山田 一夫 (副査) 井藤 久雄 村脇 義和

学位論文の内容の要旨

種々のヒト癌細胞において抗 Fas 抗体誘導アポトーシスに対する抵抗性が知られている。一方、シクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) は多種多様な癌細胞で発現しており、癌の増殖・進展やアポトーシス抵抗性に関与していることが知られている。そこで本研究ではヒト胃癌培養細胞を用い、COX-2 阻害剤 NS398 と抗 Fas 抗体 CH-11 の効果について細胞増殖や Fas 関連アポトーシスに焦点をあて、解析を行った。

方法

胃癌細胞株 7 株 (MKN-1, -7, -28, -45, -74, TMK-1, KATO-III) における COX-2 タンパクの発現をウエスタンブロット法で検出した。このうち、COX-2 高発現 MKN-45 と非発現 KATO-III を用い、非投与群、NS398 投与群 (100 μ M)、CH-11 投与群 (100 ng/ml)、両者同時投与群の 4 群に分類し投与後 24、48、72 時間後に細胞を回収、細胞増殖を解析し、さらに、回収した細胞を Hoechst 33258 染色および TUNEL 法を用いて形態的にアポトーシス細胞を検出した。またそれぞれの群の細胞をフローサイトメトリーにて細胞周期解析した。次に NS398 投与時におけるアポトーシス関連タンパクの経時的変化をウエスタンブロット法で解析した。

結 果

COX-2 タンパクは胃癌細胞株 7 株中、5 株で種々の程度に発現を示した。MKN-45 は最も高発現し、KATO-III は発現がなかった。MKN-45、KATO-III に CH-11 を単独で投与すると、経時的に増殖抑制がみられた。また NS398 を単独で投与すると、MKN-45 では経時的に増殖抑制がみられたが、KATO-III では抑制効果が乏しかった。一方、CH-11 と NS398 同時投与した群では、いずれも細胞増殖は抑制されたが、特に MKN-45 で著明に増殖が抑制された。

Hoechst 染色による MKN-45 のアポトーシス・インデックスは CH-11 投与で 18.5%、NS398 投与で 5.8%であったが、同時投与群ではアポトーシス誘導が著しく亢進し、60%以上となった。TUNEL 法においても同様の結果が得られた。細胞周期解析では NS398 投与群では MKN-45 における pre G1 fraction の変動はわずかであり、G1 期停止が示唆された。CH-11 投与群では pre G1 fraction が増加していた。一方、同時投与群では pre G1 fraction が著増しており、Hoechst 染色の解析と一致していた。

次に MKN-45 において NS398 のアポトーシスに及ぼす影響を PTEN、Akt に着目し、ウエスタンブロット法でタンパクを検出した。NS398 投与群において PTEN、Bad の増加とリン酸化 Akt の減少が示された。

考 察

ヒト胃癌培養細胞株は、種々の程度に COX-2 タンパクを発現していた。この内、高発現株 MKN-45 では NS398 処理にて細胞増殖が抑制されたが、非発現株の KATO-III では抑制効果が乏しかった。なお、胃癌培養細胞株における Fas 発現はすでに確認されており (Osaki et al. Gastric Cancer/2001)、抗 Fas 抗体 CH-11 投与にて MKN-45 および KATO-III の細胞増殖が継時的に抑制され、その機序はアポトーシス誘導であった。従って、COX-2 および Fas とも胃癌培養細胞でアポトーシス誘発シグナル伝達に関与することが示されたが、両者の関連についての検討はない。

COX-2 高発現株 MKN-45 に CH-11 と NS398 の同時投与すると、アポトーシスが著明に誘導され、相乗的な効果を示したが、KATO-III ではこうした効果がなかった。そこで、各種アポトーシス関連分子の発現を検討したところ、アポトーシス促進性に作用する Bad の発現が亢進していた。さらに、癌抑制遺伝子産物で phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K) の 3'脱リン酸化酵素である PTEN の発現亢進、PI3K の下流で活性化されるリン酸化 Akt の発現低下が見い出された。すなわち、生存のシグナルを伝達する PI3K-Akt 経路が抑制されることが MKN-45 細胞のアポトーシス誘発に重要な役割を果たしているものとみなされた。

結 論

COX-2 はヒト胃癌培養株で種々の程度に発現しており、その阻害剤である NS398 と抗 Fas 抗体を同時添加すると、COX-2 高発現株 MKN-45 では著しいアポトーシス誘発効果が示された。その機序として生のシグナルを伝達する PI3K-Akt 経路の抑制が重要視された。

論文審査の結果の要旨

本研究ではヒト胃癌培養細胞株における COX-2 発現を検討し、その阻害剤 NS398 と抗 Fas 抗体誘発アポトーシスについて分子生物学的解析を行っている。COX-2 は種々の程度に発現していたが、高発現株 MKN-45 と非発現株 KATO-III を用いて検討を進めている。その結果、MKN-45 では NS398、抗 Fas 抗体処理によりアポトーシスが誘発されるが、同時添加によりその効果が相乗的に増強されること、その機序は生のシグナルを伝達する PI3K-Akt 経路の抑制が重要であることを示した。本研究で解明された事項は、COX-2 阻害剤および抗 Fas 抗体を用いたヒト胃癌の分子標的治療の展開に重要な基礎的知見を提供しており、明らかに学術の水準を高めたものと認められる。