

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	中西 京子
学位論文題目			
肺癌細胞の増殖能に対する炎症性サイトカインの影響			
共著者名			
大崎能伸、丹野幸恵、佐々木高明、澁川紀代子、長内 忍、川辺淳一、菊池健次郎			
未公表			
研究目的			
<p>Tumor necrosis factor-α (TNF-α)や Interleukin-1β (IL-1β)等の炎症性サイトカインが発癌、癌細胞の増殖や遠隔転移に重要な役割を果たすことが示唆されている。一方、炎症性サイトカインが癌細胞の増殖能を抑制することも報告されている。このように、炎症性サイトカインと発癌性や癌の転移、癌増殖能との間には密接な関連性が存在することはほぼ確実と考えられるが、発癌や癌の進展に促進的に作用するのか抑制的であるか、また、その作用機序も詳細はなお不明のまま残されている。</p> <p>一方、炎症性サイトカインは標的組織に作用して炎症性プロスタノイド(prostanoid, PG)を産生し、様々な炎症反応を起こすことが知られている。PG系の律速酵素はシクロオキシゲナーゼ(Cyclooxygenase, COX)である。COXには恒常的に発現しているCOX-1と炎症性サイトカインで発現が誘導される誘導型のCOX-2がある。COX-2は大腸癌、胃癌、肺癌などで発現の増強が認められ、肺癌ではCOX-2高発現群で予後の悪いことが報告されている。また、COX阻害剤であるNon-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs)が大腸癌や肺癌で予後の改善に寄与するとの報告があり、発癌や癌転移、増殖能亢進にサイトカイン誘導型であるCOX-2が重要な細胞内蛋白である可能性が推察されている。しかし、COX-2の発現は癌の種類により差のあることも指摘されており、肺癌におけるCOX-2の役割はなお明らかではない。</p> <p>本研究では肺癌の進展における炎症性サイトカインの役割を明らかにする目的で、各種の肺癌細胞株を用いて炎症性サイトカインの癌細胞増殖に及ぼす作用、さらに炎症性サイトカインによるCOX-2/PG系の誘導、発現および産生について検討した。</p>			

材料・方法

1. 培養細胞株

ヒト肺腺癌細胞株であるHSRRB-ABC-1、HSRRB-PC-3、NCI-H2030そしてヒト肺扁平上皮癌細胞株であるHSRRB-LC-1sqはヒューマンサイエンス振興財団より、ヒト肺腺癌細胞株であるNCI-H2030はAmerican Type Cell Culture Collectionより得た。各細胞は50U/mlのペニシリン・ストレプトマイシン、10%ウシ胎児血清(FBS)含有のRPMI1640培地で培養し実験に用いた。

2. COX-2蛋白発現の検出

COX-2蛋白発現の検出にはWestern blot法を用いた。1X10⁶の細胞を培養皿に5mlの培地で培養し、80%程度に増殖したところでFBS非含有培地に交換し、24時間後に実験に用いた。TNF- α とIL-1 β を添加して48時間培養した後に全細胞をホモジネートした。30 μ gの蛋白を8%SDSゲルで電気泳動して分離した後、ニトロセルロース膜に転写し、COX-2抗体およびHRP結合二次抗体を各々1時間反応後に蛋白を化学発光(ECL)により検出した。

3. PGE₂の測定

COX-2蛋白検出と同様の方法で培養、増殖させた細胞を実験に用いた。サイトカインを添加して48時間培養した後に培地のみを遠心分離し、PGE₂濃度をEnzyme immunoassay法で測定した。

4. 細胞増殖能の検討

細胞増殖能はMTS(テトラゾリウム化合物)法で測定した。細胞濃度を2X10⁵/mlに調整した細胞浮遊液100 μ lを96ウェルプレート上で培養し、24時間後にFBS非含有培地に交換し実験に用いた。サイトカインを添加して一定時間培養した後にMTS溶液を20 μ l加え、細胞の種類により1-4時間培養し492nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。コントロール(刺激前)の吸光度に対する対照の吸光度の百分率で細胞増殖能を評価した。

5. プロトコール

(1) サイトカインの細胞増殖能に対する効果:細胞増殖能はTNF- α とIL-1 β をそれぞれ0, 0.1, 1, 5, 10 ng/mlの濃度になるように添加し, 0, 6, 12, 24, 48時間後に測定した。

(2) サイトカインによるCOX-2発現とPGE₂産生に対する効果: TNF- α とIL-1 β をそれぞれ0, 0.1, 1, 5, 10ng/mlの濃度になるように添加し, 48時間後に実験に用いた。

6. 統計学的解析

群間の平均値の差は一元分散分析で有意差があった場合にFisher's PLSD testを用いて検定した。これらの分析にはStatView Ver. 4.0を用い、データは平均±標準誤差で表し、危険率5%未満を有意と判定した。

