

学位論文の要旨

学位の種類

博士

氏名

長峯 美穂

学位論文題目

PPAR γ ligand induced apoptosis through a p53- dependent mechanism
in human gastric cancer cells

〔 ヒト胃癌細胞において PPAR γ リガンドにより誘導される
アポトーシスは p53 を介する 〕

共著者名：奥村利勝、丹野誠志、福田（澤向）光子、本村 亘、高橋伸彦、高後 裕

Cancer Sci. 94: 338-343, 2003

研究目的

Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) は核内ホルモン受容体 superfamily の member であり、脂質代謝、インスリン抵抗性、炎症、血管新生、動脈硬化などに関与することが知られている。加えて、当初インスリン抵抗性改善剤として開発された thiazolidinediones がこの PPAR γ のリガンドであることが明らかにされ、thiazolidinediones によって様々な腫瘍細胞の増殖が抑制されることから、PPAR γ の活性化は抗腫瘍効果を有し、PPAR γ は新たな腫瘍制御の分子ターゲットとして脚光を浴びている。これまで我々は PPAR γ のリガンドである thiazolidinediones が胃癌、膵癌、肝癌などの消化器癌に細胞増殖抑制作用、アポトーシス誘導作用、腫瘍細胞の浸潤能の抑制作用があることを報告してきた。¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾ これらの作用はいずれも癌細胞の増殖進展を抑制する効果であり、PPAR γ リガンドは有効な消化器癌の治療法のオプションの一つに成りうることを期待している。

PPAR γ リガンドによる細胞増殖抑制作用については、これまでの研究から細胞周期の G1-S 期の進展を阻止する G1 arrest を誘導すること、またアポトーシスを誘導するためと推定される。我々はこれまで PPAR γ リガンドによる消化器癌の G1 arrest のメカニズムに細胞周期調節の負の因子である p27^{kip1} 蛋白が蓄積すること、この p27^{kip1} 蛋白の蓄積は p27^{kip1} の分解系である ubiquitin-proteasome 系が抑制された結果であることを見出し報告してきた。²⁾³⁾⁴⁾ しかし PPAR γ リガンドによるアポトーシス誘導作用のメカニズムは明らかにできていない。p53 は癌抑制遺伝子として、G1 arrest とアポトーシス誘導作用を有していることが明らかにされていることを考慮し、我々は PPAR γ リガンドによるアポトーシスが p53 を介して発揮されるとの仮説をたてこれを検証することを本研究の目的にした。

材料・方法

1. 胃癌細胞株

ヒト胃癌由来細胞 4 株 MKN28 (mutated p53), MKN45 (wild-type p53), MKN74 (wild-type p53), KATO III (deleted p53) は既報³⁾ に従って培養した。

2. 試薬

PPAR γ リガンドである thiazolidinediones の一つである troglitazone は三共製薬より提供を受けた。PPAR γ の antagonist である Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) は Tocris 社から購入した。

3. アポトーシスの検出

アポトーシスの検出は Hoechst 33258 を用いた蛍光染色にて検討した。Troglitazone もしくは DMSO で処理した細胞は 10 μ M の Hoechst 33258 で 1 時間蛍光染色し、顕微鏡下で観察した。400 倍で 10 視野におけるアポトーシス細胞の割合を計測した。

4. p53 と p27^{kip1} の Western blot

p53 と p27^{kip1} 蛋白の発現は Western blot により解析した。1 次抗体にはウサギ抗 p53、p27^{kip1} 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を 1,000 倍希釈にして使用した。2 次抗体は抗 HRP-Rabbit-IgG (H&L) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を 1,000 倍希釈で反応させた後、ECL detection kit (Amersham) でシグナルの検出を行った。

5. p53 dominant negative 細胞の作成

p53 dominant negative 細胞は MKN74 細胞に pCMV-p53mt135 expression vector (Clontech Lab.) を lipofection 法にて transfection して作成した。2 週間後に 12 のクローンが回収され、p53 蛋白の強発現を認めた細胞を p53 dominant negative 細胞として使用した。pCMV β vector を transfection した細胞をコントロール(mock)細胞とした。

6. Transfection と luciferase assay

上述の p53 dominant-negative 体が確かに p53 標的遺伝子の転写活性を低下させているかを確認する為に、その p53 dominant-negative 体と mock 細胞に p53 TA-luciferase vector を transfection して既報に準じて luciferase assay²⁾を行った。

