



Proliferating cell nuclear antigen as a predictor of therapeutic effect of continuous 5-fluorouracil administration in gastric cancer

岩谷, 慶照

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1999-12-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2024

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002024>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	岩谷慶照（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博い第1243号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成11年12月31日
学位論文題目	Proliferating cell nuclear antigen as a predictor of therapeutic effect of continuous 5-fluorouracil administration in gastric cancer （胃癌に対する5-FU持続投与下の効果指標因子としての Proliferating cell nuclear antigen の検討）
審査委員	主査 教授 黒田嘉和 教授 尾原秀史 教授 杉村和朗

論文内容の要旨

（はじめに）

ヒト胃癌細胞株である MKN28, MKN45および MKN74の3株を用いて, 5-fluorouracil (5-FU) の低濃度での持続接触と高濃度での短時間接触におけるヒト胃癌細胞株での Proliferating cell nuclear antigen (以下, PCNA) 発現の経時的変化, 増殖抑制効果および細胞回転の変化を PCNA-DNA の double stain による Flow cytometry の手技を用いて検討し, 併せて PCNA-mRNA の発現を Northern blot 法を用いて検討した。

（材料と方法）

上記ヒト胃癌細胞株3株を, 各々10%非働化ウシ血清含有 RPMI 1640培地を使用し, 37℃, 5%CO₂ の条件で24時間培養後, 5-FU の接触を開始し, 1.0μg/ml の濃度で120時間の接触を行ったものを低濃度での持続接触群, 10倍濃度の10.0μg/ml の濃度で1/10時間の12時間の接触を行ったものを高濃度での短時間接触群とし, 5-FU の総投与量を一定にした。5-FU の接触開始後24時間, 72時間および120時間の時点で細胞を回収し, ヘモサイトメーターを用いた trypan blue exclusion 法により細胞増殖曲線を作成した。同時に, 対照群, 低濃度持続接触群および高濃度短時間接触群から各々10万個の細胞を抽出し fluorescence-isothiocyanate (以下, FITC) 標識の抗 PCNA 抗体と Propidium iodide (以下, PI) をもちいた PCNA-DNA の double stain を行い Flow cytometry により PCNA 発現と細胞回転の変化を解析した。PCNA 発現は PCNA 蛋白量を蛍光色素標識 beads を用いて作成した検量線から PCNA 蛋白に結合する蛍光色素数に変換し, その発現量を定量化した (単位として以下, MESF: molecules of equivalent soluble fluorochromes)。また, 5-FU の接触開始後24時間の時点での細胞から総量20μg の RNA を抽出し, PCNA-mRNA の発現を Northern blot 法を用いて検討した。

（結果）

5-FU の各胃癌細胞に対する増殖抑制率は, 接触開始後120時間において低濃度持続接触群では MKN28で88.9%, MKN45で91.8%, MKN74で85.5%, また高濃度短時間接触群では MKN28で88.1% MKN45で87.7%, MKN74で85.5%であり, 増殖抑制効果はすべての株においてほぼ同等であり,

低濃度持続接触群と高濃度短時間接触群との間においても有意差はみられなかった。

PCNA 発現については、低濃度での持続接触群において、接触前の PCNA 発現量（単位：MESF）が MKN28で 5.1 ± 0.7 、MKN45で 4.6 ± 0.7 、MKN74で 5.7 ± 0.9 であるのに対して接触開始後24時間では MKN28で 6.8 ± 0.5 、MKN45で 5.0 ± 0.9 、MKN74で 6.5 ± 0.6 、72時間では MKN28で 8.1 ± 0.3 、MKN45で 4.8 ± 0.8 、MKN74で 6.7 ± 0.8 と接触前に比べて高値であった。また、低濃度持続接触群における PCNA 発現量は高濃度短時間接触群が MKN28、MKN45、MKN74で各々接触開始後24時間で 5.6 ± 0.7 、 2.6 ± 0.9 、 5.8 ± 0.7 、72時間で 6.2 ± 0.7 、 3.3 ± 0.6 、 6.9 ± 0.5 であり、接触開始後早期では高濃度短時間接触群と比較して高値であった。また、接触開始後24時間における PCNA-mRNA の発現は低濃度持続接触群において最大であった。

細胞回転の解析では、5-FU の接触開始後24時間では低濃度持続接触群と高濃度短時間接触群とともに、lateG 1 期から S 期への集積がみられ、lateG 1 期から S 期における細胞数は G 2-M 期の細胞数に比べ 2-4 倍であった。しかし、MKN45では lateG 1 期へ集積し、S 期の細胞数は逆に減少した。

細胞周期と PCNA 発現との関係において、lateG 1 期と S 期における PCNA 発現量は接触開始後24時間までは、earlyG 1 期と G 2-M 期に比べて有意に高かったが、経時的に漸減する傾向にあった。earlyG 1 期と G 2-M 期における PCNA 発現量は、経時的に漸増する傾向にあった。

