

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Cellular Mechanisms of Growth Inhibition of Human Endometrial Cancer Cell Line by An Antagonist of Growth Hormone-Releasing Hormone

和訳 ヒト子宮内膜癌細胞株に対する GHRH 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 矢野 哲 準教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 趙 琳

[緒言]

子宮体癌は婦人科悪性腫瘍のなかで最も発生頻度が高いものの一つである。米国の 2007 年の統計では、毎年 4 万人が発症し 7 千人が死亡すると推測している。日本でも子宮頸癌に比べて子宮体癌の患者数は増加傾向にある。進行性・転移性の子宮体癌に対して現在施行されている手術、化学治療、放射線治療及びホルモン治療の効果はまだ不十分であり、さらなる新規治療法が期待されている。

最近、婦人科腫瘍に対する内分泌療法の一つとして、**growth hormone-releasing hormone (GHRH)** アンタゴニストが、乳癌、前立腺癌、膵臓癌、肺小細胞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、QOL 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ている。GHRH アンタゴニストの抗腫瘍作用は *in vivo* で下垂体からの GH 分泌と肝臓からの IGF-I 分泌を抑制することによる間接作用が考えられる一方、*in vitro* で癌細胞の増殖を抑制するという直接作用も

示されている。しかしながら、現在、直接作用のメカニズムはまだ十分に明らかにされていない。GHRH アンタゴニストの直接的抗腫瘍効果の一部として、腫瘍で産生される GHRH と腫瘍上の GHRH レセプターのための刺激ループをブロックすること、腫瘍からの IGF-I / IGF-II の分泌産生を抑制することなどが報告されている。また、cAMP、PKC、MAPK、c-fos、c-jun などの細胞内情報伝達系が GHRH アンタゴニストの抗腫瘍作用に関与することも報告されている。

新規 GHRH アンタゴニスト MZ-5-156 [PhAc-Tyr1, D-Arg2, Phe(4-Cl)6, Abu15, Nle27]hGHRH-(1-28)A_{gm} (註 PhAc: phenylacetyl, Phe(4-Cl): 4-chlorophenylalanine, Abu: α-aminobutyric acid, Nle: norleucine, A_{gm}: agmatine) は共同研究者である米国マイアミ大学の Andrew V. Schally 教授(1977 年度ノーベル医学生理学賞受賞)の研究室で合成された。本研究では、GHRH アンタゴニスト MZ-5-156 によるヒト子宮内膜癌細胞株 HEC-1A に対する直接的増殖抑制効果を検証し、さらに、その作用メカニズムについてアポトーシスの観点より検討した。

[方法と結果]

(1) GHRH および GHRH SV1 レセプターの mRNA の発現

腫瘍 GHRH レセプターは下垂体 GHRH レセプターの splice variant (SV)であり、中でも SV1 は下垂体 GHRH レセプターに最も構造的に類似し主要な働きをすると報告されている。子宮内膜癌細胞株 HEC-1A から RNA を抽出し、RT-PCR 法にて GHRH 及び GHRH SV1 レセプターの mRNA の発現を解析した。GHRH 及び GHRH SV1 レセプターは、HEC-1A 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

MZ-5-156 の HEC-1A 細胞に対する直接的増殖抑制効果は、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] (MTS) assay により解析した。96 ウェルプレートに HEC-1A 細胞を培養し MZ-5-156 を添加し 48 時間後、細胞生存率は MZ-5-156 10^{-7} ~ 10^{-5} M の範囲で濃度依存的に減少した。 10^{-6} M では対照の 75.3%、 10^{-5} M では対照の 52.1%

に減少した。細胞増殖抑制効果は 72 時間まで持続した。すなわち、MZ-5-156 はヒト子宮内膜癌細胞株 HEC-1A に対して直接的な細胞増殖抑制効果を示した。

