Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

# Mechanism of inhibitory action of prostaglandins on the growth of human gastric carcinoma cell line KATO III

中村，晃

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1992-03-21
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙1637
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001637

※ 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）　中村（なかむら）　晃（あきら）　（兵庫県）

博士の専攻分野の名称　博　士（医学）

学位記番号　博ろ第1307号

学位授与の要件　学位規則第4条第2項該当

学位授与の日付　平成4年3月21日

学位論文題目　Mechanism of inhibitory action of prostaglandins on the growth of human gastric carcionma cell line KATOⅢ
**（ヒト胃癌培養細胞KATOⅢの増殖に及ぼす各種 Prostaglandin の影響並びにその作用機序についての検討）**

審査委員　主査　教授　千葉　勉
教授　斎藤洋一　教授　前田　盛

## 論文内容の要旨

**［緒言］**

Prosatglandin（PG）は，胃に多量に存在し胃粘膜保護作用等重要な生理作用を有している。一方PGは，種々の癌細胞の増殖にも影響を及ぼすことが報告されており，我々も$PGE_2$及び$PGF_2\alpha$がヒト胃癌培養細胞KATOⅢの増殖を抑制し，その機序として細胞内cAMPの増加が関与する可能性があることをすでに報告している。またPGの増殖抑制の機序についての検討は近年さかんに行なわれているが，細胞増殖抑制と細胞内cAMPとの関係については，諸論があり，定説を得ていない。そこで我々は，KATOⅢ細胞の増殖におけるPGの作用並びにその機序について，細胞内情報伝達機構特に細胞内cAMP産生機構を中心に詳細に検討を加えた。

**［方法］**

ヒト胃癌培養細胞KATOⅢ（$2\times10^4$cells／well）を culture plate 中で5％FCS加 RPMI1640medium にて培養した。培養一日目及び連日に$PGE_2$，$PGE_1$，$E_1$誘導体17S：20-dimethyl-6-oxoPG $E_1$-methyl ester（ornoprostil），及び$PGF_2\alpha$を投与し，8日目までの増殖曲線を検討した。同様に dbcAMP（$10^{-4}$M），RPcAMP（$10^{-6}-10^{-8}$M），forskolin（FK）（10-5M），histamine（$10^{-4}$M），gastrin（$10^{-8}$M），carbachol（$10^{-4}$M）の効果も検討した。一方細胞内 cyclicAMP（cAMP）の産生は，$1.5\times10^6$cells／tubeの細胞にIBMX（$10^{-4}$M）存在下に種々の物質を加え，15分間インキュベートした後5％TCAで抽出し，cAMPをRIAにて測定した。さらにイノシトールリン脂質代謝回転への影響を検討する為に，$^3$H－inositolで細胞を24時間プレラベルした後$2\times10^6$cells／

tubeの細胞にLiCl（10mM）存在下で種々の物質を加え60分間インキュベートした後，反応をクロロホルム：メタノール（1：2）で停止させ，合成された$^{3}$H－inositol phosphates（IPs）をDowex-Resinにて抽出分離した。また細胞内遊離$Ca^{2+}$は，$Ca^{2+}$特異的結合物質Fura－2を用いて行った。即ちKRBG buffer中でKATOⅢ細胞$10^{6}$コを$10^{-5}$M Fura－2と共に37℃で30分間インキュベートし，このFura－2負荷KATOⅢ細胞浮遊液を37℃で撹拌しつつ，蛍光分光度計（CAF－100）を用い励起波長350，385nm，蛍光波長500nmの条件下で$Ca^{2+}$Fura－2 complexの特異的蛍光強度比を測定し，［$Ca^{2+}$］は，［$Ca^{2+}$］＝Kd（R－Rmin／Rmax－R）（Fmin385／Fmax385）の式を用いて算出した。次に以上の様な細胞cAMPの増加反応にPG receptorを介した促進性G蛋白質の関与が考えられた為，PG投与による膜のadenylate cyclase（AC）活性並びにGTPase活性を測定した。AC活性は，KATOⅢ細胞の膜蛋白40μgを種々のPGと共にATP存在下で15分間インキュベートし，ATPより合成されたcAMPをRIAにて測定した。またGTPase活性は膜蛋白40μgを種々のPG及び$^{32}$P－GTPと共に10分間インキュベートし，分解されて遊離した無機の$^{32}$Pをカウントし求めた。

