



MCF-7 growth inhibition by ultraviolet radiation and 5-fluorouracil : the importance of treatment sequence

濱岡, 剛

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2001-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2325

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002325>

※ 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。



【101】

氏名・(本籍) 濱岡 剛 (高知県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学位記番号 博い第1339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13年3月31日

【学位論文題目】

**MCF-7 growth inhibition by ultraviolet radiation and 5-fluorouracil :
the importance of treatment sequence**

ヒト乳癌細胞株MCF-7に対する紫外線照射および
5-fluorouracil 投与併用による増殖阻害効果についての検討

審査委員

主査 教授 黒田 嘉和

教授 尾原 秀史 教授 杉村 和郎

目的

5-fluorouracil (5-FU)は放射線増感作用を有するいわれ、5-FUと放射線照射を併用することは、癌の治療戦略において重要な位置を占める可能性がある。しかし、5-FUの放射線増感作用における機序や、最も効果的な併用方法については確立されていない。今回我々はヒト乳がん細胞株MCF-7を用いて、その最も効果的な併用方法を探るため、それぞれの時点における5-FUと紫外線照射併用による細胞増殖抑制効果を検討した。AgNORs (argyrophilic nucleolar organizer regions) 染色における細胞核内のAgNOR ドット数は癌の悪性度を反映するといわれ、我々は以前より細胞のrRNA阻害によるAgNOR の凝集反応を報告してきた。今回5-FUの放射線増感作用の機序とrRNAとの関与を探るため、細胞増殖抑制作用とAgNORの形態学的変化との関連を検討した。

材料および方法

細胞培養：10%の加熱不活性化ウシ血清加T培地に、37°C、5%二酸化炭素-95%大気という環境下にて各群それぞれMCF-7 10⁴個をplatingした。

紫外線照射：310nmの紫外線ランプを用いて10分間室温下に照射した。(90J/m²)

細胞数測定：WSTアッセイを用いた。WSTアッセイはWST-1とよばれるテトラゾディウム塩と1-Methoxy PMSとよばれる溶媒を用いて吸光度で細胞数を定量する。

AgNORs染色：染色された細胞を、それぞれ600から800個検鏡し、AgNORが1つに凝集した数の割合を算定した。

実験モデル：MCF-7をplatingした後、それぞれ0、50、100、500 ng/mlの濃度の5-FUを含んだ培地に注入して、48時間インキュベートした。紫外線照射は、それぞれ5-FU曝露の開始点、中間点、終了点にて90 J/m²照射した。5-FU曝露終了後、5-FUを取り除いた培地にてさらに48時間インキュベートした。細胞量は5-FU曝露の直前、終了直後、終了48時間後の3点で行い、AgNORs染色は5-FU曝露終了48時間後にて行った。

結果

1、5-FUと紫外線照射併用効果

5-FU単独投与群に比較して、紫外線照射との併用群は強い細胞抑制を認めた。

2、5-FU曝露期間内における紫外線照射時期による効果

最も強い細胞抑制効果を示したのは5-FU曝露の開始点にて紫外線照射を行った群で、5-FU濃度100および500 ng/mlにて有意差を認めた。さらに前照射を行った5-FU濃度500 ng/mlの群においてのみ、5-FU曝露終了後も細胞は再増殖せず減少した。

3、AgNORs染色による細胞の形態学的変化

5-FU単独では濃度依存性にAgNORの凝集が強くなることが認められた。

紫外線単独ではAgNORの凝集に対する影響は認めなかった。

5-FU単独に比較して、5-FUに紫外線照射を追加した群で、5-FU濃度50および100 ng/mlにて明らかにAgNORの凝集が強いことが確認され、5-FU放射線増感作用の機序にrRNAの関与が示唆された。5-FU濃度500 ng/mlでは、5-FU単独でのAgNORの凝集能が強いため、有意差を認めなかった。

AgNORの凝集と照射のタイミングには関与を認めなかった。

考察

放射線増感作用についての報告は1960年代より、BUDR、IUDR、misonidazol等があるが、これらは正常細胞への毒性が強く、いずれも臨床応用されなかつた。近年、5-FUやtaxolが臨床応用可能な放射線増感剤として注目されている。我々は5-FUの放射線増感作用に着目し、臨床応用に向けてその機序と、至適併用方法を検討した。

