HamaMed-Repository
浜松医科大学学術機関リポジトリ
浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

Breast cancer cell apoptosis induced by preoperative treatment with 5'-deoxyfluorouridine (5'-DFUR):relationship to p53, BCL-2 and BAX expression

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 浩一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1133

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　２８０号	学位授与年月日	平成１１年　３月２６日
氏　　名	鈴　木　浩　一		
論文題目	Breast cancer cell apoptosis induced by preoperative treatment with 5'-deoxyfluorouridine(5'-DFUR):relationship to p53, BCL-2 and BAX expression (5'-DFUR による乳癌細胞のアポトーシスの誘導と p53, BCL-2, BAX の関係)		

博士(医学)　鈴 木 浩 一

論 文 題 目

Breast cancer cell apoptosis induced by preoperative treatment with 5′−deoxyfluorouridine（5′−DFUR）：relationship to p53, BCL−2 and BAX expression

（5′−DFURによる乳癌細胞のアポトーシスの誘導とp53, BCL−2, BAXの関係）

論 文 内 容 の 要 旨

〔はじめに〕

化学療法を用いた乳癌の治療戦略において、個々の症例での感受性の相違は大きな問題である。抗癌剤の有効性を予測し、その選択の指標を見いだすことは乳癌の治療戦略に大きな advantage をもたらすものと考えられるが、未だ有用なものはない。

最近、多くの抗癌剤がアポトーシスを誘導することにより抗腫瘍効果を来すという報告が散見されるようになった。アポトーシスのプロセスには様々な癌遺伝子や癌抑制遺伝子が関与する事が知られているが、それらの遺伝子に変異が起こるとアポトーシスのプロセスが途絶え、抗癌剤に対して感受性が低下することが予測できる。

本研究では、乳癌において遺伝子変異の頻度が高い p53およびその下流で転写制御を受け、アポトーシスの誘導を調節する BCL−2、そのホモログである BAX をアポトーシス関連遺伝子としてとりあげ、5′−DFUR（5−FU のプロドラック）による乳癌細胞のアポトーシスの誘導との関係を臨床材料を用いて検討し、抗癌剤の感受性の指標としての有用性を評価した。こらにin vitroの基礎実験において、5−FUによるアポトーシスの誘導とp53、BCL−2、BAXの関係を検証した。

〔対象と方法〕

（実験１）乳癌症例に対する5′−DFUR 術前補助化学療法無作為比較試験に登録された46人46検体のホルマリン固定パラフィン切片を使用した。術前投与群（n＝24）と非投与群（n＝22）の２群間（術前投与群は術前に5′−DFURを1200mg／day 5 日間以上投与され、一方非投与群は化学療法を受けなかった）で、アポトーシスの誘導を比較した。アポトーシスの誘導は TUNEL 法を用いて apoptotic index を算出し定量化した。さらに免疫組織化学染色法を用いてアポトーシス関連遺伝子であるp53、BCL−2、BAX の発現を測定、定量化し、アポトーシスの誘導とこれらの遺伝子の発現との関係につき検討した。

（実験２）ヒト胎児肺由来線維芽細胞株 IMR90（JCRB0516）および IMR90を SV40により p53を不活化し、トランスフォームさせた IMR90−SV（RCB1024）の二種類の細胞株を用いた。この p53の機能だけが異なる２種類の細胞間で、5−FUによる細胞死の誘導が異なるかどうか、またこのときBCL−2、BAXのmRNAの発現がどのように変化するかを検討した。5−FUを0.1ug／ml／day 5 日間投与して培養を続けた後に以下の測定を行った。

1．生存率（MTT assay）

2．細胞集団の解析（フローサイトメトリーを用いて、アポトーシス細胞は annexin V−FITC により、ネクローシス細胞はpropidium iodideにより検出した。）

3．BCL−2、BAX mRNA の発現量の変化（ABI PRISM 7700 SYSTEM を用いて RT−PCR 産物を定量化した）

〔結果〕

（実験１）Apoptotic indexは、5′－DFUR投与群と非投与群の二群間で有意な差を認めなかったものの、p53 negativeのsubgroup（n＝36）において、投与群では非投与群に比べてapoptotic indexが有意に高かった（p＝0.006）。またこのとき投与群では非投与群に比べてBAXの発現が高く、BCL－2の発現が低かった（p＝0.050、p＝0.008）。BCL－2／BAXはapoptotic indexと逆相関した（p＝0.042）。一方p53 positiveのsubgroup（n＝10）においては、すべての因子について二群間で有意な差を認めなかった。

（実験２）１．5－FUを0.1ug／ml／day 5日間投与後のIMR90の生存率は69.5％で、IMR90－SVの生存率は96.0％であった。

２．IMR90では、5－FUの濃度依存的にアポトーシス細胞（annexin V－FITC陽性）が増加したが、IMR90－SVではアポトーシス細胞の増加を認めなかった。ネクローシス細胞（propidium iodide陽性）はIMR90およびIMR90－SVともに変化は認められなかった。5－FUによる殺細胞効果はおもにアポトーシスの誘導によるものと考えられた。

３．BCL－2およびBAXの相対発現強度は、IMR90においては、5－FUの濃度依存的にBCL－2の発現が抑制されているのに対し、IMR90－SVでは変化がなかった。BAXの発現は両細胞株においても変化がなかった。BCL－2／BAXはIMR90で5－FUの濃度依存的に減少しているのに対し、IMR90－SVでは変化がなかった。この結果は臨床実験結果と相関した。

