

Suppression of invasion and peritoneal carcinomatosis of ovarian cancer cell line by overexpression of bikunin

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 美香 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1250

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 397号	学位授与年月日	平成15年 3月26日
氏名	鈴木美香		
論文題目	Suppression of invasion and peritoneal carcinomatosis of ovarian cancer cell line by overexpression of bikunin (卵巣癌細胞株へのビクニン遺伝子導入による浸潤および癌性腹膜炎の抑制)		

博士(医学) 鈴木美香

論文題目

Suppression of invasion and peritoneal carcinomatosis of ovarian cancer cell line by overexpression of bikunin
(卵巣癌細胞株へのビクニン遺伝子導入による浸潤および癌性腹膜炎の抑制)

論文の内容の要旨

[はじめに]

ビクニンはヒト羊水、尿、血清中に存在する Kunitz 型蛋白分解酵素阻害物質で、細胞表面において、プラスミン活性を抑制することにより、癌細胞の浸潤・転移を抑制する作用が認められる。我々は、これまでにビクニンが単なる蛋白分解酵素阻害物質として作用するだけでなく、CD44 の二量体形成を阻止することにより MAP (Mitogen-activated protein) キナーゼのリン酸化を抑制し、その結果、癌細胞からのウロキナーゼの発現を mRNA レベルで抑制することで、癌細胞の浸潤・転移を抑制することを報告した。そこで今回、癌細胞の浸潤・転移の過程におけるビクニンの作用機序を解明するため、卵巣癌細胞株 HRA にビクニン遺伝子を導入し、癌細胞の性格にどのような変化が生じるかを検討した。

[材料ならびに方法]

1. ビクニントランスフェクタントの作成：ビクニン発現プラスミドベクターを作成し、卵巣癌細胞株 HRA にリン酸カルシウム共沈法にてビクニン遺伝子を導入し、ビクニン発現株 (Bik) を作成した。対照群としてルシフェラーゼ発現ベクターを導入した細胞 (Luc) および遺伝子を導入していない野生株 (Parental) を用いた。
2. ビクニンの発現解析：RT-PCR 法にてビクニン遺伝子の発現、ウエスタンブロット法にて培養上清中へのビクニン蛋白の発現、蛍光抗体法による細胞染色にてビクニンの発現を確認した。また Bik により産生されたビクニンのプラスミン抑制作用も確認した。
3. ウロキナーゼの発現解析：RT-PCR 法にてウロキナーゼ遺伝子の発現、ウエスタンブロット法にて培養上清中へのウロキナーゼ蛋白の発現、フローサイトメトリーおよび蛍光抗体法による細胞染色にてウロキナーゼの発現を確認した。また、ウロキナーゼの培養上清中の濃度を ELISA にて測定した。
4. 浸潤能・接着能・運動能・増殖能の解析：浸潤能はマトリジェルコートチャンバーを用いて、12時間後の浸潤細胞数を測定した。接着能に関してはプレートへの細胞添加30分後における接着細胞を、運動能に関しては傷つけアッセイ法により6時間後の細胞移動距離を、増殖能に関しては MTS/PMS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt/phenazine methosulfate] アッセイ法を用いて細胞数の測定をプラスチックプレートおよびフィブロネクチン、コラーゲンタイプIV、ラミニンをそれぞれコートしたプレートにおいて行った。また増殖能に関しては、7週齢の雌のヌードマウスに 1×10^6 個の癌細胞を皮下移植し、経時的に腫瘍体積を測定することで、*in vivo* における増殖能についても評価を行った。
5. 癌性腹膜炎モデルの解析：7週齢の雌のヌードマウスに 5×10^6 個の癌細胞を腹腔内投与し、8日目に犠牲死させ、腹腔内の腫瘍重量、腹水量を測定した。また癌死に至るまでの生存期間についても検討した。

〔結果〕

1. ビクニン安定発現株(Bik)を5クローン樹立した。
2. RT-PCR法、細胞染色にて、Bikでは明らかにビクニンの発現が確認され、LucおよびParentalでは確認されなかった。Bikより産生されたビクニンの培養上清への分泌をウエスタンブロット法にて確認したところ分子量50-80kDaのビクニンの発現が確認された。またBikにより産生されたビクニンのプラスミン抑制作用は、尿より精製されたビクニン(分子量40kDa)と同等であった。
3. Bikにおけるウロキナーゼの遺伝子レベルでの発現は、対照群と比較し明らかに抑制されていた。また、24時間における 1×10^6 個の細胞あたりの培養上清中へのウロキナーゼの分泌量を定量すると、ParentalおよびLucでは $29.3 \pm 2.8 \text{ ng}$ および $32.7 \pm 4.1 \text{ ng}$ であったのに対し、Bikでは $10.9 \pm 1.5 \text{ ng}$ と有意に抑制されていた($p < 0.05$)。
4. Bikは対照群に比べ有意に浸潤細胞数が少なく($p < 0.05$)、明らかに浸潤能が低下していた。接着能、運動能および*in vitro*における増殖能に関しては、プレートにコートしたマトリックス成分に関わりなく、細胞間に有意差は認められなかった。
5. 癌性腹膜炎モデルにおいては、癌細胞投与後8日目における腹腔内の腫瘍重量、腹水量は、Bik投与群では有意に低下していた。また癌死に至るまでの生存期間を比較すると、50%生存日数で対照群では8日、Bik投与群では12日と有意な生存期間の延長を認めた($p < 0.05$)。