結 果

1. サイトカインの細胞増殖能に対する効果

ABC-1ではサイトカイン濃度が0.1ng/ml以上で細胞増殖能が有意に抑制された。一方、PC-3ではサイトカイン濃度が0.1–5.0 ng/mlの間で細胞増殖能が有意に増加したが、H2030ではサイトカインによる細胞増殖能の変化は認められなかった。次に、扁平上皮癌株であるLC-1sqではサイトカイン濃度が1 ng/ml以上で細胞増殖能が有意に抑制されたが、その変化量は軽微であった。

2. サイトカインによるCOX-2発現とPGE₂産生に対する効果

腺癌細胞株のABC-1、PC-3、H2030では無刺激時でもCOX-2蛋白を認め、さらにはサイトカイン刺激により用量依存性に発現が増加した。ABC-1、PC-3では0.1ng/mlより、H2030では5.0 ng/mlよりCOX-2蛋白の増加が検出された。扁平上皮癌株のLC-1sqでは無刺激時でCOX-2蛋白の発現を認めず、またいずれの濃度のサイトカインにおいてもCOX-2蛋白発現の増加は検出されなかった。

次に、PGE₂産生へのサイトカインの効果を見ると、腺癌細胞株のABC-1、PC-3、H2030ではPGE₂産生はサイトカインにより用量依存性に増加したが、扁平上皮癌株のLC-1sqではサイトカインのいずれの容量においてもPGE₂産生の有意な変化は認められなかった。

考 察

本研究の結果、3種類の肺腺癌細胞株の中でもPC-3でのみ、サイトカインにより細胞増殖能の亢進が認められ、ABC-1では逆にサイトカインにより細胞増殖能が抑制されることが示された。一方、肺腺癌細胞のH2030と肺扁平上皮癌細胞株のLC-1sqではサイトカインによる細胞増殖能への影響を認めなかった。これらの結果から、炎症性サイトカインに対する細胞増殖反応が肺癌細胞株間で異なること、特に同じ腺癌細胞でも細胞株によっても差異もあることが明らかとなった。これまでの報告では、TNF- α やIL-1 β が発癌や細胞増殖能及び転移に関連するとされる一方で、抑制的に働くとの報告も見られる。しかし、同一実験系で異なる肺癌細胞株でこのような差異を確認したのは検索し得た範囲では本研究が初めてと考えられる。

臨床研究上、肺腺癌においてCOX-2高発現が予後不良因子であるとの報告がなされており、肺癌細胞の増殖能や転移に関連する可能性が窺われる。本研究では、炎症性サイトカインにより細胞増殖能が変化した細胞株ABC-1、PC-3においてTNF- α やIL-1 β 刺激でCOX-2蛋白発現とPGE₂産生の増加が認められており、ABC-1とPC-3の2株における細胞増殖能とCOX-2の関連性が強く示唆された。しかし、COX-2蛋白発現とPGE₂産生が増加した両細胞株の細胞増殖能はABC-1では抑制、PC-3では亢進と相反する反応を示すことが明らかとなった。今後は、

COX-2特異的阻害剤によるTNF- α やIL-1 β 刺激での細胞増殖能の変化への影響を検討し、細胞増殖能の変化がCOX-2発現とその情報伝達系の下流に位置するPG産生系との関係を確認する必要があると考えられる。

PGE₂は細胞膜に存在するEP受容体を刺激し、その効果を発現する。EP受容体にはEP1からEP4までのサブタイプが知られており、それぞれの刺激による反応が異なることが示されている。本研究での炎症性サイトカインによる肺癌細胞の増殖能の反応がCOX-2/PG系を介するものと仮定すると、相反する反応は細胞株間によるEP受容体の発現の差に起因する可能性も考えられる。

結 語

サイトカイン刺激により肺腺癌細胞株のABC-1では細胞増殖能が抑制、PC-3では細胞増殖能が亢進し、肺腺癌細胞間でも相反する反応を示すことが明らかになった。サイトカインにより細胞増殖能に変化をきたした2種類の細胞株では、サイトカイン刺激によりCOX-2 蛋白とPGE₂産生が増加していた。以上より、サイトカインによる肺腺癌細胞の増殖能の変化はCOX-2/PGE₂系を介する作用である可能性が示唆された。

引用文献

1. Balkwill, F. Mantovani, A.: Inflammation and cancer: back to Virchow?. THE LANCET 2001; 357: 539-545
2. Khuri, F R. Wu, H Lee et al.: Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer. Clinical Cancer Research 2001; 7: 861-867
3. Langman, M J. Cheng, K K. et al.: Effect of anti-inflammatory drug on overall risk of common cancer: case-control study in general practice research database. BMJ 2000; 320: 1642-1646

参考文献

1. 中西京子、大崎能伸ほか: 自然退縮した肺小細胞癌の1例。肺癌 2002;42:55-59
2. 中西京子、大崎能伸ほか: 中枢型早期肺癌の光線力学的治療。日本レーザー医学雑誌 2002;24:239-297
3. 中西京子、大崎能伸: 高齢者小細胞肺癌と非小細胞肺癌の治療。呼吸 2003;6:74-79
4. Tanno, S. Ohsaki, Y. Nakanishi, K. et al. Small cell lung cancer expression EGFR and tyrosine phosphorylation of EGFR is inhibited by gefitinib ('Iressa', ZD1839) Oncology Reports 2004; 12: 1053-1057
5. Tanno, S. Ohsaki, Y. Nakanishi, K. et al. Human small cell lung cancer cells express function VEGF receptor, VEGF-2 and VEGF-3. Lung Cancer 2004; 46: 11-19