7. WST-1 assay

細胞増殖は既報¹⁾に従って WST-1 assay で評価した。処理した細胞を Cell Counting Kit (Dojindo) にて、インキュベーター内で 1 時間反応を行った後、プレートリーダーにて吸光度 (450nm) を測定した。

成 績

1. Troglitazone による PPAR γ を介したアポトーシスの誘導

Troglitazone による MKN28, MKN74, MKN45 および KATO III におけるアポトーシスの割合を測定した。Troglitazone により MKN28, MKN45, MKN74 ではコントロールに比べてアポトーシスの割合が有為増加していたが、唯一 p53 欠損の KATO III では有意なアポトーシスの誘導は認められなかった。次にこの troglitazone によるアポトーシスが PPAR γ を介したものであることを確かめる為に、PPAR γ の antagonist である Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) で 12 時間 MKN74 細胞を処理後に troglitazone を添加、さらに 48 時間後に回収し、Hoechst 染色にてアポトーシスを観察した。その結果、BADGE により troglitazone によるアポトーシスの誘導は阻止された。

2. Troglitazone によるアポトーシスの誘導における p53 の影響

MKN74 細胞では troglitazone により時間依存性に p53 蛋白の発現増強を認め、p53 が troglitazone によるアポトーシスの誘導に関与する可能性が示唆された。次に、luciferase assay で転写活性が低下していることを確認した。p53 dominant-negative 細胞に troglitazone を添加してアポトーシスが誘導されるか否かを検討した。この dominant-negative 細胞では、troglitazone により有意なアポトーシス細胞の増加を認めず、troglitazone によるアポトーシスは p53 を介していることが明らかになった。

3. Troglitazone による細胞増殖抑制における p53 と p27^{kip1} の影響

p53 dominant negative 細胞では、mock 細胞と同様に troglitazone によって有意な細胞増殖抑制が wst-1 assay で認められた。Troglitazone 添加後の p27^{kip1} を Western blot 法にて検討した結果、mock 細胞と同様に p53 dominant negative 細胞においても、troglitazone によって時間依存性に p27^{kip1} 蛋白の増強を認めた。

考 按

我々は1999年 troglitazone が胃癌細胞 MKN45 に細胞増殖抑制とアポトーシスを誘導することを報告した。本研究では、troglitazone は MKN45 細胞のみならず、MKN28, MKN74 細胞にもアポトーシスを誘導することを明らかにした。しかし検討した胃癌細胞株のなかで唯一 p53 欠損の KATOIII 細胞ではアポトーシスを誘導しないことも明らかにでき、p53 がアポトーシスの誘導に重要である可能性が示唆された。更に、troglitazone によりアポトーシスが誘導される MKN74 細胞で p53 蛋白の発現が増強すること、p53 dominant negative 細胞を作成して検討した結果、p53 を介してアポトーシスが誘導されることを初めて明らかにできた。加えて、troglitazone が本当に PPAR γ を介してアポトーシスを誘導することも PPAR γ の antagonist を用いて明らかにできた。一方 p53 dominant negative 細胞では mock 細胞と同様に、troglitazone によって有意な細胞増殖抑制が生じることが示され、p53 は troglitazone による細胞増殖抑制には深く関与しないことが示唆された。また p53 dominant negative 細胞で troglitazone がアポトーシスを誘導しないが細胞増殖を抑制するとの本成績は、troglitazone による細胞増殖抑制とアポトーシス誘導が異なるメカニズムを介して発揮されることを示した。p53 dominant negative 細胞で troglitazone によって p27^{kip1} 蛋白発現増強を認めることを示した本研究結果は、これまで我々が報告してきた p27^{kip1} 蛋白の増加が細胞増殖抑制に重要であるとする仮説を更に支持すると考えた。

結 論

以上の成績から、胃癌細胞において troglitazone は PPAR γ に結合し p53 を介してアポトーシスを誘導することが明らかにできた。加えて、troglitazone による細胞増殖抑制とアポトーシス誘導作用のメカニズムは異なる細胞内シグナル伝達を介することが示唆できた。これらの知見は PPAR γ をターゲットとした新たな消化器癌治療法の開発に向けて意義深いものと考えている。