（考察）

今回の実験では、総投与量を等しくした 5-FU の低濃度持続投与と高濃度短時間投与において、胃癌細胞に対する増殖抑制効果はほぼ同等であるが、低濃度持続投与により lateG 1 期から S 期への集積がみられる場合は細胞一個あたりの平均 PCNA 発現量は増大することが示された。その理由として、lateG 1 期から S 期にかけての細胞回転の集積によるもの、earlyG 1 期と G 2-M 期における PCNA 発現量の増大とが考えられたが、各周期における細胞数を考えると主に lateG 1 期から S 期にかけての細胞回転の集積によるものが中心であるものと考えられた。また、5-FU の作用機序として、DNA の合成障害および RNA の機能障害の二つの機序が考えられており、DNA の合成障害は主に時間依存性、RNA の機能障害は主に濃度依存性であると云われている。PCNA-mRNA の発現が低濃度持続接触群において最大であったことは、高濃度短時間接触群では RNA の機能障害がおり PCNA-mRNA の発現が抑制された結果であると考えられた。

（まとめ）

以上より、5-FU の持続投与下での胃癌細胞における PCNA 発現の評価は、5-FU を用いた化学療法の抗腫瘍効果の細胞レベルでの判定に有効であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

（はじめに）5-fluorouracil（5-FU）は消化器癌化学療法時に最も汎用されている抗癌剤である。再発進行胃癌に対する 5-FU の投与方法としては低濃度持続あるいは高濃度急速静脈内投与の 2 通りが施行されている。一方、Proliferating cell nuclear antigen（以下、PCNA）は細胞回転および細胞増殖に関連した核内タンパク質としての有用性が報告されている。今回、ヒト胃癌細胞である MKN28、45および74の 3 株を用いて、5-FU の低濃度持続接触と高濃度短時間接触を行い、前述した臨床投与方法を *in vitro* にて再現した。さらに、ヒト胃癌細胞株での PCNA 発現の経時的变化、増殖抑制効果および細胞回転の変化を Flow cytometry により検討するとともに PCNA-mRNA の発現を Northern

blot法を用いて検討し、PCNAが5-FUによる抗腫瘍効果の判定予想因子として有用か否かを検討した。

（材料と方法）上記ヒト胃癌細胞株3株を24時間培養後、1.0 μ g/mlの濃度で120時間の接触を行ったものを低濃度持続接触群（continuous: C群）、1.0 μ g/mlの濃度で12時間の接触を行ったものを高濃度短時間接触群（bolus: B群）とし、5-FU接触後、経時的に細胞を回収し細胞増殖曲線を作成した。同時に、fluorescence-isothiocyanate（以下、FITC）標識抗PCNA抗体とpropidium iodide（以下、PI）を用いたPCNA-DNAのdouble stainを行いflow cytometryによりPCNA発現と細胞回転の変化を解析した。また、5-FUの接触を24時間の時点で細胞からRNAを抽出し、PCNA-mRNAの発現をNorthern blot法を用いて検討した。

（結果）5-FUの各胃癌細胞株に対する増殖抑制率は、接触後120時間でC群では85.5%–91.8%、B群ではそれぞれ85.5%–88.1%であり、増殖抑制効果はすべての株において同等で、両群間においても差を認めなかった。PCNA発現については、C群において、接触前のPCNA発現量（単位：MESF）がMKN28で 5.1 ± 0.7 、MKN45で 4.6 ± 0.7 、MKN74で 5.7 ± 0.9 であるのに対して接触開始後24時間では 6.8 ± 0.5 、 5.0 ± 0.9 、 6.5 ± 0.6 、72時間では 8.1 ± 0.3 、 4.8 ± 0.8 、 6.7 ± 0.8 と接触前に比べて高値であった。またB群のPCNA発現量はMKN28、MKN45、MKN74で各々接触開始後24時間で 5.6 ± 0.7 、 2.6 ± 0.9 、 5.8 ± 0.7 、72時間で 6.2 ± 0.7 、 3.3 ± 0.6 、 6.9 ± 0.5 であり、C群に対して低値であった。また、接触開始後24時間におけるB群のPCNA-mRNAの発現量はC群にくらべ低かった。細胞回転の解析では5-FUの接触開始後24時間および72時間においてすべての細胞においてC群とB群ともに、lateG1期からS期への集積がみられ、lateG1期からS期における細胞数はG2-M期の細胞数にくらべ2–4倍であった。

（考察）以上の結果より低濃度持続投与により細胞一個あたりのPCNA発現量が増大することが示された。その理由として、各周期における細胞数を考えると5-FU投与時のPCNA発現の増大はlateG1期からS期にかけての細胞回転の集積によることが中心であり、C群でのPCNA発現は5-FUによる細胞回転変化を良好に反映していることが示唆された。また、5-FUの作用機序として、DNAの合成障害およびRNAの機能障害の二つの機序が考えられており、DNAの合成障害は主に時間依存性、RNAの機能障害は主に濃度依存性であると云われている。PCNA-mRNAの発現がC群にくらべB群で低かったことは、B群ではRNAの機能障害がおりPCNA-mRNAの発現が抑制された結果であると考えられた。その結果、B群のPCNA発現量はC群に比して低値であり、B群のPCNA発現は必ずしも5-FUによる細胞回転変化を反映しているとは考えられなかった。

（まとめ）以上より、低濃度持続投与下では胃癌細胞におけるPCNA発現量は、5-FUを用いた化学療法における早期の抗腫瘍効果の判定に有効であることが示唆された。本研究はPCNAについて、その5-FU投与時の発現を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった胃癌化学療法時の細胞レベルでの抗腫瘍効果の評価におけるPCNAの有効性に重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。