



Genistein enhances the cisplatin-induced inhibition of cell growth and apoptosis in human malignant melanoma cells

田村, 真吾

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-09-30

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2903

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002903>

※ 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。



【 76 】

氏 名・（本 籍） 田村 真吾 （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1536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15年9月30日

【 学位論文題目 】

Genistein Enhances the Cisplatin-induced Inhibition
of Cell Growth and Apoptosis in Human Malignant
Melanoma Cells

（ヒト悪性黒色腫細胞におけるシスプラチンによる細胞増殖
抑制とアポトーシス誘導に対するジェニスタインの増強作用）

審 査 委 員

主 査 教 授 錦織 千佳子

教 授 山村 博平

教 授 寺島 俊雄

大豆に含まれるイソフラボンである genistein は多くのヒトの悪性腫瘍に対しての増殖抑制効果が報告されてきた。Genistein は癌細胞増殖抑制に多彩な経路を介して関与していると考えられている。今回我々が実験に用いた転移性悪性黒色腫は化学療法に抵抗性の腫瘍で、現在治療に用いられている悪性黒色腫に対する数種のプロトコールでは、ある程度の効果は得られるものの全身的な副作用も併せ持つことより劇的な効果はほとんど期待できない。本研究においては、腫瘍細胞に genistein 処理を施すことにより、cisplatin 単独処理と比較して有為に高い腫瘍細胞の増殖抑制効果、最終的には悪性黒色腫細胞におけるアポトーシス誘導の増強が生じることを明らかにした。

Genistein の前処理は $20\mu\text{M}$ の濃度で 1 時間行った。アポトーシスに関する実験系においては genistein の前処理の後、cisplatin 処理を行ってから 12 時間もしくは 24 時間細胞培養を行い、また細胞増殖に関する実験系においては genistein の前処理の後、cisplatin 処理を行ってから 24 時間から 72 時間の細胞培養を行った。Genistein の細胞毒性については LDH とトリパンブルー染色法で評価し、細胞毒性域外の値を設定した。細胞増殖は非放射線性の MTS 法で、アポトーシスに関しては ELISA、フローサイトメトリーの 2 つの方法を用いて評価した。またアポトーシス関連遺伝子の蛋白の発現をウェスタンブロット法を用いて解析した。

Genistein は高濃度では細胞毒性をもつことが数種の細胞株において報告されているが、今回の実験において 5 種のヒト悪性黒色腫細胞を用い、細胞毒性域外の比較的濃度 ($20\mu\text{M}$) の genistein で腫瘍細胞に前処理を施すことで、cisplatin 単独処理群と genistein との併用処理群を比較した。併用処理群においては cisplatin 単独処理群と比較して有意に細胞の増殖が抑制されていた。またアポトーシスの誘導に関しても genistein と cisplatin 併用処理が有意にアポトーシスの誘導を増強させていることが分かった。Genistein はチロシンキナーゼ阻害作用を有している。一方 cisplatin や紫外線は直接 DNA に障害を起こすことによりアポトーシスを誘導していることが解明されている。今回、genistein 処理により DNA 障害によるアポトーシスを助長されたことより、チロシンキナーゼの阻害作用は DNA 障害を増強したことが示唆される。

抗アポトーシス蛋白の bcl-2 蛋白は色素細胞の維持に関して最も重要な蛋白

の 1 つであり、bcl-2 ノックアウトマウスでは完全に皮膚色の失われたマウスが生れてくることが明らかにされている。さらにヒト悪性黒色腫細胞においては bcl-2 蛋白が高頻度に発現していることが明らかにされており、bcl-2 蛋白はヒト悪性黒色腫細胞の発癌機序に関与しているとも考えられている。またもう 1 つの抗アポトーシス蛋白である bcl-xl 蛋白はヒト悪性黒色腫細胞において原発の細胞におけるものよりも転移巣の細胞に認められるものの方が強発現していることが明らかにされている。つまりヒト悪性黒色腫細胞における転移機序に関与していると考えられている。これらの抗アポトーシス蛋白の過剰発現がアポトーシスを誘導する薬剤への抵抗性に関わっていることが考えられる。Genistein 単独処理もしくは cisplatin 単独処理では bcl-2、bcl-xl 蛋白の発現に影響を与えなかったが、apaf-1 蛋白発現は数種の黒色腫細胞において微量ながら増強しているのが見られた。また genistein と cisplatin の併用処理では明らかに bcl-2、bcl-xl の蛋白発現を抑制し、一方 apaf-1 蛋白発現は増強させた。genistein と cisplatin の併用処理でアポトーシス前駆蛋白である apaf-1 蛋白の発現が増強したということは、genistein と cisplatin の併用処理群においてアポトーシスが助長されたという実験結果と一致していた。まとめると、genistein を cisplatin と併用して用いることでアポトーシスの誘導が増強する機序に関しては、bcl-2、bcl-xl の 2 つの抗アポトーシス蛋白の発現の抑制とアポトーシス前駆蛋白である apaf-1 蛋白の発現増加が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