(3) アポトーシス誘導効果

MZ-5-156 が HEC-1A 細胞に対してアポトーシスを誘導するか否かを Hoechst 33342 染色法およびフロサイトメトリーにより検討した。Hoechst 33342 染色法では、MZ-5-156 10^{-6} M を添加し 48 時間後のアポトーシス陽性率は $19.4 \pm 0.8\%$ で、対照の $5.6 \pm 0.5\%$ に対して有意に高かった。次に、HEC-1A 細胞培養系に MZ-5-156 10^{-6} M を添加し 24, 48, 72 時間後に細胞を回収し 70%エタノールで一晩固定した。RNase 処理と propidium iodine 染色の後、フロサイトメトリーを施行した。MZ-5-156 処理 48、72 時間後にアポトーシス細胞の割合は $15.7 \pm 0.7\%$ 、 $19.1 \pm 0.7\%$ で、対照の $5.2 \pm 0.7\%$ 、 $6.2 \pm 0.7\%$ に対して有意に高かった。すなわち、Hoechst 33342 染色法およびフロサイトメトリーにより MZ-5-156 は HEC-1A 細胞に対してアポトーシスを誘導した。

(4) アポトーシス関連タンパク質の発現量の変動

HEC-1A 細胞培養系において、Fas、phospho-p53 (Ser46)、p53AIP1、Bcl-2、Caspase-3, -8, -9 などのアポトーシス関連タンパク質の発現量を Western blot 法にて検討した。MZ-5-156 10^{-6} M を添加し 48 時間後、phospho-p53 (Ser46)、p53AIP1、Fas 発現量は対照の $155.4 \pm 5.2\%$ 、 $133.2 \pm 10.6\%$ 、 $135.3 \pm 9.5\%$ に有意に増加し、Bcl-2 発現量は対照の $40.0 \pm 6.1\%$ に有意に減少した。活性型 Caspase -3, -8, -9 の発現量は各々対照の $143.8 \pm 13.9\%$ 、 $164.7 \pm 10.5\%$ 、 $182.0 \pm 23.5\%$ に有意に増加した。

[考察]

本研究により、ヒト子宮内膜癌細胞株 HEC-1A における GHRH および GHRH SV1 レセプターの mRNA の発現が明らかにされた。これは、HEC-1A 細胞において産生される GHRH が局所因子としてオートクリン・パラクリン的に作用し、その増殖に関与する可能性を示している。また、GHRH アンタゴニストの MZ-5-156 による直接的細胞増殖抑制効果が認められた。さらに、

Hoechst 33342 染色法およびフローサイトメトリーにて MZ-5-156 のアポトーシス誘導効果が確認された。すなわち、MZ-5-156 の癌細胞増殖抑制作用はアポトーシス誘導を介していることが示唆された。

癌抑制遺伝子である p53 は転写活性化因子として働き、その標的遺伝子の発現誘導を介して細胞周期、アポトーシス及び DNA 修復を制御することが知られている。p53 によるアポトーシス誘導機構には、death receptor を介する外経路とミトコンドリアを介する内経路が重要な役割を担うことが報告されている。外経路では Fas や TNF レセプターなどの death receptor を介してタンパク複合体 (death inducing signaling complex, DISC) が形成され Caspase-8 が活性化されて、さらに下流の Caspase-3 が活性化されアポトーシスを誘導する。一方、内経路では Bcl-2 ファミリー分子の欠損および新規同定された p53AIP1 (p53-regulated Apoptosis-Inducing Protein 1) の過剰発現によりミトコンドリアの膜電位低下と膜透過性亢進が生じ、ミトコンドリアから流出したシトクロム *c* が Apaf-1 と結合して Caspase-9 を活性化し、続いて Caspase-3 が活性化されアポトーシスを誘導する。本研究において、アポトーシス関連タンパク発現量の変動を検討した結果、phospho-p53 (Ser46)、p53AIP1、Fas、Caspase-8、-9、-3 のタンパク発現量の増加および Bcl-2 のタンパク発現量の減少が認められた。すなわち、GHRH アンタゴニスト MZ-5-156 によるアポトーシス誘導効果において p53 依存性の外・内経路がともに機能していることが示唆された。以上より、GHRH アンタゴニスト MZ-5-156 は子宮内膜癌をはじめとする婦人科悪性腫瘍に対する新規ホルモン療法としての臨床応用が期待される。