

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	竹内 茂
-------	----	----	------

学位論文題目

Troglitazone induces G1 arrest by p27^{kip1} induction that is mediated by inhibition of proteasome in human gastric cancer cells

(ヒト胃癌細胞において、トログリタゾンがプロテアソームの抑制を介した p27^{kip1} の誘導によって G1 arrest を引き起こす)

共著者名 奥村利勝、本村 亘、長峯美穂、高橋伸彦、高後 裕
掲載学会雑誌名 未公表

研究目的

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ は核内受容体 superfamily の一員で、脂質代謝に深く関与することが明らかにされているが、最近の研究で、PPAR γ の発現は脂肪細胞だけでなく、大腸癌や乳癌、膵癌の細胞などにおいても認められている。我々はこれまで、ヒト胃癌細胞株の一つである MKN-45 に PPAR γ が発現し、PPAR γ のリガンドが細胞増殖抑制とアポトーシスを誘導すること、また、膵癌細胞において PPAR γ のリガンドであるトログリタゾンが細胞周期の負の調節因子である p27^{kip1} の発現亢進を介した細胞増殖抑制を起こすことを明らかにした。しかし、この p27^{kip1} の発現亢進のメカニズムについては明らかにされていない。

本研究では、1) MKN-45 以外のヒト胃癌細胞株においても PPAR γ の発現があるか、2) トログリタゾンによる p27^{kip1} の発現亢進を介した細胞増殖抑制の作用があるか、ということ明らかにしようとした。また、3) 細胞増殖抑制のメカニズム、について、基質特異的に蛋白分解を行っているプロテアソームが p27^{kip1} 蛋白の発現亢進に関与するかを明らかにしようとした。

材 料・方 法

1. 細胞

胃癌細胞は4つのヒト胃癌細胞株 MKN-28, MKN-45, MKN-74 (Japanese Cancer Research Resources Bank, Tsukuba, Japan) 及び KATO-III (東北大学加齢医学研究所, Japan) を使用した。

2. RT-PCR 法及び Northern blot 法による PPAR γ mRNA の検出

各胃癌細胞株に PPAR γ mRNA が発現しているか否かを RT-PCR 及び Northern blot 法で検討した。RT-PCR 法は Auboeuf らの報告 (Diabetes, 446, 1319, 1997) に従って、Northern blot 法は我々の既報 (Takahashi N, et al., FEBS Lett, 455, 139, 1999) に従った。

3. Western blot 法による PPAR γ 蛋白の検出

各胃癌細胞株において PPAR γ 蛋白の発現を Western blot 法により検討した。各胃癌細胞株よりそれぞれ蛋白を抽出し、monoclonal antibody against human PPAR γ (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) を使用して、Western blot 法を行った。

4. 細胞増殖の評価

トログリタゾンの胃癌細胞増殖に及ぼす影響は MTT assay 法の簡易法である WST-1 assay 法によって評価した。トログリタゾン (0, 0.1, 1, 10, 100 μ M) を添加し、目的とする時間に各細胞数を WST-1 assay 法で測定した。

5. 細胞周期プロフィールの評価

トログリタゾンの細胞周期に及ぼす影響をフローサイトメトリーを用いて検討した。各胃癌細胞株にコントロールの DMSO または 100 μ M のトログリタゾンを添加し、0 または培養 36 時間で回収し propidium iodide で処理した後、DNA 含量をフローサイトメトリーで解析した。

6. Western blot 法による cyclin dependent kinase (CDK) inhibitor 蛋白発現の検討

トログリタゾンによる胃癌細胞の増殖抑制のメカニズムを明らかにするため、細胞周期の負の調節因子である CDK inhibitor の p27^{kip1} および p21^{cip1/waf1} の蛋白発現を Western blot 法により検討した。各胃癌細胞にトログリタゾンを 100 μ M を添加し、0, 6, 12, 24, 36 時間で蛋白を抽出した。CDK inhibitor である p27^{kip1}, p21^{cip1/waf1} の蛋白発現は goat anti-p27 polyclonal antibody または goat anti-p21 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) を使用し Western blot 法で検討した。

7. Proteasome inhibitor, ラクタシスチン, の細胞増殖及び p27^{kip1} 発現に及ぼす影響の検討

Proteasome inhibitor であるラクタシスチン (BIOMOL Research Laboratories, Inc., Plymouth, PA, USA)

