

平成 19年 2月

牧野晴彦 学位論文審査要旨

主 査 清 水 英 治
副主査 河 合 康 明
同 長谷川 純 一

主論文

緑膿菌クオラムセンシング分子ホモセリンラクトンの肺癌細胞増殖への影響

(著者：牧野晴彦、千酌浩樹)

平成 19年3月 米子医学雑誌 掲載予定

学 位 論 文 要 旨

緑膿菌クオラムセンシング分子ホモセリンラクトンの肺癌細胞増殖への影響

クオラムセンシング機構とは生体内で菌が自らの数が優位な状況になったということを感じ、病原因子の発現をいっせいに開始するシステムである。日和見感染者において種々の感染症を引き起こす緑膿菌は自己誘導物質 (autoinducer) としてホモセリンラクトン誘導体の一種であるN-3-oxododecanoyl homoserine lactone (3-O-C12 HSL) を生成しているが、最近この物質が宿主生体細胞に対して様々な生体反応を引き起こしていることが報告されている。本研究ではこの緑膿菌の生成するクオラムセンシング分子が肺癌細胞に与える影響を検討した。

方 法

肺癌細胞としてA549細胞とMa-10細胞を用いた。両肺癌細胞に各濃度の3-O-C12 HSL 処理を行い、cell counting kit 8を用いて吸光度を測定し、肺癌細胞に対する増殖抑制効果を検討した。又、両細胞を100 μ Mの3-O-C12 HSL で処理した後、Azami-Green染色とPI染色を行いフローサイトメトリーにてアポトーシスへの3-O-C12 HSLの影響を検討した。各濃度の3-O-C12 HSL で処理した肺癌細胞をPI染色し、フローサイトメトリーにてDNA含有量を測定し細胞周期に与える影響を検討した。続いて癌抑制遺伝子であるp53遺伝子応答配列とルシフェラーゼ遺伝子を含むレポータープラスミドをトランスフェクションした肺癌細胞を各濃度の3-O-C12 HSL処理後、ルシフェラーゼ発光量を測定することでp53活性に与える影響を検討した。3-O-C12 HSLの肺癌細胞の細胞周期への影響を検討するために、G1-S期の細胞周期移行制御蛋白の発現と癌抑制遺伝子であるRb蛋白のリン酸化状態についてwestern blot を行い、同様にサイクリンD3のmRNA発現への影響を調べるためにリアルタイムPCRを行った。

結 果

3-O-C12 HSLは濃度依存的に肺癌細胞の細胞増殖を抑制した。50%阻害濃度はA549細胞では60 μ M、Ma-10細胞では40 μ Mであった。3-O-C12 HSLはMa-10細胞では顕著なアポトーシス誘導を引き起こしたが、A549細胞では誘導せず、両細胞においてG1期での細胞周期の停止を引き起こした。3-O-C12 HSLはアポトーシスと細胞周期停止作用を持つ癌抑制遺伝子であ

るp53活性には影響を与えないが、Rb蛋白の脱リン酸化を引き起こすこととサイクリンD3蛋白の発現抑制を引き起こすことが示され、これはmRNAレベルでのサイクリンD3の発現抑制によることが示唆された。

考 察

緑膿菌クオラムセンシング分子である3-0-C12 HSLは、いままで乳癌細胞や大腸癌細胞に対して細胞増殖抑制効果をもつことは報告されているが、緑膿菌感染と临床上最も合併する可能性の高い肺癌については、その影響は未だ検討されていなかった。本研究は、3-0-C12 HSLが、サイクリンD3のmRNAレベルでの発現抑制とRb蛋白の脱リン酸化を引き起こし、細胞周期をG1期で停止することによって肺癌細胞に対して増殖抑制効果を持つことを見出した。G1期細胞周期停止を誘導する複数の分子が、現在抗癌薬として臨床にも応用されている。今後その高い50%阻害濃度や正常生体細胞に与える影響などが問題になると考えられるが、今回使用された3-0-C12 HSLはその構造学的違いにより生体細胞に与える影響が異なってくる事が報告されている。つまり、その構造改変により強い細胞増殖抑制効果を付加できれば、3-0-C12 HSLが新たな抗癌薬となりうる可能性は高く、今後の検討課題である。

また従来3-0-C12 HSLが好中球や乳癌細胞に対してアポトーシスを誘導することが報告されているが、その機序は未だ明かでない。今回の研究において3-0-C12 HSLはMa-10肺癌細胞に対してはアポトーシスを誘導したが、A549肺癌細胞にはアポトーシスを誘導しなかった。このことより3-0-C12 HSLは肺癌細胞において少なくとも2ヵ所以上の作用点を持つことが推察される。その作用点が何であるのか、またそれらに影響を与える分子、すなわち3-0-C12 HSLのヒト細胞内レセプターが何であるのか今後の精力的な解析が必要である。

結 論

本研究では緑膿菌クオラムセンシング分子である3-0-C12 HSLが、ヒト肺癌細胞に対して細胞増殖抑制効果を示し、その機序として新たにサイクリンD3のmRNAレベルでの発現抑制とRb蛋白の脱リン酸化に引き続くG1期での細胞周期停止が示唆された。今後その作用機序のさらなる解明とともに、3-0-C12 HSLそのものあるいはその誘導体による抗腫瘍効果の検討が必要であると考えられる。