結 論

非小細胞肺癌細胞では、COX-2蛋白の発現や活性に差がみられた。COX-2の活性はIL-1 β とTNF- α の刺激によりCOX-2蛋白が陽性であった細胞でのみ増強された。COX-2蛋白が陰性の細胞ではアスピリンの効果はみられなかった。以上の検討により、COX-2の活性がアスピリン感受性の指標になる可能性が示された。

引用文献

1. Balkwill, F. Mantovani, A.: Inflammation and cancer: back to Virchow?. THE LANCET 2001; 357: 539-545.
2. Khuri, F R. Wu, H. Lee, J J. *et al.* Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer. Clinical Cancer Research 2001; 7: 861-867
3. Langman, M J. Cheng, K K. *et al.* Effect of anti-inflammatory drugs on overall risk of common cancer: case-control study in general practice research database. BMJ 2000; 320: 1642-1646

参考文献

1. 中西京子、大崎能伸ほか: 自然退縮した肺小細胞癌の1例. 肺癌 2002; 42: 55-59
2. 中西京子、大崎能伸ほか: 中枢型早期肺癌の光線力学的治療. 日本レーザー医学雑誌 2002; 24: 293-297
3. 中西京子、大崎能伸: 高齢者小細胞肺癌と非小細胞肺癌の治療. 呼吸 2003; 6: 74-679
4. Tanno, S. Ohosaki, Y. Nakanishi, K. *et al.* Small cell lung cancers expression EGF R and tyrosine phosphorylation of EGFR is inhibited by gefinitib ('Iressa', ZD1839) Oncology Reports 2004; 12: 1053-1057
5. Tanno, S. Ohosaki, Y. Nakanishi, K. *et al.* Human small cell lung cancer cellsexpress functional VEGF receptor, VEGFR-2 and VEGFR-3. Lung Cancer 2004; 46: 11-19

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	中西 京子
審査委員長 <u>牛 首 文 隆</u> ㊞			
審査委員 <u>小 川 勝 洋</u> ㊞			
審査委員 <u>菊 池 健次郎</u> ㊞			
学 位 論 文 題 目			
肺癌細胞の増殖能に対する炎症性サイトカインの影響			
<p>炎症性サイトカインが肺癌の増殖・転移において重要な役割を果たすことが示唆されている。一方、炎症性サイトカインの作用として、プロスタノイド産生の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) -2 の発現誘導が知られている。実際、COX-2 発現と肺癌の予後との関連や COX 阻害薬の肺癌抑制作用が報告されており、COX-2 と肺癌との関連が推察される。しかし、炎症性サイトカインの肺癌増殖に対する効果において、その作用機序の詳細には不明な点が多く残されている。</p> <p>本研究は、肺癌の増殖における炎症性サイトカイン役割を明らかにするため、数種の肺癌細胞株を用い、炎症性サイトカインの肺癌細胞増殖に及ぼす効果とその COX-2/プロスタグランジン (PG) 系との関連について解析を進めた。</p>			

炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF- α) とインターロイキン (IL) -1 β は、4種類の肺癌細胞の増殖に対し、異なった効果を示した。すなわち、PC-3 細胞では増殖促進、ABC-1 では増殖抑制を認め、H2030 と LC-1sq での効果は軽微であった。この時、増殖促進あるいは抑制を認めた PC-3 と ABC-1 では、低濃度のサイトカインにより著明な COX-2 の発現誘導が観察された。一方、H2030 では高濃度のサイトカインにより軽微な COX-2 の発現誘導を認め、LC-1sq では COX-2 の発現誘導を認めなかった。また、炎症性サイトカインは、PC-3 と ABC-1 の PGE2 産生を濃度依存的に著明に亢進させたが、H2030 と LC-1sq での PGE2 産生は軽度であった。

これらの結果、炎症性サイトカインは、ある種の肺癌細胞において COX-2 の発現誘導を惹起して PGE2 産生を亢進させることにより、その細胞増殖に影響を与えることが示唆された。また、COX-2 の発現誘導と PGE2 産生の亢進が認められた PC-3 と ABC-1 において、細胞増殖に対する炎症性サイトカインの効果が相反することの原因として、これらの細胞が発現する PGE2 受容体が異なっていることが示唆された。本研究は、肺癌における炎症性サイトカインの役割を考える上で重要な課題を提示するものであり、当該分野の発展に貢献するものと考えられる。

なお、論文提出者に対し各審査委員より、本論文とその関連領域に関して試問が行われ、適切な回答が得られた。

以上より、本論文は博士の学位論文として適切であると判定した。