の胃癌細胞増殖に及ぼす影響を WST-1 assay によって評価した。MKN-74 細胞にラクタシスチン(0, 0.1, 1, 10 μ M)を添加し、目的とする時間に各細胞数を WST-1 assay で測定した。また、ラクタシスチンによる p27^{kip1} の蛋白発現を Western blot 法により検討した。MKN-74 細胞にラクタシスチン (10 μ M) を添加し、0, 6, 12, 24, 36 時間で蛋白を抽出し、Western blot 法で検討した。

8. Proteasome 活性の評価

トログリタゾンの胃癌細胞に対するプロテアソーム活性への影響は、蛍光基質である Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC を用いた Proteasome Activity Assay 法にて評価した。MKN-74 細胞にトログリタゾン (0, 1, 10, 100 μ M) を添加し、48 時間で細胞抽出液を回収した。10 μ l (100 μ g) の細胞抽出液を Proteasome Assay Kit (Boston Biochem, Inc., Cambridge, USA) にて 750 秒間持続モニターした。

成 績

1. 胃癌細胞に PPAR γ が発現しているか否かを、ヒト胃癌細胞株を用いて検討した。検討した4つのヒト胃癌細胞株すべてにおいて、RT-PCR 法と Northern blot 法で PPAR γ mRNA の発現が、Western blot 法で PPAR γ 蛋白の発現が認められた。
2. 胃癌細胞におけるトログリタゾンの細胞増殖に及ぼす影響を WST-1 assay によって検討した。トログリタゾンは KATO-III 以外の検討した全ての胃癌細胞株の細胞増殖を用量依存性 (0, 0.1, 1, 10, 100 μ M) に抑制した。KATO-III では 100 μ M の場合でのみ細胞増殖の抑制が観察された。
3. トログリタゾンによる胃癌細胞増殖抑制のメカニズムを明らかにするために、トログリタゾンの細胞周期に及ぼす影響をフローサイトメトリーを用いて検討した。100 μ M のトログリタゾンを各胃癌細胞株に添加すると、コントロールの DMSO での細胞周期プロフィールに比べて、G1 期の細胞の割合が高く、S 期の細胞の割合は低かった。すなわち、G1 arrest を誘導していることが示唆された。
4. トログリタゾンによる胃癌細胞の G1 arrest のメカニズムを明らかにするため、既知の G1 arrest に関与する分子である CDK inhibitor の p27^{kip1} および p21^{cip1/waf1} の蛋白発現が、トログリタゾンにより影響受けるか否かを Western blot 法により検討した。MKN-28, MKN-45, MKN-74 細胞においては p27^{kip1} および p21^{cip1/waf1} の発現は経時的に亢進した。KATO-III 細胞では、p27^{kip1} の発現は経時的に亢進したが、p21^{cip1/waf1} についてはその発現を認めなかった。この結果から、トログリタゾンによる G1 arrest のメカニズムにおいては p27^{kip1} の作用が重要であることが示唆された。
5. ラクタシスチンによってプロテアソーム活性を抑制すると、MKN-74 細胞では細胞増殖が用量依

存性に抑制され、p27^{kip1} 蛋白の発現は経時的に亢進した。

6. MKN-74 細胞において、トログリタゾンはプロテアソームを用量依存性に抑制した。

考 察

PPAR γ の発現は脂肪細胞だけでなく、大腸癌や乳癌、前立腺癌などにおいても認められている。我々は、これまでの報告で、胃癌細胞株である MKN-45 において、PPAR γ mRNA および蛋白の発現があることを明らかにしている。本研究では、MKN-45 以外の胃癌細胞株 MKN-28, MKN-74 及び KATO-III にも PPAR γ mRNA および蛋白の発現があることを示し、また、いずれの胃癌細胞株においても、トログリタゾンによって細胞増殖抑制が起こることを明らかにした。さらに、フローサイトメトリー法においてその増殖抑制が G1 arrest であることを示した。トログリタゾンによる G1 arrest の誘導は、これまでに大腸癌や膀胱癌、乳癌細胞などで示されているが、本研究は、さまざまな癌細胞において PPAR γ の活性化が、G1 arrest を誘導するということを支持した。トログリタゾンによる G1 arrest 誘導のメカニズムについては明らかにされていなかったが、我々は、膀胱癌細胞では、トログリタゾンによる p27^{kip1} の発現亢進を介した細胞増殖抑制が起こることを明らかにしている。本研究では、いずれの胃癌細胞株においてもトログリタゾンによって p27^{kip1} の発現の亢進が認められ、トログリタゾンによる G1 arrest 誘導のメカニズムには p27^{kip1} の作用が重要であることが、胃癌細胞でも示唆された。

