

博士論文要旨

所 属 保健医療学研究科博士後期課程
専 攻 （ 臨床検査学専攻 ）

学籍番号	217DS02	氏 名	森西 起也
<p>(博士論文題目)</p> <p>大腸がんにおける核内受容体 Peroxisome proliferator-activated receptor-α (PPAR-α) の発現とその局在変化</p> <p>Activation and Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Are Associated with Tumorigenesis in Colorectal Carcinoma</p> <p>(目的)</p> <p>本研究では、2つの大腸癌細胞株 (Caco-2 細胞と SW620 細胞) に対して、PPAR-α のアゴニストである Fenofibrate を添加し、PPAR-α を活性化することで大腸癌細胞の生存能へ与える影響を調べた。また、大腸癌細胞および組織における PPAR-α の発現の局在や、大腸癌組織における PPAR-α 発現と臨床病理学的因子との関連について検討を行った。</p> <p>(方法)</p> <p>【細胞培養】</p> <p>ヒト大腸癌由来細胞株である Caco-2 細胞と SW620 細胞を研究に用いた。細胞の培養には、10% ウシ胎児血清、1% 抗生剤を含む D-MEM 培地を用い、37°C、5% CO₂ の条件で細胞を培養した。</p> <p>【RT-PCR】</p> <p>大腸癌培養細胞から PPAR-α の mRNA を RNeasy Plus Mini Kit を使用して抽出した。抽出した mRNA は、SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit を使用して、RT-PCR を行った。RT-PCR は、95°C、30 秒間の熱変性、63°C、30 秒間のアニーリング、71°C、60 秒間の伸長反応を 35 サイクルおこなうことで PCR 産物を精製した。その後、2% アガロースゲルで分離し、LED 100 illumination を用いて PPAR-α の遺伝子を可視化した。また、プライマーは PPAR-α : Forward, 5-CTGTCGGGATGTCACACAAC-3, Reverse, 5-CCGCAAACACCTACTGGATT-3、GAPDH : Forward, 5-CAACGACCACTTTGTCAAGC-3 、 Reverse, 5-TCTTCAAGGGGTCTACATGG-3 を使用した。</p> <p>【MTT assay】</p> <p>大腸癌培養細胞に対し、増殖能を MTT assay により評価した。大腸癌培養細胞を 96 穴マイクロプレートに 8×10⁴ cells / mL になるよう調整し、100μL ずつプレートに添加した。24 時間培養後、培地をアゴニストである Fenofibrate とアンタゴニストである GW6471 を含む培地に交換し 48 時間さらに培養した。MTT 試薬を各穴に添加し、37°C で 3 時間培養し、Crystal Dissolving Solution を各穴に添加し、37°C で 6 時間さらに培養した。吸光度は、モデル 680 マイクロプレートリーダーを使用して 570 nm で測定した。</p> <p>【Hoechst 染色】</p>			

大腸癌培養細胞を対象とし、クロマチン凝縮または核断片化といったアポトーシス誘導の有無を Hoechst 染色により観察した。大腸癌培養細胞を 1×10^5 cells / mL に調節し、60mm 細胞培養用ディッシュに撒き、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件で 24 時間培養した。その後、培地を Fenofibrate と GW6471 を含む培地に交換し 48 時間さらに培養し、細胞を回収した。回収した細胞懸濁液 10 μl と Hoechst 染色液 2 μl を混和し、蛍光顕微鏡下で細胞の核の染色像を確認した。生細胞数とアポトーシスを示す細胞をカウントし、その割合から評価した。

【Western blot】

大腸癌培養細胞を 60mm 細胞培養用ディッシュに播き、 37°C でコンフルエントになるまで培養した。播種した細胞を PBS で洗浄し、溶解バッファー (50 μM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 150 μM NaCl, 10 μM MgCl₂, 1 μM EDTA) で溶解し、氷上で 20 分間静置した。溶解物を 4°C で 20 分間遠心分離し、デカンテーション後、2 \times サンプル Buffer を添加し、3 分間加熱することでタンパク質を変性させた。SDS ポリアクリルアミドゲルを用い電気泳動によるタンパク質分離後に、プロッターにより PVDF 膜に転写した。2% スキムミルクを使用して PVDF 膜を室温でブロッキングし、マウス抗 PPAR- α 抗体 (1:500, Santa Cruz Biotechnology)、または、ウサギ抗 β -Actin 抗体 (1:5,000, Cell Signaling Technology)、抗マウス LaminB2 抗体 (1:5,000, ノバスバイオロジカルズ) を室温で 2 時間反応させた。PVDF 膜を洗浄し、2 次抗体として、ペルオキシダーゼ結合抗ウサギ抗体 (1:5,000, Cell Signaling Technology) またはペルオキシダーゼ結合抗マウス抗体 (1:5,000, Cell Signaling Technology) を室温で 1 時間反応させた。その後、化学発光キット (Chemi-Lumi One L) を用いて特定のタンパク質を感光フィルムにバンドとして検出した。タンパク質量は、ImageJ (バージョン 1.52a) によって定量化され、 β -Actin を内部コントロールとして使用した。