［結果］

種々のPGの初日及び連日投与により，KATOⅢ細胞の増殖は同程度に抑制された。そしてその作用は，いずれにおいても，$PGE_2$，$E_1$，ornoprostil，$PGF_2\alpha$の順に強力であった。これに加えてACを直接活性化するFK並びにdbcAMPの投与によっても，KATOⅢの増殖は明らかに抑制された。さらにprotein kinase A inhibitorであるRpcAMPの投与により$PGE_2$による増殖は濃度依存的に抑制された。これに対しcarbachol，gastrin，histamineはいずれも増殖抑制効果を認めなかった。一方種々のPGはいずれもcAMP合成を濃度依存的に促進し，その作用は$PGE_2$，$PGE_1$，ornoprostil，$PGF_2\alpha$の順であった。しかしながら，このPGによるcAMP反応はPG存在下で長期培養した細胞においては，まったく認められなかった。これに加えて，FKによりcAMP合成反応は促進されたが，histamineによる促進はみられなかった。またこれらのcAMP合成反応にGTP結合蛋白が関与しているか否かを，各種PG投与によるAC及びGTPase活性について検討したが，各種PGは，GTP存在下においてのみAC活性を上昇させ，その強さは$PGE_2$，$E_1$，ornoprostil,$F_2\alpha$の順であった。これに加えて$PGE_2$によるAC活性はGTP濃度依存性に上昇した。同様に各種PGによりGTPase活性は上昇しその強さはcAMP反応，AC活性と同様，$PGE_2$，$PGE_1$，ornoprostil，$F_2\alpha$の順であった。次にもう一方のsecond messengerであるPI代謝回転及び細胞内Ca濃度を検討したところ，種々のPGはこれらに全く影響を及ぼさなかった。

［考察］

我々は，以前より胃において，内因性のオータコイドとして知られている$PGE_2$及び$PGF_2\alpha$がヒト胃癌培養細胞株KATOⅢの増殖を抑制しその機序として細胞内cAMPの増加の関与を報告してきた。今回我々は，これらPGに$PGE_1$及び$E_1$の誘導体であるornoprostilを加えて，細胞増殖抑制効果並

びにその機序について細胞に検討した。その結果，各種PGの細胞増殖抑制効果の程度とcAMP合成の程度は，ほぼ相関した。これに加えてわれわれはPGによるcAMP合成反応がGTP結合蛋白を介した反応か否かを検討する目的でKATOⅢ細胞の膜分画を用いて，GTP存在下の膜のAC活性及び GTPase 活性について検討したところ，各種PGはGTP存在下のみ膜のAC活性を上昇させ，しかもその順序はcAMP合成反応と同時$PGE_2$，$PGE_1$，ornoprostil，$PGF_2\alpha$の順であった。同様に各種PGは膜の GTPase 活性を上昇させその順序は，cAMP及びAC活性と同様であった。これらの事実は，PGによるcAMP合成反応に膜の receptor と連関したGTP結合蛋白の関与が考えられた。さらに本細胞は，ACを直接活性化させるFK及び dbcAMP の直接投与によっても増殖を抑制したが，cAMP増加作用のない histamine では，影響を受けなかった。一方各種PGは本細胞のPI代謝回転並びに細胞内$Ca^{2+}$濃度には全く影響を及ぼさなかった。以上の成績は，各種PGによるKATOⅢ細胞の増殖抑制に細胞内cAMPの増加が関与している可能性を示唆させるものである。従来種々の細胞でPGが，cAMP産生を増加させる事実はよく知られており，またcAMPの増加が増殖抑制効果をきたすという報告も多い。今回の成績はこのような成績と合致するものであり，各種PGによる細胞の増殖抑制とcAMP，AC及び GTPase の上昇の程度がほぼ同じである事，また protein kinase A の inhibitor として知られている RpcAMP が，$PGE_2$によるKATOⅢ細胞の増殖抑制効果を阻止した事は，cAMPの上昇と細胞増殖抑制が関係している可能性をさらに強く示唆させるものである。また，今回得られた成績で興味深い事として，$PGE_2$の初日投与により，連日投与とほぼ同程度に，増殖抑制効果がみられたが，このことは，PG投与1日目に細胞内に起こった変化が，増殖抑制に非常に重要な意義を持つ事を示唆している。この事は，PGによるcAMP上昇反応が，PG長期負荷時には見られず，初日投与時のみに見られる事実と合致し，細胞増殖抑制に一日目の細胞内cAMP上昇反応が極めて重要な役割を果たしていることを意味している。いずれにしても，胃に多量に存在しオータコイドとして知られているPGが，胃癌の増殖を抑制する事は胃の機能におけるPGの役割に新しい知見を加えるものであり，今後，PGが臨床的にも胃癌の治療薬として用いられる事が期待される。