最近、ユビキチン・プロテアソームシステムが p27^{kip1} の分解を制御しているとの報告がされている。我々は、トログリタゾンによる p27^{kip1} の蓄積が起こるメカニズムも、このユビキチン・プロテアソームシステムが関与すると考え、1)プロテアソームを阻害することで細胞増殖抑制や p27^{kip1} の発現亢進が起こるか、2)トログリタゾンはプロテアソーム活性を抑制するか否かを検討した。プロテアソームの特異的な阻害剤であるラクタシスチンによって、MKN-74 細胞の細胞増殖は抑制され、p27^{kip1} 蛋白の発現亢進も認められた。また、トログリタゾンは用量依存性にプロテアソームを阻害した。これらの結果から、トログリタゾンによる p27^{kip1} の発現亢進を介した G1 arrest の誘導は、トログリタゾンによる PPAR γ の活性化がプロテアソームを阻害することによって、p27^{kip1} の分解抑制が起こり、蓄積することで G1 arrest が誘導されることが示唆された。

結 論

本研究では胃癌細胞に PPAR γ が発現しており、この PPAR γ の活性化によりプロテアソーム活性が抑制され、p27^{kip1} の分解が抑制され、蓄積することで G1 arrest を誘導し細胞増殖を抑制することを初めて明らかにした。

引用文献

1. Sarraf P., Mueller E., Jones D., King F., DeAngelo D. J., Partridge J. B., Holden S. A., Chen L.B., Singer S., Fletcher C., Spiegelman B. M. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR γ . *Nat. Med.*, 4: 1046-1052, 1998.
2. 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.
3. Motomura, W., Okumura, T., Takahashi, N., Obara, T., and Kohgo, Y. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by troglitazone inhibits cell growth through the increase of p27^{Kip1} in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.*, 60: 5558-5564, 2000.

参考論文

1. Okumura, T., Takeuchi, S., Motomura, W., Yamada, H., Egashira, S., Asahi, S., Kanatani, A., Ihara, M., Kohgo, Y. Requirement of intact disulfide bonds in orexin-A-induced stimulation of gastric acid secretion that is mediated by OX1 receptor activation. *Biochem Biophys Res Commun.*, 280: 976-981, 2001.

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	竹 内 茂
審査委員長 小川勝洋 ㊦ 審査委員 片桐 一 ㊦ 審査委員 高後 裕 ㊦			
学 位 論 文 題 目 Troglitazone induces G1 arrest by p27^{kip1} induction that is mediated by inhibition of proteasome in human gastric cancer cells (ヒト胃癌細胞において、トログリタゾンがプロテアソームの抑制を介した p27 ^{kip1} の誘導によって G1 arrest を引き起こす)			
<p>Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ は脂質代謝に関する核内受容体として発見されたが、最近様々な癌細胞に発現していることが明らかになった。本学位論文提出者は胃癌細胞に PPAR γ が発現していることに注目し、その機序について解析した。</p> <p>まず、ヒト胃癌細胞株 4 種類について PPAR γ の mRNA、蛋白の発現を検討したところ、全てにおいて発現が見られた。次に PPAR γ のリガンドである troglitazone で細胞を処理したところ全ての細胞株で増殖抑制が観察され、1 株を除いて用量依存性が認められた。さらにこの増殖抑制は G1 arrest であること及び p27^{kip1} の発現と相関することが明らかになった。p27^{kip1} の活性化のメカニズムの一つ</p>			

としてプロテアソームによる分解抑制が知られているため、ラクタシスチンによりプロテアソームを抑制したところ、用量依存的に増殖抑制が起るとともに p27^{kip1} の発現が亢進した。さらに troglitazone は胃癌細胞株の一つにおいてプロテアソームを用量依存的に不活性化した。以上の結果より、troglitazone は PPAR γ を介してプロテアソーム活性を抑制することにより p27^{kip1} の分解を抑制し、細胞周期を G1 期で停止させる働きがあることが示唆された。

本研究は癌細胞に特異的に発現する PPAR γ を利用してそのリガンドにより癌細胞の増殖抑制を誘導しようとするものであり、ユニークな研究である。また、そのメカニズムとして p27^{kip1} の活性化が関与し、さらにそのメカニズムにプロテアソームの抑制が関与することを明らかにした点は興味深い。

当該学位論文提出者は試問審査においても関連領域について十分な理解を有していることが明らかになり、よって本審査委員会は本論分が学位論文に値するものと判定した。