アポトーシス誘導のさらなる機序を解明するため、細胞周期の停止に関わるサイクリン依存性キナーゼの阻害因子である p16、p21、p27 蛋白発現を検討した。その結果、genistein と cisplatin 併用処理において p21 と p27 蛋白の過剰発現が見られた。しかし、p16 遺伝子は多くのヒト悪性黒色腫細胞において変異もしくは欠損しており、今回用いた細胞株においても発現が認められなかった。今回用いた細胞株のように細胞周期の p16-cyclin D/cdk-pRbG1 チェックポイントに機能異常のあるものに関しては細胞増殖もしくは細胞死への誘導の調整には p27 が重要な役割を果たしていると考えられる。一方、多くの細胞において G1 期停止に p21 が中心的な役割を担っているのにも関わらず、アポトーシスの誘導に p21 が直接関与しているかについては未だ不明である。現時点においては、genistein と cisplatin の併用処理で p21 と p27 の蛋白発現誘導されることが、細胞増殖の抑制に大きく関与していると考えられるが、その役割とさらなる機構の解明は今後の課題である。結論として、genistein で前処理することにより cisplatin によって誘導さ

れるアポトーシスが助長されることが明らかにされた。今後の研究課題として、ヌードマウスにヒト悪性黒色腫細胞を移植し、in vivo において同様の結果が得られるか、また genistein と cisplatin の併用処理による bcl-2、bcl-xL 蛋白の発現の減少、apaf-1 蛋白の発現の増強の機序解明などが残されている。

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 1537 号	氏名	田村 真吾
論文題目	Genistein Enhances the Cisplatin-induced Inhibition of Cell Growth and Apoptosis in Human Malignant Melanoma Cells ヒト悪性黒色腫細胞におけるシスプラチンによる細胞増殖抑制とアポトーシス誘導に対するジェニステインの増強作用		
審査委員	主 査 錦織 千恵子 副 査 山 村 正 平 副 査 寺 島 俊 雄		
審査終了日	平成 15 年 8 月 21 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

大豆に含まれるイソフラボンである genistein は癌細胞増殖抑制に多彩な経路を介して関与していると考えられており、多くのヒトの悪性腫瘍に対しての増殖抑制効果が報告されてきた。転移性悪性黒色腫細胞は化学療法に抵抗性で、現在治療に用いられている悪性黒色腫に対する数種の化学療法のプロトコールでは、ある程度の効果は得られるものの全身的な副作用も併せ持つことより劇的な効果はほとんど期待できない。本研究において我々は、培養悪性黒色腫細胞を用いて genistein の抗腫瘍効果を細胞増殖抑制とアポトーシス誘導に関して検討した。
従来 cisplatin は悪性黒色腫に対し用いられてきた抗癌剤である。本研究では 5 株の培養悪性黒色腫細胞を用いて、genistein の前処理が cisplatin の抗腫瘍効果に対してどのような影響を及ぼすかに関し、細胞増殖抑制とアポトーシス誘導の観点から解析を行った。
①細胞増殖に関しては、MTS 法を用いて解析を行い、cisplatin 単独処理群と genistein との併用処理群を比較したところ、併用処理群においては cisplatin 単独処理群と比較して有意に細胞の増殖が抑制された。
②アポトーシスの誘導に関しても ELISA、フローサイトメトリーで解析し、genistein と cisplatin 併用処理が有意にアポトーシスの誘導を増強させた。
③アポトーシス関連蛋白である bcl-2、bcl-xL、apaf-1 の蛋白発現の解析を行った。抗アポトーシス蛋白の bcl-2 蛋白と bcl-xL 蛋白はヒト悪性黒色腫細胞において高頻度に発現していることが明らかにされているが、今回用いた培養悪性黒色腫細胞は転移性の悪性黒色腫細胞でも bcl-2、bcl-xL 蛋白を強発現しており、genistein と cisplatin の併用処理により、アポトーシス抑制に働く bcl-2、bcl-xL の蛋白発現が明らかに抑制され、一方アポトーシス前駆蛋白である apaf-1 蛋白発現が増強した。
④細胞周期の停止に関わるサイクリン依存性キナーゼ阻害因子である p16、p21、p27

蛋白発現を検討した。その結果、genistein と cisplatin 併用処理において p21 と p27 蛋白の過剰発現が見られた。p16 遺伝子は多くのヒト悪性黒色腫細胞において変異もしくは欠損しており、今回用いた細胞株においても発現が認められなかった。
今回の実験の結果、genistein と cisplatin を併用処理された細胞群では抗アポトーシス蛋白である bcl-2、bcl-xL の蛋白発現が抑制されており、これらの抗アポトーシス蛋白を抑制することによりアポトーシスを誘導しているということが明らかになった。
サイクリン依存性キナーゼの阻害因子である P16、P21、P27 蛋白は G1 期、あるいは G ₁ 、M 期において細胞周期の進行を負に制御する因子である。今回の実験結果で明らかにされたように、genistein と cisplatin の併用処理された細胞群では細胞周期の G ₁ 、M 期において細胞周期の進行を負に抑制する p21、p27 蛋白の発現を増強させることにより細胞周期を停止し、細胞増殖抑制に働いていると考えられる。
今回のような p16 蛋白に機能異常のあるものに関しては細胞増殖もしくは細胞死への誘導の調整には p27 が重要な役割を果たしていると考えられるが、今回の結果で genistein と cisplatin を併用処理された細胞群ではアポトーシスの誘導と p27 だけでなく p21 蛋白の発現の増強が同時に認められたことから、p21 蛋白のアポトーシスへの関与も示唆される。
本研究は悪性黒色腫細胞に genistein 処理を施すことにより、cisplatin 単独処理と比較して有為に高い腫瘍細胞の増殖抑制効果が得られることを明らかにし、その機序として悪性黒色腫細胞におけるアポトーシス誘導の増強が生じることを示唆した研究であるが、従来ほとんど行われてなかった cisplatin の apoptosis 増強効果について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。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。