

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
森 嶋 祥 子	主 査 教 授 大 槻 勝 紀
	主 査 教 授 大 道 正 英
	副 査 教 授 林 秀 行
	副 査 教 授 谷 川 允 彦
	副 査 教 授 芝 山 雄 老
主論文題名 Raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, induces mitochondria-mediated apoptosis in human endometrial carcinoma cells (選択的エストロゲン受容体調節薬であるラロキシフェンのヒト子宮内膜癌に対するミトコンドリア経路を介したアポトーシス誘導能)	
学位論文内容の要旨	
《背 景》 ラロキシフェンはステロイド骨格をもたない選択的エストロゲン受容体調節薬 (selective estrogen receptor modulator; SERM) で、閉経後の骨粗鬆症の治療薬として用いられている。作用機序はエストロゲン受容体に結合し、組織特異的に標的遺伝子の転写を促進あるいは抑制することによって、組織特異的作用を示す。骨に対してはエストロゲン作用を示し、破骨細胞の活性を抑制する。一方、乳腺および子宮内膜に対しては抗エストロゲン作用を示す。 閉経後の骨粗鬆症を対象にラロキシフェンの効果をみた試験では、ラロキシフェンを投与しても子宮内膜癌の発症に影響を及ぼさなかった。しかし、閉経後の女性を対象にラロキシフェンが乳癌に対して抑制効果があるか否かを判定する疫学的試験においては、ラロキシフェンは乳癌のみならず、子宮内膜癌の発生リスクを減少させたという報告がなされた。そこで、今回、子宮内膜癌の細胞株である Ishikawa 細胞を用いて、ラロキシフェンのアポトーシス誘導能とその誘導経路について詳細に検討した。 《方 法》 Ishikawa 細胞の ER α および ER β の発現を Real-time RT-PCR 法により確認した。その Ishikawa 細胞に対して、0 から 100 μ M の濃度の範囲でラロキシフェンを添加し、24 および 48 時間後の細胞生存率を解析した。Hoechst 33342 および TUNEL 染色を行い、細胞死を形態学的な観点から解析した。哺乳類の細胞において起こるアポトーシスには、Death receptor を介するものとミトコンドリアを介する2つ経路が提唱されている。Death receptor 経路では Caspase-8 が、ミトコンドリア経路では Caspase-9 が実行因子として活性化し、両者の経路は最終的に Caspase-3 を活性化し、結果としてアポトーシスが惹起される。これらの事実から Caspase-3, 8 および 9 活性をまず測定し、アポトーシス誘導経路解析の方向づけをした。引き続き、ミトコンドリア膜電位 (JC-1 蛍光色素法)、サイトゾール画分のチトクロームc濃度 (ELISA 法) および Bid の限定分解 (ウエスタンブロット法) を解析した。また、ラロキシフェンを処置した細胞に Caspase-3, 8 および 9 に対する特異的阻害剤を添加して、細胞生存率の回復を検討した。	

《結果》

- 1) 細胞生存率: ラロキシフェン添加 48 時間後において、 $20 \mu\text{M}$ 以上の濃度で有意に細胞生存率が低下した。この結果より、以降の実験ではラロキシフェンを 20 および $40 \mu\text{M}$ の濃度で 24 時間ないしは 48 時間処置した Ishikawa 細胞を用いて、種々のアポトーシスのパラメーターについて検討した。
- 2) 形態学的観察: Hoechst 33342 蛍光染色では、ラロキシフェンを処置した細胞において、半月様の核、核の凝縮や断片化、アポトーシス小体が観察された。TUNEL 染色では、 $20 \mu\text{M}$ 以上の濃度で有意に陽性細胞数の増加が認められた。
- 3) Caspase 活性: Caspase 活性は、24 時間後では $40 \mu\text{M}$ 、48 時間後では $20 \mu\text{M}$ 濃度においても Caspase-3、8 および 9 の有意な活性の上昇を認めた。Caspase-3 および 9 活性の上昇が示されたことより、ミトコンドリア経路によるアポトーシスが示唆された。
- 4) ミトコンドリア膜電位およびチトクローム *c* 蛋白濃度: ラロキシフェンを処置した細胞において、ミトコンドリア膜電位の有意な低下が観察された。ミトコンドリア膜電位の低下はミトコンドリア内のチトクローム *c* の放出をもたらすことから、次にサイトゾール画分のチトクローム *c* 蛋白濃度を測定した。その結果、チトクローム *c* はラロキシフェン処置の細胞で有意な上昇を認め、ミトコンドリアから細胞質へのチトクローム *c* の放出があることが示された。
- 5) Bid 限定分解の有無: Caspase-8 活性が上昇していたことから、Caspase-8 が Bid を限定分解してミトコンドリア経路を立ち上げることも報告されていることより、次に Bid の限定分解の有無についてウエスタンブロット法で確認した。 $20 \mu\text{M}$ のラロキシフェン添加の 48 時間後において、Bid の限定分解は認められなかった。
- 6) Caspase 阻害実験: ラロキシフェンを処置した Ishikawa 細胞に、同時に Caspase-3、8 および 9 に対する特異的阻害剤を添加して、細胞生存率を測定した。その結果、Caspase-3 および 9 の阻害剤ではラロキシフェン誘導の細胞死は有意に抑制された。しかしながら、Caspase-8 の特異的阻害剤では、細胞死の抑制は示されず、細胞生存率の回復は認められなかった。