引用文献

1. Takahashi N, Okumura T, Motomura W, Fujimoto Y, Kawabata I, Kohgo Y. Activation of PPAR γ inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells. FEBS Lett 455: 135-139, 1999
2. Motomura W, Okumura T, Takahashi N, Obara T, Kohgo Y. Activation of PPAR γ by troglitazone inhibits cell growth through the increase of p27^{kip1} in human pancreatic carcinoma cells. Cancer Res 60: 5558-5564, 2000
3. Takeuchi S, Okumura T, Motomura W, Nagamine M, Takahashi N, Kohgo Y. Troglitazone induces G1 arrest by p27^{Kip1} induction that is mediated by inhibition of proteasome in human gastric cancer cells. Jpn J Cancer Res 93: 774-782, 2002

参考論文

4. Motomura W, Takahashi N, Nagamine M, Sawamukai M, Tanno S, Kohgo Y, Okumura T. Growth arrest by troglitazone is mediated by p27^{Kip1} accumulation which is resulted from dual inhibition of proteasome activity and Skp2 expression in human hepatocellular carcinoma cells. Int J Cancer 108: 41-46, 2004.
5. Motomura W, Nagamine M, Tanno S, Sawamukai M, Takahashi N, Kohgo Y, Okumura T. Inhibition of cell invasion and morphological change by troglitazone in cultured human pancreatic cancer cells. J Gastroenterol in press

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	長峯 美穂
<u>審査委員長</u> 谷 口 隆 信 ㊞			
<u>審査委員</u> 小 川 勝 洋 ㊞			
<u>審査委員</u> 高 後 裕 ㊞			
<u>審査委員</u> 奥 村 利 勝 ㊞			
学 位 論 文 題 目			
PPAR γ ligand-induced apoptosis through a p53-dependent mechanism in human gastric cancer cells. (ヒト胃癌細胞において PPAR γ リガンドにより誘導されるアポトーシスはp53を介する)			
共著者名 奥村利勝、高橋伸彦、丹野誠志、澤向光子、本村旦、高後裕			
掲載学会雑誌名 Cancer Sci. 94: 338-343、2003			

Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)は核内ホルモン受容体の一種であり、当初インスリン抵抗性改善剤として開発されたトリグリタゾンなどのthiazolidinedione系薬剤がPPAR γ のリガンドであることが明らかにされ、同時にこのトリグリタゾンが種々の腫瘍細胞に対して増殖抑制効果を示すことも明らかにされPPAR γ の腫瘍制御分子としての機能が注目されている。著者らは代表的な細胞周期調節因子であるp53およびp27kip1とPPAR γ との関連について胃癌細胞株を用いて検討した。胃癌細胞株はp53を有するMKN28, MKN45, MKN74細胞とp53を欠失するKATOIII細胞を用いた。胃癌細胞培養液中にトリグリタゾンを添加するとMKN28, MKN45, MKN74細胞においては有意なアポトーシスの増加が観察されたがKATOIII細胞では認められなかった。MKN74細胞でのアポトーシスの増加はPPAR γ の特異的なアンタゴニストの前処置により消失し、トリグリタゾンによるアポトーシスは確かにPPAR γ を介していると共にp53を経由したものであることが示唆された。次いで、MKN74細胞に機能欠損型のp53ミュータントを過剰に発現させp53機能を喪失したドミナントネガティブ細胞を作成しトリグリタゾンによるアポトーシスについて検討した。トリグリタゾンによるアポトーシスはドミナントネガティブ細胞においては全く認められずトリグリタゾン/PPAR γ によるアポトーシスは確かにp53を介していることが示された。最後に、トリグリタゾンの増殖抑制効果について検討した所、野生型のMKN74細胞のみならずドミナントネガティブMKN74細胞においても増殖抑制が認められ、トリグリタゾンの増殖抑制効果はp53以外の因子を介したものであると考えられた。そこでp27kip1蛋白質について検討した所、トリグリタゾン添加によっていずれの細胞においてもp27kip1蛋白質の発現増強が観察され、トリグリタゾンによる増殖抑制効果はp27kip1蛋白質を介したものであることが示唆された。以上の実験結果から胃癌細胞においてトリグリタゾンはPPAR γ に結合しp53を介してアポトーシスを誘導すること、しかしながらトリグリタゾンの増殖抑制作用はp53を介さずp27kip1を含めた他の因子を経由していることを考察している。これらの結果はPPAR γ を標的とした消化器癌治療法の開発に向けて重要な知見を提供するものであり、新しい癌治療の研究に発展することが期待される。申請者に対して諮問を行い、当該分野に関する申請者の知識/経験/見識は課程博士に相応しいものであると判断しました。以上、論文/諮問による審査の結果、博士に値すると判定したことを御報告申し上げます。