

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Cellular Mechanisms of Growth Inhibition of Human Epithelial Ovarian Cancer Cell Line by Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Antagonist

和訳 ヒト上皮性卵巣癌細胞株に対する GnRH アンタゴニストの細胞増殖抑制効果の作用メカニズム

指導教官 武谷 雄二教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 湯 暁暉

【緒言】

近年、婦人科腫瘍に対する内分泌療法の一つとして、gonadotropin-releasing hormone (GnRH) アナログが、乳癌、上皮性卵巣癌、子宮内膜癌などに対して抗腫瘍効果をもつことが明らかになってきた。ペプチドアナログは従来の抗癌剤に比べて副作用が少なく、quality of life の面からも今後ますます重要な位置を占めることになると期待される。

1 GnRH アナログの抗腫瘍効果は性ステロイドの分泌を減少させることによる間接的作用が考えられる一方、*in vitro* で GnRH アナログが癌細胞の増殖を抑制するという直接的作用も示されている。しかしながら、現在、直接的作用のメカニズムはまだ十分に明らかにされていない。GnRH アナログ の直接的抗腫

2 瘍効果の一部は、EGF により誘導されるチロシンキナーゼのリン酸化抑制により発揮されることが報告されている。また、最近、MAP キナーゼシグナル伝達経路の活性化が GnRH アゴニストの抗腫瘍効果に重要な役割を果たすことも報告された。

ヒト乳癌・上皮性卵巣癌・子宮内膜癌細胞株に対する細胞増殖抑制効果は、GnRH アンタゴニストがアゴニストに優ることが報告されている。Cetrorelix は、第三世代 GnRH アンタゴニストの中でもその有効性と安全性が最も顕著であり、本邦では子宮筋腫に対する臨床試験が現在進行中である。本研究では、GnRH アンタゴニスト Cetrorelix によるヒト上皮性卵巣癌細胞株 HTOA に対する直接的細胞増殖抑制効果を検証し、さらに、そのメカニズムについて、細胞周期およびアポトーシスの観点より検討した。

【方法と結果】

(1) GnRH レセプターおよび GnRH の mRNA の発現

ヒト上皮性卵巣癌細胞株 HTOA から RNA を抽出し、RT-PCR 法にて GnRH レセプターおよび GnRH mRNA の発現を解析した。GnRH レセプターおよび GnRH の mRNA は、ともに HTOA 細胞株に発現しており、その PCR 産物は DNA シーケンサーにより同定された。

(2) 癌細胞増殖抑制効果

Cetrorelix の HTOA 細胞に対する直接的細胞増殖抑制効果は、DNA への 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 取り込み法にて DNA 合成能を解析した。まず、96 ウエルプレートに HTOA 細胞を培養し Cetrorelix を添加後、BrdU で細胞をラベリングした。次に、細胞を固定し抗 BrdU 抗体と反応させ、ELISA 法で Cetrorelix の DNA 合成能に対する影響を検討した。Cetrorelix を添加し 48 時間培養後、HTOA 細胞の DNA 合成能は 10^{-10}M ~ 10^{-5}M の範囲で濃度依存的に減少した。Cetrorelix 10^{-5}M を添加した場合、24、48、72、96 時間後の DNA 合成能は各々対照の 57%、45%、49%、56% に減少した。すなわち、Cetrorelix はヒト上皮性卵巣癌細胞株 HTOA の DNA 合成能を明らかに抑制し、直接的な細胞増殖抑制効果を示した。

(3) G1 期停止の誘導

HTOA 細胞培養系に Cetrorelix 10^{-5}M を添加し、0、8、16、24 時間後に細胞を回収し、70%エタノールで一晩固定した。そして RNase 処理と propidium iodine

染色を施行し、フローサイトメトリーで細胞周期の分布を解析した。Cetrorelix は HTOA 細胞において G1 期停止を誘導した。すなわち、Cetrorelix 10^{-5} M 添加 24 時間後に、対照と比較し G1 期は 5.4% 増加した。またそれに伴い、S 期は 6.3% 減少した。8、16 時間後には明らかな変化は認められなかった。