〔考察および結論〕

高浸潤性ヒト卵巣癌細胞にビクニン遺伝子を導入することにより、浸潤能を低下させ、ヌードマウスを用いた癌性腹膜炎モデルにおいては生存期間の延長をはかることができた。現在の集学的癌治療に加え、ビクニンによる転移抑制という概念を導入することにより、癌の治療成績に改善がもたらされる可能性が示された。また、卵巣癌の遺伝子治療の一つの分子標的として、ビクニンを体内で発現させ、血中濃度を保つことにより生存期間の延長がもたらされる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者は、ヒト羊水、尿、血清中に存在するKunitz型蛋白分解酵素阻害物質であるビクニンの抗腫瘍効果発現機序を解明するため、卵巣癌細胞株HRAにビクニン遺伝子を導入し、癌細胞の発現型がどのように変化するか検討した。申請者等は既に精製蛋白を用いてビクニンの抗腫瘍効果は以下の2点であることを報告している。(1)細胞表面において蛋白分解酵素活性を抑制する。(2)CD44の二量体形成を阻止しMAP(mitogen-activated protein)キナーゼのリン酸化を抑制することによりウロキナーゼの発現誘導を抑制する。今回、ビクニン遺伝子導入癌細胞を用いて、腫瘍細胞自身で産生されるビクニンの影響を検討した。

卵巣癌細胞株HRAにリン酸カルシウム共沈法にてビクニン遺伝子を導入し、ビクニン発現株(Bik)を作成した。対照群としてルシフェラーゼ発現ベクターを導入した細胞(Luc)および遺伝子を導入していない野生株(Parental)を用いた。RT-PCR法にてビクニン遺伝子の発現、ウエスタンブロット法にて培養上清中へのビクニン蛋白の発現、蛍光抗体法による細胞染色にてビクニンの発現を確認し、発現株5クローンを得た。Bikにより産生されたビクニンはヒト尿中及び羊水中から精製されたビクニンと同様の蛋白分解酵素阻害活性を有することを確認した。

これらの細胞株を用いて、ウロキナーゼの発現量、*in vitro*及び*in vivo*での浸潤能・接着能・運動能・増殖能、を解析し以下の結果を得た。

Bik におけるウロキナーゼ mRNA の発現は、対照群と比較し抑制されており、24時間培養後の 1×10^6 個の細胞あたりのウロキナーゼの分泌量は、Parental および Luc では $29.3 \pm 2.8 \text{ ng}$ および $32.7 \pm 4.1 \text{ ng}$ であったのに対し、Bik では $10.9 \pm 1.5 \text{ ng}$ と有意に抑制されていた ($p < 0.05$)。この際リン酸化 ERK1/2 量の低下を認めた。Tunicamycin 処理によるビクニンの脱糖鎖、hyaruronidase 処理あるいはビクニン受容体に対する阻害抗体を用いて細胞表面へのビクニンの結合を抑制することにより、リン酸化 ERK1/2 量とウロキナーゼ量は回復した。マトリジェルコートチャンバーで検討した細胞浸潤能は Bik は有意に低下していた。しかし種々の基質蛋白でコートしたプレートへの接着能、傷付けアッセイ法で検討した細胞運動能、7日間培養後の細胞数により検討した増殖能は細胞間に有意差はなかった。雌のヌードマウスに 5×10^6 個の癌細胞を腹腔内投与した癌性腹膜炎モデルにおいて、8日目に測定した腹腔内の腫瘍重量、腹水量は、Bik では有意に低下していた。また、癌死に至るまでの生存期間を比較すると、50%生存日数で対照群では8日間、Bik では12日と有意な生存期間の延長を認めた ($p < 0.05$)。

これらの結果より申請者は以下の様に結論している。高浸潤性ヒト卵巣癌細胞にビクニン遺伝子を導入することにより、浸潤能を低下させ、ヌードマウスを用いた癌性腹膜炎モデルにおいては生存期間の延長をはかることができた。現在の集学的癌治療に加え、ビクニンによる転移抑制という概念を導入することにより、癌の治療成績に改善がもたらされる可能性が示された。また、卵巣癌の遺伝子治療のひとつの分子標的として、ビクニンを体内で発現させ、血中濃度を保つことにより生存期間の延長がもたらされる可能性が示唆された。

本学位論文はビクニンの抗腫瘍効果の発現機序を明らかにした点で重要であり、また新規な治療方法の可能性を示したことが、審査委員会で高く評価された。

以上の申請者の研究内容について審査委員会では以下のような質問および議論があった。

- 1) 生体内で inter trypsin inhibitor (ITI) からビクニンが産生される機序
- 2) ビクニンの血漿中、及び羊水中濃度
- 3) ビクニン (or ITI) 遺伝子発現調節機構
- 4) ビクニン発現株でのビクニン遺伝子発現量の継代による変化
- 5) ビクニンの細胞内の局在
- 6) ビクニン受容体からのシグナル伝達経路
- 7) ビクニンによる ERK1/2 活性化抑制の kinetics
- 8) ERK1/2 活性化抑制により影響される遺伝子群
- 9) ビクニン受容体の性質と発現調節機構
- 10) ビクニンの HRK 腹膜播種阻害機序
- 11) ビクニンと受容体との結合における種差の影響
- 12) ビクニンの癌細胞での発現
- 13) ビクニン (or ITI) 遺伝子欠損動物の表現型
- 14) ビクニン投与臨床症例の成績

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 浦野哲盟
副査 梶村春彦 副査 今野弘之