

博士(医学) 片山知也

学位論文題名

Type I interferon prolongs cell cycle progression via p21^{WAF1/CIP1} induction in human colon cancer cells

(I型インターフェロンは p21^{WAF1/CIP1}発現誘導を介し

大腸癌の細胞周期進行を遅延させる)

学位論文内容の要旨

【背景】大腸癌は最も頻度の高い悪性腫瘍の1つであり、治療の第一選択は積極的な切除であるが、その約30%に再発が見られる。よってその予後向上には原発巣の切除とともに再発の予防と治療が必要である。これに対し 5FUを中心とした数多くの化学療法が行われているが、未だ満足すべき結果には至っていない。そのような中、Interferon(IFN)- β を用いた化学療法が進行大腸癌症例に有効であったとの報告があった。

IFN- β はIFN- α と同じI型IFNに分類され、共通のIFN- α receptor(IFNAR)を介して細胞内にシグナルを伝達する。これまでI型IFNには、抗ウイルス効果の他に、血管新生抑制作用および直接的細胞増殖抑制作用といった抗腫瘍効果があることが報告されており、細胞増殖抑制メカニズムに関しては、G1期停滞やS期進行遅延・S-G2/M期移行遅延などの細胞周期の進行制御や、アポトーシス誘導が関与していることが報告されている。本研究では大腸癌細胞に対するI型IFNの増殖抑制効果を確認し、その標的分子を明らかにするとともに増殖制御メカニズムを解析した。

【材料と方法】2種類のヒト大腸癌細胞株(HT29, SW480)に対し、まず①IFNAR(IFNAR-1, IFNAR-2b, IFNAR-2c)の発現をウェスタンプロット(WB)法で確認し、②2種類のI型IFN(IFN- α 2b, IFN- β)の増殖抑制効果を濃度別(50, 500, 5000 IU/ml)、添加時間別(48, 96, 144 h)に、コラーゲンゲル培養薬剤感受性試験(CD-DST)を用いて比較検討した。同期させた大腸癌細胞にIFN(500 IU/ml)を添加し、48時間後までの細胞周期変化を各周期別(G0/G1期, S期, G2/M期)にフローサイトメトリー(FCM)を用いて測定するとともに、細胞周期制御蛋白群(Cyclin A, Cyclin B, Cdk1, Cdk2, p19, p21, p27)の発現変化をWB法にて調べた。IFN添加群(IFN- α 2b, IFN- β , 1000 IU/ml)および非添加群のp21プロモーター遺伝子の転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイ(LRA)にて比較検討した。RNA interference(RNAi)法を用いてp21をknock-downした大腸癌細胞株(SW480)を作成し、IFN添加後の細胞周期変化および周期制御蛋白の発現変化を調べた。

【結果】2種類の大腸癌細胞株(HT29, SW480)とともにインターフェロンレセプター(IFNAR)の発現があり、両細胞株に対しIFN- α 2bおよびIFN- β は増殖抑制効果を示した。その効果は濃度依存性であり、いずれの濃度においてもIFN- α 2bに比べIFN- β の方が有意に高かったが($P<0.05$)、添加時間と増殖抑制効果の間には相関性は認められなかった。

FCMにて細胞周期変化を調べた結果、IFN添加群では非添加群に比べ細胞周期の進行が遅延しているのが認められ、特にS期での遅延が特徴的であった。S期進行は、Cdk2-Cyclin A, Cdk1-Cyclin AおよびCdk1-Cyclin B複合体によって制御されている。よ

って S 期遅延のメカニズムを調べるため S 期制御蛋白の発現変化を調べた結果、IFN 添加群では Cyclin A, Cyclin B の発現は非添加群に比べ遅延しており、その発現パターンは S 期細胞数の増加に相關していた。また Cdk(Cdk1, Cdk2 and Cdk4)蛋白の発現は IFN 添加群および非添加群とも実験期間内を通じて変化は認めなかった。

Cdk inhibitors (CKIs)は cyclin-Cdk 複合体に結合しその酵素活性を阻害するが、一般にその発現量は細胞周期を通じて変化を認めない。しかし p21 発現は IFN 添加により増加し、S 期細胞数増加や増殖抑制効果と同様、IFN- β の方がその発現増加効果が高いことも認めた。また LRA にて p21 プロモーター遺伝子の転写活性が IFN 添加により約 2 倍に増加することが示され、さらに p21 knock-down 細胞においては IFN の細胞周期遅延作用が減弱し、細胞周期制御蛋白(特に Cyclin A, Cyclin B)の発現変化も消失することが認められた。