(4) 細胞周期制御因子のタンパク発現量の変動

Cetrorelix 10^{-5} M 添加 24 時間後に、HTOA 細胞において G1 期停止が誘導されたので、同条件下の細胞周期制御因子のタンパク発現量の変動を Western blot 法にて検討した。サイクリンに関して、サイクリン A のタンパク発現量は対照と比較し 75% 減少したが、サイクリン D1 とサイクリン E に変化は認められなかった。サイクリン依存性キナーゼ (Cdk) に関して、Cdk2 は 22% 減少したが、Cdk4 に変化はみられなかった。サイクリン依存性キナーゼ阻害タンパクの p21 は 60% 増加し、p27 に変化はみられなかった。一方、p53 は 50% 増加した。

(5) アポトーシスの誘導

Cetrorelix が HTOA 細胞に対して、アポトーシスを誘導するか否かをフローサイトメトリーおよび TUNEL 法により検討した。フローサイトメトリーの分析によると、Cetrorelix 10^{-5} M 添加 24 時間後のアポトーシス細胞の割合は 8.9% で、対照の 3.9% に対して有意に高かった。48 時間培養の場合も、対照の 4.6% と比較して Cetrorelix 処理後は 9.1% と有意に高かった。次に、TUNEL 法により DNA 断片化を形態学的に確認した。Cetrorelix 10^{-5} M 添加 48 時間後の TUNEL 陽性細胞の割合は 5.0% で、対照の 1.8% に対して有意に高かった。すなわち、フローサイトメトリーおよび TUNEL 法により、HTOA 細胞における Cetrorelix のアポトーシス誘導作用が僅かであるが確認された。

【考察】

本研究により、ヒト上皮性卵巣癌細胞株 HTOA における GnRH レセプターおよび GnRH の mRNA の発現が明らかにされた。これは、HTOA 細胞において GnRH 様物質が局所因子としてオートクリン・パラクリンの作用し、その増殖に関与する可能性を示している。また、GnRH アンタゴニストの Cetrorelix による直接的細胞増殖抑制効果が認められた。細胞周期の分析により、Cetrorelix は G1 期停止を誘導した。すなわち、Cetrorelix の癌細胞増殖抑制作用には、G1 期停止の誘導が関与していることが示唆された。

細胞周期を制御する基本因子は、サイクリン依存性キナーゼ (Cdk) とサイクリンの二つである。サイクリンは Cdk と結合し Cdk が適切な標的タンパクをリン酸化する能力を調節する。サイクリンと Cdk の周期的な複合体形成とその活性化および分解は、細胞周期の要をなしている。G1 期から S 期への移行を制御する因子には、Cdk2 とサイクリン E、A または Cdk4、6 とサイクリン D がある。サイクリン-Cdk 複合体の活性は Cdk インヒビターである p21、p27 の調節も受けている。p53 は p21 の発現を誘導することによって、細胞増殖を G1 期で停止させることができるが、p53 非依存性に p21 の発現が誘導されることもある。本研究において、G1 期進行の制御にかかわる主要な因子のタンパク発現量の変動を検討した結果、サイクリン A、Cdk2 のタンパク発現量の減少および p21、p53 のタンパク発現量の増加が認められ、これらが G1 期停止の誘導に関与していることが示唆された。

GnRH アナログの癌細胞におけるアポトーシス誘導効果について、現在、定見はまだ得られていない。例えば、最近、GnRH アゴニストが NFκB 活性を高め、制癌剤により誘導されたアポトーシスを抑制することも報告されている。本研究では、フローサイトメトリーと TUNEL 法にて GnRH アンタゴニスト Cetrorelix の HTOA 細胞におけるアポトーシス誘導効果を確認することができた。

【結論】

ヒト上皮性卵巣癌細胞株 HTOA は GnRH レセプターおよび GnRH の mRNA を発現しており、GnRH アンタゴニスト Cetrorelix による直接的細胞増殖抑制効果が認められた。この増殖抑制作用は、細胞周期の G1 期停止およびアポトーシスの誘導によるものと考えられた。また、G1 期停止の誘導は、細胞周期制御因子のサイクリン A、Cdk2 の減少および p21、p53 の増加が関与していることが示唆された。