【タンパク分離】

大腸癌培養細胞の細胞質および核タンパク質は、Cytoplasmic & Nuclear Protein Extraction Kit を使用して、プロトコールに従って分離した。その後、分離したタンパクに対して Western blot を行い、PPAR- α の局在を確認した。

【免疫細胞化学染色】

大腸癌培養細胞をチャンバースライドに播き、 37°C でコンフルエントになるまで培養した。播種した細胞を PBS で 2 回洗浄し、3.7% ホルマリンで 15 分間固定した。細胞を 0.25% Triton X-100 で 10 分間反応させ、2% ウシ血清アルブミンで 1 時間ブロッキングを行った。細胞に HRP 標識抗 PPAR- α 抗体 (1:200, Santa Cruz Biotechnology) を添加し室温で 2 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄し、DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) により発色させた。その後、細胞をマイヤーのヘマトキシリンで対比染色し、脱水、透徹し、マリノールで封入した。

【免疫組織化学染色】

パラフィン包埋ブロックを 4 μm の厚さに薄切し、これを標本とした。標本の脱パラフィン後、オートクレーブ処理を 120°C 15 分を行い、3% 過酸化水素水に 10 分反応させ、0.1% スキムミルクに 10 分反応させた。1 次抗体として HRP 標識抗 PPAR- α 抗体 (1:200) を用い、抗体滴下後に室温で 2 時間反応させ、DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) により発色させた。対比染色としてマイヤーのヘマトキシリンを用い、核染を行った。PPAR- α 発現は、核の陽性率で判定をおこない、0% をスコア 0、陽性率 1~25% をスコア 1+、陽性率 26~50% をスコア 2+、陽性率 51~75% をスコア 3+、陽性率 76% 以上をスコア 4+ とし、スコア 0、1+ と 2+ を陰性 (-)、スコア 3+ と 4+ を陽性 (+) と判定した。

(結果)

【大腸癌細胞における PPAR- α の発現】

大腸癌細胞を用いて PPAR- α の mRNA の発現を、RT-PCR により調べた結果、Caco-2 および SW620 細胞において PPAR- α の mRNA の発現を確認した。さらに、Western blot により PPAR- α のタンパク質の発現を確認したが、Caco-2 および SW620 細胞において PPAR- α タンパク質の発現量に差はなかった。

【大腸癌細胞における PPAR- α の局在】

大腸癌細胞における PPAR- α の細胞内局在を確認するため、免疫細胞化学染色を行い、その結果 PPAR- α は主に大腸癌細胞の核に局在していることが分かった。次に、Caco-2 および SW620 細胞を細胞分画（核と細胞質）に分離し、PPAR- α の発現を Western blot により比較した。その結果 PPAR- α は大腸癌細胞の核で発現し、細胞質では発現していなかった。

【MTT assay を用い、Fenofibrate 添加における大腸癌細胞への増殖能を検討】

Fenofibrate 添加による大腸癌細胞への増殖能の影響は、MTT assay を使用して評価した。大腸癌細胞に対して Fenofibrate (Caco-2 細胞は 200 μ M、SW620 細胞は 100 μ M、各グループの対照として DMSO) を添加し、48 時間培養した。MTT assay を行った結果 Fenofibrate は、Caco-2 および SW620 細胞の生存率を有意に低下させた。次に、PPAR- α のアンタゴニストである GW6471 (3 μ M) を Fenofibrate (Caco-2 細胞は 200 μ M、SW620 細胞は 100 μ M) に加えたものを細胞に添加し、MTT assay を行った結果、Fenofibrate のみを添加した時にみられた生存率の低下は有意に抑制された。

【Hoechst 染色を行い、Fenofibrate 添加における大腸癌細胞へのアポトーシス誘導を評価】

Fenofibrate 添加による大腸癌細胞へのアポトーシス細胞の割合の変化は、Hoechst 染色を行うことで評価した。大腸癌細胞に対して Fenofibrate (Caco-2、SW620 細胞 100 μ M、各グループの対照として DMSO) を添加し、細胞を Hoechst 染色した結果、Fenofibrate を添加することによりアポトーシス細胞の割合が大幅に増加した。また、Caco-2 および SW620 細胞に GW6471 (3 μ M) を Fenofibrate (100 μ M) に加えたものを添加し、Hoechst 染色を行った結果、Fenofibrate のみを添加した時にみられたアポトーシス細胞の増加が大幅に抑制された。

