

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト GH 産生下垂体腺腫細胞に対する
ソマトスタチンの作用

指導教官 藤田 敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 林 菜子

要旨

1. はじめに

先端巨大症患者をソマトスタチンアナログである octreotide で治療すると、約 50%の患者で成長ホルモン (GH) 分泌の抑制がみられ、約 60%の患者で下垂体腺腫の縮小が認められる。

これまで腫瘍縮小のメカニズムについて明らかにされていなかったが、林周兵らはヒト GH 産生下垂体腺腫細胞を初代培養し octreotide による細胞レベルでの縮小を電子顕微鏡で確認し、さらにその作用機構について octreotide による細胞容積の縮小には G 蛋白質、PP2A を介して p70 S6 kinase 活性を抑制することで細胞容積縮小に考えられることを報告した。

一方、ソマトスタチンは細胞増殖を抑制することが知られている。ヒト GH 産生下垂体腺腫において、腫瘍組織の MIB-1 index を術前の octreotide 投与の有無で比較したところ、術前投与群で MIB-1 index が低値であったと報告されている。また、ラットプロラクチン (PRL) および GH 産生下垂体腺腫由来の cell line である GH3 において、octreotide 投与により細胞周期 G0 期から G1 期への進行が抑制されたと報告されている。

ヒト GH 産生下垂体腺腫細胞における細胞縮小および細胞増殖抑制の機構を調べることが、octreotide による腫瘍縮小の機序を知るために重要であると考えられた。そこで、細胞容積縮小の刺激伝達経路について、p70 S6 kinase の上流に存在する mTOR への octreotide の作用を調べ、さらに細胞増殖抑制の機構についても検討を行った。

2. 細胞容積縮小の機構

Octreotide 負荷試験により GH 分泌低下を認めた先端巨大症患者の下垂体腺腫細胞を初代培養し実験を行った。手術によって得られた下垂体腺腫細胞は、本学倫理委員会の承認のもと、患者からの文書による同意を得て使用した。

mTOR の inhibitor である rapamycin を 7 日間投与し、透過型電子顕微鏡で観察を行った。Rapamycin を投与した細胞は対照群と比較して核の面積は有意差を認めなかったが、細胞質の面積が 49~52% に優位に縮小した ($p < 0.001$) また、octreotide を 7 日間投与した細胞も細胞質の面積が 58~54% に縮小した ($p < 0.001$)。そして rapamycin と octreotide の両方を投与した細胞は細胞質の面積が 58~61% に縮小した ($p < 0.001$)。

Rapamycin を投与した細胞において細胞質の縮小がみられたことから、細胞容積の制御に mTOR が関与することが明らかとなった。また、octreotide を投与した細胞においても細胞質の縮小がみられたが、rapamycin と octreotide の両方を投与しても、それぞれを単独で投与した以上の細胞質の縮小を認めなかったことより octreotide は mTOR、もしくはその下流に作用し細胞容積の縮小に働いていると考えた。

次に octreotide の作用点を確認するため phospho-p70 S6 kinase 抗体および phospho-mTOR 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、octreotide による p70 S6 kinase 活性と mTOR 活性の変化を検討した。Phospho-p70 S6 kinase 抗体によるウエスタンブロッティングでは octreotide 投与群では対照群に比較して p70 S6 kinase 活性が抑制された。百日咳毒素や okadaic acide で処理を行った群では octreotide による p70 S6 kinase 活性の抑制が消失した。一方、phospho-mTOR 抗体によるウエスタンブロッティングでは octreotide 投与群は対照群と比較し mTOR 活性の抑制を認めなかった。

これらの結果より、mTOR は octreotide の作用点ではなく、octreotide は百日咳毒素感受性 G 蛋白質と PP 2 A を介して p70 S6 kinase 活性を抑制し細胞縮小に働くことが明らかとなった。

3. 細胞増殖抑制の機構

細胞縮小の実験と同様に、octreotide 負荷試験により GH 分泌低下を認めた先端巨大症患者の下垂体腺腫細胞を初代培養し、臨床用量の octreotide 1ng/ml を 7 日間投与した。8 日後に固定した細胞を抗 Ki67 抗体 (クローン MIB-1) を用いて染色したところ、octreotide 投

与群ではコントロール群と比較し優位に MIB-1 index の減少を認めた ($p < 0.005$)。この結果より octreotide は MIB-1 index を減少させることを確認した。

抗 Ki67 抗体による染色は細胞周期の G1 期、S 期、G2 期、M 期にある細胞で陽性となり、休止期である G0 期で消失する。Octreotide 投与により MIB-1 index が減少したことから、octreotide が G0 期から G1 期への進入を抑制している可能性を考えた。そこで G0 期から G1 への脱出に重要なサイクリン C の発現量をウエスタンブロッティングにて検討した。その結果、octreotide 群のサイクリン C 発現量は対照群と比較して減少しており、octreotide によりサイクリン C の発現が抑制されると考えた。

Octreotide 投与による MIB-1 index およびサイクリン C の変化の検討により octreotide はサイクリン C の発現を抑制し、細胞の G0 期から G1 期への移行を抑制することで細胞増殖抑制に作用していると考えた。この octreotide からサイクリン C に至る経路として、細胞増殖に重要な古典的 mitogen-activated protein kinase (MAPK) の関与を考え検討を行った。Phospho-p44/42MAPK 抗体を用いたウエスタンブロッティングをおこなったところ octreotide 群での p44/42MAPK 活性は対照群と同等であった。このことから p44/42MAPK は octreotide による細胞増殖抑制効果に関与していないと考えられた。

4. 結語

本研究では octreotide による細胞容積縮小の機構について mTOR は octreotide の作用点であるか検討を行った。その結果、mTOR は octreotide の作用点ではなく p70 S6 kinase が octreotide の作用点であることが確認した。

さらに octreotide による細胞増殖抑制効果について、臨床用量の octreotide 1ng/ml により MIB-1 index が減少することを観察した。その作用機構の検討により octreotide はサイクリン C の発現を抑制することで G0 期から G1 期への移行を抑制し細胞増殖抑制に働くこと、およびそのシグナル伝達経路には古典的 MAPK カスケードは関与しないことを確認した。

以上の結果よりヒト GH 産生下垂体腺腫の腫瘍縮小機構に、個々の細胞容積の縮小と細胞増殖抑制の2つの機構が働いていることを示唆する結果が得られた。今後、症例数を増やすとともに細胞増殖抑制のシグナル伝達経路の解明を目標に検討を行いたい。