【考察】様々な正常細胞や腫瘍細胞に対する IFN の細胞周期作用として、主に G1 期停止がよく知られているなか、S 期進行遅延や S-G2/M 期移行阻害などの報告もある。このように IFN には様々な生物学的活性が報告されているが、その作用は細胞種によって大きく分類できる。Daudi Burkitt's リンパ腫や白血病など造血系腫瘍では G1 期停止が多く報告されている一方、肝細胞癌や前立腺癌などの固形腫瘍においては S 期進行遅延や S-G2/M 期移行阻害が特徴的である。大腸癌細胞株を用いた本研究でも、S 期増加を特徴とした細胞周期遅延作用が IFN 添加により認められた。Qin らはこうした S 期細胞増加は、pRb 依存性 G1 checkpoint 機能の欠如と S-G2/M 期移行阻害のため引き起こされると述べているが、Hobeika らは Rb 遺伝子コードが欠損している細胞においても G1 arrest の誘導が認められたと報告している。本実験で使用した HT29 においては pRb 発現異常は認めないが S 期細胞の増加がみられた。それゆえ Rb だけでなく、その他の細胞周期制御分子の異常化も関与していると考えられた。

S-G2/M 期進行遅延の原因を調べるため、S 期関連蛋白の発現変化を解析した。本来ならば、cyclin A および cyclin B の発現により即座に cyclin-Cdk 複合体が形成・活性化され、その結果 S 期進行が促進されて G2/M 期への移行が誘導される。しかし本研究では cyclin A および cyclin B の発現にも関わらず S 期進行は促進されず、これらの発現は正常細胞に比べ遅く S 期細胞数の増加に相關するものであった。さらに p21 発現を抑制により S 期細胞数の増加がなくなると Cyclin A, Cyclin B 発現の遅延・増加も消失した。これらの結果から、Cyclin A, Cyclin B 発現は IFN により制御されているのではなく、S 期細胞数変化を反映したものであると考えられ、こうした結果は IFN と Cdk-inhibitors (CKIs) の関与を推測させるものであった。CKIs の発現変化を調べた結果では IFN により p21 発現が増加することを認め、さらにその発現増加が転写レベルで調節されていることを認めた。また p21 発現を抑制することで IFN の細胞周期遅延作用は減弱することが分かり、p21 が IFN の細胞周期遅延作用における重要な標的分子であると考えた。Dulic らは S-G2/M 期進行遅延メカニズムとして、p21 発現により cyclin A-Cdk2 活性が抑制され M 期への移行が阻害されるためと報告している。今回の結果においても、p21 による cyclin A-Cdk2 の機能障害が示唆された。cyclin A の量的変化が S 期細胞を反映している 2 次的なものであること、および Cdk2 発現が IFN 添加により変化しないことより、p21 は細胞周期制御蛋白を量的に調節しているのではなく、機能的に Cdk2 活性を抑制していると考えられた。

また本研究では IFN- α 2b と IFN- β の増殖抑制効果に差異が認められた。IFN- α と IFN- β の生物学的効果の違いについては、細胞内シグナル伝達の差異や受容体鎖への相互作用・結合能の差異、およびアポトーシス誘導能の差異などが原因と報告されている。本研究ではこの増殖抑制効果の差異は 2 つの IFN の p21 発現誘導の差異に一致しており、p21 発現量と IFN 増殖抑制効果の相関を裏付けるものと考えた。

今回我々は大腸癌細胞株に対する I 型 IFN の増殖抑制効果が S-G2/M 期進行遅延を特徴とした細胞周期遅延作用に依存していることを示すとともに、その作用には p21 発現が大きく関与していることを示した。

学位論文審査の要旨

主査教授 浅香正博

副査教授 秋田弘俊

副査教授 藤堂省

学位論文題名

Type I interferon prolongs cell cycle progression via p21^{WAF1/CIP1} induction in human colon cancer cells

(I型インターフェロンはp21^{WAF1/CIP1}発現誘導を介し

大腸癌の細胞周期進行を遅延させる)