【免疫組織化学染色による PPAR- α 発現と臨床病理学的因子との関係】

パラフィン包埋された大腸癌組織ブロックは、香川大学医学部附属病院病理部から提供された。対象の患者 64 人は (男性 39 人、女性 25 人)、52 人が分化型腺癌であり、12 人が粘液性腺癌であった。また、リンパ管侵襲は 48 例が陽性であり、16 例が陰性、静脈侵襲は 48 例が陽性、16 例が陰性、リンパ節転移は 21 例で観察された。深達度については、1 例が T0、5 例が T1、3 例が T2、34 例が T3、21 例が T4 であった。進行度 (ステージ) は、1 例がステージ 0、7 例がステージ I、34 例がステージ II、21 例がステージ III、1 例がステージ IV であった。免疫組織化学染色を行い、PPAR- α の発現を観察した結果、主に分化型腺癌の核に PPAR- α が局在し、正常上皮組織ではほとんど発現が観察されなかった。臨床病理学的因子との関係については、組織型と PPAR- α の発現について、粘液癌で PPAR- α の発現は減少し、分化型腺癌において PPAR- α 発現は粘液癌よりも有意に高かった。しかし、PPAR- α 発現は性別、年齢、リンパ管侵襲、静脈侵襲、リンパ節転移、深達度、およびステージとは相関を認められなかった。

(考察)

大腸癌細胞における Fenofibrate による PPAR- α の活性化への影響を調べた結果、Fenofibrate の添加は大腸癌細胞の生存能を減少させ、GW6471 の添加により生存能低下が抑制された。Fenofibrate 添加による PPAR- α の関与については、乳がん、膵臓がん、卵巣がん、子宮内膜がん、神経芽細胞腫細胞、近位尿細管細胞、リンパ腫、多発性骨髄腫において抗癌作用をもつことが示されているが、大腸癌における PPAR- α の働きについてはほとんど報告されていない。本研究の結果より、PPAR- α が大腸癌に対して抗癌作用をもたらす可能性が示された。

免疫組織化学染色の結果より、正常な上皮組織における PPAR- α の発現は、分化型腺癌よりも低いことがわかった。さらに、大腸癌における PPAR- α の発現と臨床病理学的因子について相関を調べた結果、分化型腺癌における PPAR- α 発現は、粘液癌よりも有意に高かった。粘液癌は、大腸癌の 5~20% を占め、細胞外の粘性液体（腫瘍領域の > 50%）によって定義される。また、粘液癌における PPARs との関連についての報告は認められなかった。今回の研究で使用している培養細胞は、原発性大腸癌患者（Caco-2）および転移リンパ節（SW620）から確立されたものであり、これらの細胞は粘液を産生していない。以上のことから、PPAR- α は、*in vivo* および *in vitro* において粘液を産生しない大腸癌細胞の核で発現していたことから PPAR- α は大腸癌の粘液産生能と何らかの関わりがある可能性を示した。

PPAR- α は大腸癌の核に局在しており、培養細胞において Fenofibrate は PPAR- α を活性化することにより腫瘍増殖を抑制し、アポトーシスを誘発した。これらの発見は、Fenofibrate による PPAR- α の活性化が大腸癌細胞の生存を阻害する可能性があることを示唆している。PPARs は、核内で活性化されることで様々な転写因子を調節する核内受容体である。PPAR- α のサブタイプの一つである PPAR- γ のリガンドは、Bcl-2 の転写因子である NF- κ B の活性を抑制し、抗アポトーシス作用のある Bcl-2 タンパク質の発現を阻害することにより、大腸癌細胞のアポトーシスを有意に誘導することが報告されている。また、NF- κ B と Bcl-2 は、ヒト大腸癌細胞の PPAR- γ の活性化とアポトーシスに重要な役割を果たすことが示唆されている。PPAR- α のリガンドは、NF- κ B の阻害により乳癌細胞のアポトーシスを誘導するとの報告があり、さらに、PPAR- α の活性化は、細胞周期の調節にも関与しているとの報告があり、統一した経路の報告はなかった。したがって、Bcl-2 とその転写因子である NF- κ B は、大腸癌において PPAR- α の活性化を介して腫瘍増殖を抑制する可能性があるが、アポトーシスを含む腫瘍細胞増殖と PPAR- α の転写活性との関係のメカニズムについては不明である。PPAR- α の活性化による大腸癌のアポトーシスの誘導を調節するメカニズムを明らかにするには、今後さらなる研究が必要である。

（結論）

Fenofibrate による PPAR- α の活性化は、大腸癌細胞の生存能を低下させることが明らかとなった。さらに、大腸癌では、正常な上皮組織と比較して、PPAR- α の発現が増加した。アゴニストによる PPAR- α の活性化は、大腸癌に対する抗癌効果を有する可能性があり、さらに PPAR- α の核における発現は大腸癌の治療標的となりうる。

（決められた構成で4ページ以内に記述する）