




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 (課)・論	第436号	氏名	黎海莉
審査委員会委員	主査氏名	三股浩光	
	副査氏名	仁木一郎	
	副査氏名	白尾國昭	
論文題目: Novel target genes responsive to the anti-growth activity of triptolide in endometrial and ovarian cancer cells. 子宮内膜癌と卵巣癌に対するトリプトライドの抗癌作用とそれに応答する新規標的遺伝子 論文掲載誌名: Cancer Letters, in press			
<p> : 雷公藤は抗炎症作用を有し、中国では関節リウマチやSLEの治療に用いられている。その主成分であるトリプトライドは、抗炎症作用だけでなく白血病細胞など癌細胞のアポトーシスを誘導することが報告されており、本研究ではトリプトライドの子宮内膜癌と卵巣癌に対する効果と分子発現の変化について検討した。子宮内膜癌細胞3株と卵巣癌2株を用いて、トリプトライドの細胞増殖抑制効果をMTT assayで、細胞周期解析をFlow cytometryにて、またアポトーシス誘導をannexin V assayとミトコンドリア膜電位消失実験にて検討した。また子宮内膜癌細胞株HHUAにおけるトリプトライド投与前後のmRNA発現変化をcDNA microarrayにより解析し、これらの細胞株で共通した発現変化のみられるトリプトライドの標的候補遺伝子の一部の蛋白発現をすべての細胞株についてWestern blot法にて検討した。 </p> <p> 子宮内膜癌細胞株と卵巣癌細胞株におけるトリプトライドのED₅₀はそれぞれ3.0~11×10⁻⁸と4.1~9.8×10⁻⁸ Mであり、トリプトライドはp53蛋白異常に関係なく細胞増殖を抑制した。またシスプラチンとの併用実験では、併用によってシスプラチン耐性癌細胞株においても細胞増殖抑制が認められたが、シスプラチンとの相乗効果はみられなかった。トリプトライドによって細胞周期解析ではS期停止がみられ、annexin V assayとミトコンドリア膜電位消失実験によってアポトーシス誘導が認められた。cDNA microarray解析では、トリプトライド処理によって細胞周期やアポトーシス、分化増殖、転写、シグナル伝達に関連した遺伝子発現の変化がみられ、標的候補遺伝子の蛋白発現を子宮内膜癌細胞株と卵巣癌細胞株のすべてについてWestern blot法で検討したところ、LRAP、CDH4、SFRP1の発現増加とcystatin1、cystatin2、T NNT1、LI-CAMの発現低下がすべての細胞株に共通してみられた。 </p> <p> 以上の結果より、トリプトライドの抗癌作用はp53非依存性な部分もあり、シスプラチン耐性癌細胞にもアポトーシスを誘導して抗癌作用を示すことが確認された。また、cDNA microarrayによるトリプトライドの標的候補遺伝子検索によって数個の興味深い遺伝子を同定することができ、子宮内膜癌や卵巣癌におけるそれらの遺伝子の機能について今後さらに検討する必要があるものと思われる。 </p> <p> 本研究では、トリプトライドの婦人科系悪性腫瘍に対する抗癌作用とその機序について初めて検討し、トリプトライドが子宮内膜癌細胞株と卵巣癌細胞株にアポトーシスを誘導すること、その作用はp53異常に依存せず、シスプラチン耐性癌細胞にも有効であることを明らかにした。さらにcDNA microarray解析によって、トリプトライドの標的候補遺伝子を数個同定しており、抗癌作用の新たな機序の解明につながるものと思われる。 </p> <p> 以上より、審査員の合議により、本論文は学位論文に値するものと判定した。 </p>			

学 位 論 文 要 旨

氏名 黎 海莉

論 文 題 目

Novel target genes responsive to the anti-growth activity of triptolide in endometrial and ovarian cancer cells

(子宮内膜癌と卵巣癌に対するトリプトライドの抗癌作用とそれに応答する新規標的遺伝子)

要 旨

【緒言】

雷公藤（ライコウトウ）は抗炎症作用を持ち中国では関節リウマチやSLEの治療に用いられている。その主成分であるトリプトライドは、抗炎症作用だけでなく、白血病細胞など癌細胞のアポトーシスを誘導する事が報告された。そこで、トリプトライドの子宮内膜癌、卵巣癌に対する効果について検討した。

【研究対象および方法】

子宮内膜癌細胞株 HHUA、Ishikawa、HEC-1B、卵巣癌細胞株 SK-OV-3、OVCAR-3 にトリプトライドを添加し、MTT assay により細胞増殖抑制効果を検討した。Flow cytometry により細胞周期を解析し、annexin V assay と mitochondria 膜電位消失実験により apoptosis 誘導を確認した。トリプトライド投与前後の HHUA における mRNA 発現変化を cDNA microarray により解析し、得られた標的候補遺伝子産物の発現変化を上記すべての細胞株において western 法で検討し

た。

【結 果】

トリプトライドの子宮内膜癌および卵巣癌細胞株における ED_{50} は、HHUA : 3.0×10^{-8} M、Ishikawa : 1.1×10^{-7} M、HEC-1B : 8.5×10^{-8} M、SK-OV-3 : 9.8×10^{-8} M、OVCAR-3 : 4.1×10^{-8} M であった。しかし、シスプラチンとの併用により相加効果は見られたが相乗効果は認められなかった。細胞周期では S 期停止が認められ、annexin V assay と mitochondria 膜電位消失実験では apoptosis の誘導が確認された。Microarray により、HHUA 細胞では細胞周期・apoptosis・分化・増殖・転写・シグナル伝達に関連した遺伝子の発現変化が認められた。これらの標的候補遺伝子について、5 種すべての細胞株における蛋白発現変化を western 法で確認したところ、LRAP、CDH4、SFRP1 蛋白の発現増加、cystatin1、cystatin2、TNNT1、L1-CAM 蛋白の発現低下が、すべての細胞株に共通した蛋白発現変化として見出された。

【考 察】

トリプトライドは、p53-independent に抗癌効果を発揮し、さらにシスプラチン抵抗性の細胞株 (SK-OV-3) にもシスプラチン感受性の細胞株 (HHUA) と同様にすぐれた抗癌効果が認められた。トリプトライドによる細胞増殖抑制、細胞周期停止、アポトーシス誘導の機序を検索するため、HHUA における mRNA 発現変化を microarray により解析し、5 種すべての細胞株において microarray で得られた候補遺伝子の蛋白発現を検討し、今まで報告されていないユニークな標的遺伝子を発見する事ができた。

【結 語】

トリプトライドは子宮内膜癌、卵巣癌に対し強力な細胞増殖抑制効果を有していた。その機序として、細胞周期停止、apoptosis 誘導が考えられた。また今回の研究から、トリプトライドの標的遺伝子の候補が見出された。