《結語》

ヒト子宮内膜癌由来の Ishikawa 細胞に対して、ラロキシフェンを処置した結果、Caspase-3 および 9 の活性が上昇し、ミトコンドリア膜電位が低下し、さらにサイトゾール画分のチトクローム *c* の放出が認められ、ついで Caspase-9、Caspase-3 が活性化され、アポトーシスが誘導されたものと考えられた。これらの事実より、ラロキシフェンで誘導されるアポトーシスはミトコンドリア経路を介するものと示唆された。また、Caspase-8 活性が上昇を示したが、Bid の限定分解が示されなかったことより、Caspase-8—Bid を介したミトコンドリア経路は関与していないものと考えられた。さらに、Caspase-8 の特異的阻害剤を用いてもラロキシフェン誘導の細胞死を抑制できなかったことから、本薬剤により誘導されるアポトーシスに Caspase-8 の関与は低いものと考えられた。

《考察》

閉経後の女性に対するラロキシフェンのヒト疫学データでは、子宮内膜癌の発生リスクを抑制することが示唆されている。この疫学データと考え合わせると、ラロキシフェンはヒト子宮内膜癌に対して、ミトコンドリア経路を介したアポトーシスを誘導し、発生した子宮内膜癌に対しても抗腫瘍効果を発揮する可能性が強く示唆された。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	森 鳩 祥 子
論文審査担当者		主 査 教 授 大 槻 勝 紀	
		主 査 教 授 大 道 正 英	
		副 査 教 授 林 秀 行	
		副 査 教 授 谷 川 允 彦	
		副 査 教 授 芝 山 雄 老	
主論文題名			
<p>Raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, induces mitochondria-mediated apoptosis in human endometrial carcinoma cells (選択的エストロゲン受容体調節薬であるラロキシフェンのヒト子宮内膜癌に対するミトコンドリア経路を介したアポトーシス誘導能)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>申請者は、子宮内膜癌細胞株である Ishikawa 細胞を用いてラロキシフェンに対するアポトーシス誘導能とその誘導経路について明らかにした。ラロキシフェンは選択的エストロゲン受容体調節薬で、閉経後の骨粗鬆症治療薬として用いられている。作用機序はエストロゲン受容体に結合し、組織選択的に標的遺伝子の転写を促進あるいは抑制することによって、組織特異的作用を示す。閉経後の女性を対象にラロキシフェンが乳癌に対して抑制効果があるか否かを判定する疫学的試験において、ラロキシフェンは乳癌のみならず、子宮内膜癌の発生リスクを減少させたという報告がなされている。</p> <p>そこで申請者は、まず Ishikawa 細胞がエストロゲン受容体を発現していることを確認し、次いでラロキシフェン添加による細胞生存率への影響について検討した。ラロキシフェン添加 48 時間後では、20 μ M 以上の濃度で有意に細胞生存率が低下した。この結果に基づいて、20 μ M ならびに 40 μ M 濃度のラロキシフェンを添加して種々のアポトーシスについてのパラメーターを解析した。その結果、形態学的には核の断片化やアポトーシス小体が観察された。さらに、TUNEL 陽性のアポトーシス細胞の増加、Caspase-3,8 および 9 の活性の上昇、ミトコンドリア膜電位の低下およびミトコンドリアから細胞質へのチトクローム c の放出が認められ、ミトコンドリア経路を介するアポトーシスであることが示唆された。ラロキシフェン添加により Caspase-8 の活性が上昇したが、Caspase-8 の阻害剤を用いてもアポトーシスが抑制できなかったことから、本薬剤による誘導されるアポトーシスにおいては Death receptor 経路の関与は少ないと考えられた。</p> <p>本研究においてラロキシフェン投与はヒト子宮内膜癌細胞に対してミトコンドリア経路を介したアポトーシスを誘導することが明らかとなり、子宮内膜癌に対しても抗腫瘍効果を発揮する可能性が示唆された。</p> <p>以上により、本論文は本大学大学院学則第 11 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p>			
(主論文公表誌)			
Medical Molecular Morphology 41(3): 132-138, 2008			