〔結論〕

１．5－FUによる細胞死の誘導はp53のstatusに依存し、BCL－2、BAXを転写制御しおもにアポトーシスの誘導に関与していた。

２．p53のstatusとともにBCL－2／BAXの評価をすることにより、5′－DFURの乳癌細胞に対する感受性を予測しうることが示唆され、そのマーカーとしての有用性が示された。

論文審査の結果の要旨

化学療法を用いた乳癌の治療戦略において、抗癌剤の有効性を予測しうる指標を得ることは重要である。この目的のため、多くの研究が行われているが、未だ有用なものは得られていない。最近、多くの抗癌剤がアポトーシスの誘導により抗腫瘍効果を来すという報告が散見され、抗癌剤の効果とアポトーシスのプロセスに関わる様々な遺伝子の関係が注目されるようになってきた。そこで申請者は、乳癌において遺伝子変異の頻度が高いp53、その下流で転写制御を受けアポトーシスの誘導を調節するBCL－2、ならびに、そのホモログであるBAXに着目し、それらの遺伝子の変異、発現の有無を評価することにより抗癌剤の有効性を予測しうる指標となり得るかを検討した。

まず、乳癌症例に対する5′－DFUR（5－FUのプロドラック）術前補助化学療法無作為比較試験に登録された46人46検体のホルマリン固定パラフィン切片を使用し、術前投与群（n＝24）と非投与群（n＝22）の２群間（術前投与群は術前に5′－DFURを1200mg／day 5日間以上投与され、一方非投与群は化学療法を受けなかった）で、アポトーシスの誘導を比較した。アポトーシスの誘導はTUNEL法を用いてapoptotic indexを算出し定量化した。さらに免疫組織化学染色法を用いてアポトーシス関連遺伝子であるp53、BCL－2、BAXの発現を測定、定量化し、アポトーシスの誘導とこれらの遺伝子の発現との関係につき検討した。

Apoptotic indexは、5′－DFUR投与群と非投与群の二群間で有意な差を認めなかったものの、P53

negativeのsubgroup（n＝36）において、投与群では非投与群に比べてapoptotic indexが有意に高かった（p＝0.006）。また、このとき投与群では非投与群に比べてBAXの発現が高く、BCL－2の発現が低かった（p＝0.050、p＝0.008）。BCL－2／BAXはapoptotic indexと逆相関した（p＝0.042）。一方、p53positiveのsubgroup（n＝10）においては、すべての因子について二群間で有意な差を認めなかった。

次いで、ヒト胎児肺由来線維芽細胞株IMR90（JCRB0516）およびIMR90をSV40によりp53を不活化し，トランスフォームさせたIMR90－SV（RCB1024）の二種類の細胞株を用い、p53の機能のみが異なる２種類の細胞間で、5－FUによる細胞死の誘導が異なるかどうか、また、このときBCL－2、BAXのmRNAの発現がどのように変化するかを検討した。5－FUのcytotoxityは、MTT法を用いて生存率の解析により評価した。このときの細胞集団を、フローサイトメトリーを用いてアポトーシス細胞はannexin V－FITCにより、ネクローシス細胞はpropidium iodideにより検出し、分析した。そしてBCL－2、BAXのmRNAの発現量の変化はABI PRISM 7700 SYSTEMを用いてRT－PCR産物を定量化し、検討した。

5－FUを0.1ug／ml／day５日間投与後のIMR90の生存率は69.5％で、IMR90－SVの生存率は96.0％であった。IMR90では、5－FUの濃度依存的にアポトーシス細胞（annexin V－FITC陽性）が増加したが、IMR90－SVではアポトーシス細胞の増加を認めなかった。ネクローシス細胞（propidium iodide陽性）はIMR90およびIMR90－SVともに変化は認められなかった。5－FUによる殺細胞効果はおもにアポトーシスの誘導によるものと考えられた。BCL－2およびBAXの相対発現強度は、IMR90においては、5－FUの濃度依存的にBCL－2の発現が抑制されているのに対し、IMR90－SVでは変化がなかった。BAXの発現は両細胞株においても変化がなかった。BCL－2／BAXはIMR90で5－FUの濃度依存的に減少しているのに対し、IMR90－SVでは変化がなかった。この結果は臨床実験結果と相関した。

これらの結果より申請者は、

1）5－FUによる細胞死の誘導はp53のstatusに依存し、BCL－2、BAXを転写制御しおもにアポトーシスの誘導に関与していること。

2）p53のstatusとともにBCL－2／BAXの発現の有無を評価をすることは、乳癌細胞に対する5′－DFURの有効性を予測する指標として有用であることを示した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

1）乳癌に対する化学療法の種類と奏功率、ホルモン療法の位置付け

2）５－FUによるアポトーシスの誘導は、広く知られた事実か、またその効果はtime－dependentかあるいはdose－dependentか

3）５′－DFURとPyNPase、PDECGFの関係

4）PyNPaseの検査時期とその解釈

5）IMR90－SVのp53の不活化の方法とその意義

6）p53の免疫組織化学染色における染色性の解釈

7）MTT法の解釈（細胞のviabilityとproliferationのどちらを評価するのか）

8）TUNEL法の評価方法

9）BCL－２とBAXの定量方法（一般性と客観性）

10）Propidium iodideの染色性の解釈（necrosisと評価してよいか）

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　教授　大野龍三

副査　教授　竹内宏一　副査　助教授　内藤恭久