

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 Studies on human gastric carcinoma and leukemia cell death by apoptosis inducing nucleosides from CD57⁺ HLA-DR^{bright} natural suppressor cell line

和訳 CD57⁺ HLA-DR^{bright} ナチュラル・サプレッサー細胞に由来する胃癌及び白血病細胞死誘導物質の研究

指導教官 森 庸厚 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

病因病理学専攻

氏名 李 翔

ナチュラル・サプレッサー (NS) 細胞は骨髄に由来し、主にリンパ系の反応を制御していると考えられてきた。このNS細胞は大顆粒球性リンパ球 (LGL) に属し、その特徴はナチュラルキラー (NK) 細胞と類似している。NS細胞はマウスにおいてはWGAレクチンに対するレセプターを持ち、ヒトではCD57の糖鎖マーカートを有し、明らかに免疫T、B細胞、マクロファージとは異なった細胞群である。機能としてはMHC-非拘束性にマイトジェンによるリンパ球の分裂反応や混合リンパ球反応 (MLR) を抑制する。つまりリンパ球分裂反応の強力な抑制機能を持っている。最近では、NS細胞はがん細胞の分裂を抑制する機能を持っていると報告されている。しかし、NS細胞のこのような免疫抑制作用、がん細胞増殖抑制作用を司るエフェクター物質については現在のところまったく不明である。一方、最近の生殖免疫学的研究によって、母性胎盤組織である脱落膜層におけるLGL細胞の局所免疫作用が解明され、この脱落膜層LGL細胞が母系の胎児に対する免疫反応を制御すると同時に胚性胎盤組織である栄養膜細胞の子宮内膜壁への増殖浸潤も制御していることが判明してきた。本研究室ではヒトの脱落膜組織に由来したCD57陽性HLA-DR強陽性のNS細胞株 (57.DR-NS) をクローニングし、この細胞が産生するアポトーシス誘導物質 (AINs) を分離、精製した。このAINsは構造解析の結果、新規な構造

を含む一連の修飾ヌクレオシドであった。本研究では、このAINsによるヒト胃癌細胞 (GCIY) と T 白血病細胞 (Molt4) へのアポトーシス誘導能と抗がん効果を *in vitro* と *in vivo* で検討し、このアポトーシス誘導の分子作用機序の解明を行った。

I. 57.DR-NS 細胞株の産生するアポトーシス誘導物質によるヒト胃癌細胞 (GCIY) と T 白血病細胞 (Molt4) の細胞死と坦癌マウスでの治療効果の検討

1. 57.DR-NS 細胞とGCIY/Molt4 あるいはヒト胎児肺組織由来正二倍体細胞WI-38との共培養を行うと、57.DR-NS 細胞は GCIY/Molt4 悪性細胞に対してはアポトーシスを誘導したが WI-38 正常細胞に対してはアポトーシスは誘導しなかった。

2. 57.DR-NS 細胞の培養上清からC18 preparative column, TLC, 最終的には C18 逆相 HPLC によって分離した六種類の一連の修飾ヌクレオシドの活性物質 (AINs) を得た。この分離したAINsをGCIY/Molt4/WI-38 細胞に作用させた効果は、アポトーシス誘導能をDNA 断片化 及び TUNEL法で、細胞増殖抑制能を³H-チミジンの取り込みで検討した。その結果、GCIY/Molt4 悪性細胞に対してはアポトーシスを誘導したが、WI-38正常細胞に対してはアポトーシスは誘導しなかった。

3. AINs によるGCIY/Molt4 坦癌 SCID マウスにおける治療効果を、腫瘍径の縮小と腫瘍組織におけるアポトーシスの誘導を測定して検討した。坦癌SCID マウスにAINsを投与するとアポトーシスによる細胞死を誘導し、腫瘍の増殖を著しく抑制した。

II. 57.DR-NS 細胞株の産生するアポトーシス誘導物質によるGCIY/Molt4 細胞の細胞死誘導の分子作用機序の解明

1. AINs によって GCIY や Molt4 細胞に誘導したアポトーシスでは、DNA strand break assay で調べたところ、核 DNA が Break downして傷害された。

2. このDNA Break downのシグナルはおそらくP53の活性化につながり、最終的にはカスパーゼ-3の活性化をひきおこし、カスパーゼ-3 (CPP32) によるエンドヌクレアーゼのインヒビターの分解によってエンドヌクレアーゼの活性化をもたらすと推測された。そして、核 DNA が切断され、核DNA及び細胞が断片化することによりアポトーシスに至ると考えられた。実際、AINsによってGCIYとMolt4細胞に誘導したアポトーシスの過程でカスパーゼ-3の活性化を調べたところ、Flow cytometryによって、活性化したカスパーゼ-3によってその基質 (Ac-DEVD-AMC) の切断により生じる蛍光色素 (AMC) の分離が認められ、さらに Western blot 法で、活性型のカスパーゼ-3 の20 KDa, 11 KDaの band の生成を確認した。

3. AINs によるGCIYとMolt4細胞のアポトーシス誘導は カスパーゼ-3 阻害剤 (Ac-

DEVD-CHO) を反応系に添加し、Flow cytometry, DNA 断片化 及び TUNEL法で検討したところ、いずれも著しく阻害された。

以上、本論文では、ヒト・ナチュラル・キラー細胞株 (57.DR-NS) の産生する六種類のアポトーシス誘導活性物質 (AINs) を分離、精製した。これを GCIY 胃癌細胞とMolt4 白血病細胞に作用させ、アポトーシスによる細胞死を誘導することを示した。また、AINs による GCIY/Molt4 がん SCID マウスに対する腫瘍の増殖抑制効果について述べた。さらに、AINs の悪性腫瘍細胞に対する初期作用段階の分子機序を解明した。