本研究では大腸癌細胞におけるI型IFNの増殖抑制効果および増殖制御メカニズムを検討するとともにその標的分子を明らかにした。IFN- α およびIFN- β は同じI型IFNに分類され、共通のインターフェロンレセプターを介して細胞内にシグナルを伝達する。その効果には抗ウイルス効果の他に、血管新生抑制作用および細胞増殖抑制作用といった抗腫瘍効果があることが報告されており、その増殖抑制メカニズムに関してはG1期停滞やS期進行遅延・G2/M期移行遅延など細胞周期の制御や、アポトーシス誘導の関与が示されている。今回我々はインターフェロンレセプター発現をもつ2種類の大腸癌細胞株(HT29, SW480)に対するIFN- α 2bおよびIFN- β の増殖抑制効果を確認した。増殖抑制効果は濃度依存性であり、いずれの濃度比較においてもIFN- α 2bに比べIFN- β の方が有意に高かった。増殖抑制メカニズムを解析するため、フローサイトメトリーを用いて細胞周期変化を調べた結果、IFN添加群では非添加群に比べ細胞周期の進行遅延がみられ、特にS期細胞数の増加が特徴的であった。S期進行は主にCdk2-Cyclin A/B複合体によって制御されているため、S期制御蛋白の発現変化を調べたところ、IFN添加群ではCyclin A, Cyclin Bの発現が非添加群に比べ増加していた。理論上はcyclinの発現により即座にcyclin-Cdk複合体が形成・活性化され、その結果S期進行が促進されてG2/M期への移行が誘導されるはずである。しかし本研究ではcyclin Aおよびcyclin Bの発現にも関わらずS期進行は促進されず、その発現パターンは非添加群に比べ遅くS期細胞数を反映するものであった。次にcyclin-Cdk複合体の酵素活性を制御するCdk inhibitorsの発現変化を調べたところ、IFN添加によりp21発現が誘導されることが認められた。p21発現とIFNの増殖抑制効果には正の相関がみられ、p21 knock-down細胞においては細胞周期遅延作用の減弱が認められた。加えてルシフェラーゼレポーターアッセイではIFN添加によりp21プロモーター遺伝子の転写活性が約2倍に増加することが示され、p21がIFNの細胞周期遅延作用における重要な標的分子であると考えられた。

以上の内容発表後、副査の秋田教授から1) 実験で使用したIFN濃度と実際の臨床現場での使用濃度の差異について、2) IFNのアポトーシス誘導能について、3) p21によるG1 arrest誘導はみられたか、

4) 抗癌剤との併用効果についての質問があった。続いて主査の浅香教授から 5) 研究対象としてなぜ大腸癌細胞株を選んだのか、6) 他の癌細胞株ではどのような報告があるのかについて質問があった。また、副査の藤堂教授からは、7) antiviral activity に関して行われている最近の治研について、8) IFN レセプターから p21 発現までのシグナル伝達系についての質問があった。申請者は、これらの質問に対し、1) 本実験で使用した IFN 濃度はそれぞれ静脈内および動脈内に直接投与した場合に近い濃度を設定しており臨床応用を踏まえたデータであること、2) TUNEL 法、DNA ladder 法にて調べた結果 IFN 添加によるアポトーシス誘導作用は本研究では認められなかっただこと、3) S 期進行遅延を特徴とした細胞周期全体の遅延であり G1 arrest を特徴とした変化ではなかっただこと、4) S 期をターゲットとした SFU 系抗癌剤との併用では相乗効果が見られたと回答した。5) 臨床現場で数多く診療する疾患であるのに対し IFN の抗腫瘍効果が今までほとんど研究されていなかっただためであること、6) 一般に浮遊系細胞では G1 arrest が報告されているのに対し固形腫瘍では S 期遅延作用が IFN の効果として多く報告されていること、7) IFN の抗ウイルス活性に関して non-coding microRNA を用いた治研が最近報告されていること、8) JAK-STAT チロシンキナーゼリン酸化経路の活性化が報告されているがまだ充分には解析されていないと返答した。

本研究は、I 型 IFN が大腸癌に対して増殖抑制作用を有しており、p21 発現誘導を介した細胞周期遅延作用がその主要メカニズムであることを示したことで高く評価され、今後臨床上で p21 が IFN 治療を行う上でのターゲット分子となることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。