## 論文審査の結果の要旨

近年，胃において重要な生理作用を有しているガストリン，CCK等消化管ホルモンが胃癌の増殖に影響を及ぼしている事実が明らかとなってきた。一方，内因性の胃粘膜防御因子として重要なプロスタグランジン（PG）が，正常胃粘膜細胞の増殖に影響を与えることも明らかにされてきた。しかしながら，PGの胃癌の増殖に及ぼす影響を検討した成績は少なく，またその作用機序についても十分明らかではない。そこで本研究者は，ヒト胃癌培養細胞株KATOⅢを用いて種々のPGの癌細胞増殖に及ぼす効果並びにその機序を詳細に検討した。

本研究ではまず各種PGがKATOⅢ細胞の増殖を明らかに抑制すること，さらに同時に細胞内cAMPの合成を強く促進することが明らかになった。加えてPGは膜のアデニレートサイクレース（AC）活性と GTPase 活性をともに容量反応的に亢進させた。一方各種PGはKATOⅢ細胞のPI代謝回転や

細胞内$Ca^{2+}$濃度には影響を与えなかった。以上よりPGによる増殖抑制にcAMPの増加が関与している可能性が考えられた為，次に dbcAMP 並びにACを直接活性化するフォルスコリンの影響を検討したところ，これらはともにKATOⅢ細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。さらにプロティンキナーゼAを抑制する RpcAMP を投与したところ$PGE_2$による増殖抑成は解除された。これらの成績はPGによるKATOⅢ細胞の増殖抑制に細胞内cAMPが関与している可能性を強く示唆するものである。事実，PGによる細胞増殖抑制の程度は$PGE_2$，$PGE_1$，17S；20-dimethyl-6-oxo$PGE_1$-methyl ester，$PGF_2\alpha$の順に強かったが，この順位は，cAMPの合成促進，ACの活性化，GTPase活性の強さの順位とすべて同一であった。また$PGE_2$による増殖抑制の程度は一日投与と連日投与の間で差はみられなかったが，cAMPの増加は一日目の投与によってのみ生じ，それ以降の$PGE_2$投与では認められなかった。本研究では，さらにPI代謝回転を亢進させる他の消化管ホルモンや生理活性物質の効果も検討したが，それらはKATOⅢ細胞の増殖にはほとんど影響しなかった。

従来種々の細胞でPGがcAMP産生を増加させることはよく知られており，また細胞内cAMPの増加が増殖抑制をきたすという報告も多い。本研究はこれらの結果と合致するものであり，さらに増殖抑制機序におけるcAMP産生系の役割をより詳しく検討し，その機序を明らかにしたものとして意義深い。以上本研究は胃癌の増殖抑制について，その細胞内の機序を研究したものであるが，従来ほとんど行なわれなかったPGによる癌細胞増殖抑制について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。