5-FUの放射線増感作用の機序について、4つの仮説をたてることができる。

1、チミジンシンセターゼ (TS) の阻害に関連した機序

5-FUの細胞毒性の1つの機序として、DNAもしくはRNAの阻害を介するチミジンシンセターゼ (TS) の阻害があり、放射線によるDNA障害が、5-FUのTSによる細胞毒性を増強させる。また5-FU自身もTS活性を有するといわれ、高レベルのTS活性は5-FU耐性作用と関連していると言われており、放射線が5-FUのTS活性を下げるこによって結果的に細胞全体のTS活性を下げている可能性がある。

2、rRNAの阻害に関する機序

5-FUのrRNAに対する直接阻害作用が、放射線によって増強される。

今回の検討において、5-FU放射線増感作用の機序にrRNAの関与が示唆された。

3、修復酵素に関する機序

放射線DNA障害に対する修復酵素を5-FUが阻害する。

4、薬剤耐性に関する機序

放射線がMDR1遺伝子を不活性化することにより、5-FUに対する薬剤耐性を低下させる。

我々は以前よりAgNORs染色におけるAgNORの凝集と、細胞のrRNAとの関連性を報告してきた。今回5-FU濃度50、100 ng/mlにおいて、5-FUと紫外線照射併用のAgNOR凝集増強が観察された。紫外線はpolypyrimidine tract-binding proteinを介してRNAにクロスリンクを起こさせるという報告がなされており、rRNAにおけるピリミジンダイマーがmRNAに障害をおこすといわれている。今回のrRNAに対する障害はこういった機序の可能性もある。

今回の検討における至適併用方法は、5-FU投与の直前に紫外線照射を行うものが、最も細胞抑制効果を認めた。臨床での併用療法を行う際、5-FUに対する放射線の先行照射が最も効果がある可能性がある。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1343 号	氏名	濱岡 剛
論文題目	MCF-7 growth inhibition by ultraviolet radiation and 5-fluorouracil: the importance of treatment sequence ヒト乳癌細胞株 MCF-7 に対する紫外線照射および 5-fluorouracil 投与併用による増殖阻害効果についての検討		
審査委員	主査 黒田嘉和 副査 杉村和良 副査 尾原秀史		
審査終了日	平成 13 年 3 月 2 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

ヒト乳癌細胞株MCF-7に対する紫外線照射および5-fluorouracil投与併用による増殖阻害効果についての検討

抗癌剤 5-Fluorouracil(以下5-FU)は、頭頸部がんや直腸がんにおいて 放射線療法と併用することにより高い治療効果が得られる事が臨床的には知られている。しかし その作用機序はいまだ確立されておらず 5-FU投与と放射線治療の最適な時期の組み合わせも明らかになっていない。このため代表的ヒト乳癌培養株細胞MCF-7を用いて 5-FUを培地に加えるタイミングを紫外線照射の前後または同時にやってタイミングの違いによる変化を細胞増殖におよぼす影響と細胞を鍍銀染色しその染色パターンの変化を調べて評価した。細胞の鍍銀染色により リボソーマルRNAの障害が推定されることは 以前に種々のRNA阻害剤を用いた実験で報告している。特に5-FUによるリボソーマルRNAの障害は鍍銀染色によって染色される AgNOR- (銀親和性核小体形成体部位) が最終的に一つに凝集することも報告してきた。今回 培地に 0, 50, 100, 500 ng/ml の5-FUを添加した培地にてMCF-7細胞を48時間培養した。それぞれの濃度において 90 J/m² の紫外線を 5-FU 添加時 5-FU 培地終了時 およびその中間において照射した。5-FU 添加実験終了後 さらに 5-FU を含まない培地で 48 時間培養し細胞数と鍍銀染色のパターンを調べた。5-FU と紫外線照射は相乗的な細胞増殖抑制作用を認めた。比較的高い濃度の 5-FU (100, 500 ng/ml)においては最も大きな相乗効果は 5-FU 添加時に紫外線を照射した群で観察された ($P < 0.005$)。50, 100 ng/ml の比較的低濃度の5-FUにおいては 紫外線照射のタイミングは細胞増殖抑制に影響を与えたかったが 紫外線照射によってAgNORの凝集が促進された($P < 0.05$)。これらの結果より 紫外線照射は細胞のリボソーマルRNAの障害を低濃度の5-FU存在下では促進することが示唆された。比較的高濃度の5-FU曝露に際しては開始前に紫外線照射することによって 最も強い細胞増殖が得られることが判明した。

本研究は抗癌剤5-FUの投与時期と放射線療法の最適な組み合わせを調べる上で基礎となる機序の解析について モデルの作成を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかつたin vitroにおいて5-FUと紫外線照射の併用による細胞増殖抑制作用の機序の解析のための簡素なモデルを作成し統計学的に有意な結果を得られたという 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。