The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Cytokines Prevent Dexamethasone-induced Apoptosis via the Activation of Mitogen-activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathways in a New Multiple Myeloma Cell Line
Author(s)	小川, 愛
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42821
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名	小川　愛（おがわ　めぐむ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　15866　号
学位授与年月日	平成13年2月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Cytokines Prevent Dexamethasone-induced Apoptosis via the Activation of Mitogen-activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathways in a New Multiple Myeloma Cell Line （サイトカインによるデキサメサゾン誘導アポトーシスの阻害機構の研究 ―新規骨髄腫細胞株におけるMAPK系、PI-3K系を中心とした解析―）
論文審査委員	（主査） 教授　松澤　佑次 （副査） 教授　北村　幸彦　　教授　金倉　譲

論文内容の要旨

〔目的〕

多発性骨髄腫は、骨髄微小環境において骨髄ストローマ細胞が産生する各種サイトカインにより増殖・生存を調節されており、種々の抗腫瘍剤に抵抗性を示すことが知られている。この治療抵抗性の機構を解明することは、骨髄腫の新しい治療法開発に大変有用である。

今回私は、当教室で新規に樹立したヒト骨髄腫細胞株OPM-6を用いて、Dexamthasone（DEX）に代表される抗腫瘍剤による細胞死と、各種サイトカインとの相互作用やその分子機構について解析し、骨髄腫の治療抵抗性の機構について検討した。

〔方法ならびに成績〕

1）骨髄腫細胞株OPM-6の樹立とその性状

IgG-κ型形質細胞性白血病患者末梢血より単核球を分離し、10%FCS加RPMI1640培養液中で20週培養後、自立性増殖を認める骨髄腫細胞株OPM-6を樹立した。OPM-6の増殖機構については、(1) ノザンブロットによるInsulin-like growth factor-1（IGF-1）mRNAの発現、(2) 細胞表面でのIGF-1 receptorの発現、(3) IGF-1添加による細胞増殖の促進、(4) 抗IGF-1 receptor抗体添加による細胞増殖の著明な抑制を認めたことより、OPM-6にはIGF-1 autocrine機構が存在していると考えられた。

2）Dexamethasone（DEX）によるapoptosisの誘導とその分子機構

代表的な治療薬であるDEXをOPM-6に添加すると、濃度依存性に生細胞数が低下し、これがapoptosisによることを、Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling（TUNEL）法と、フローサイトメトリー法によるAnnexin-Vの発現にて確認した。さらに、抗IGF-1 receptor抗体存在下では、DEX添加後36時間以内に、約90%のOPM-6細胞においてapoptosisが誘導された。このことより、OPM-6が産生する内因性IGF-1が、DEXにより誘導されるapoptosisを阻害していると考えられた。

次に、この抗IGF-1 receptor抗体存在下でDEXが誘導するapoptosisにおける分子機構について検討した。まずカスパーゼファミリーの下流に位置するCaspase-3の活性化を、ウエスタンブロットにて検討した結果、刺激8時間後よりcaspase-3の活性化を認めた。又、apoptotsis関連遺伝子の発現をノザンブロットで検討したところ、刺激

2時間後より Bcl-X_Lの mRNA の発現低下を認めた。Bcl-2、Bax、Bak、p53などの他の apoptotsis 関連遺伝子の発現には、変化がなかった。

3）DEX が誘導する apoptosis に対するサイトカインの影響

次に、各種サイトカインが、DEX により誘導される apoptosis に及ぼす影響について検討した。IL-6や IFN-αは、抗 IGF-1 receptor 抗体存在下において DEX が誘導する apoptosis を、顕著に阻害した（TUNEL 法にて解析）。又、IL-6や IFN-αは、DEX による Caspase-3の活性化を抑制した（ウエスタンブロットにて解析）。以上より、IL-6や IFN-αは、DEX が誘導する apoptosis を阻害することが明らかとなった。

4）IL-6や IFN-αによる apoptosis 阻害シグナル伝達経路

IL-6や IFN-αは、Mitogen-activated protein kinase（MAPK）や Phosphatidylinositol 3-kinase（PI3-K）を活性化することが知られている。このシグナル伝達経路が、これらサイトカインによる DEX 誘導 apoptosis の阻害に関与しているかどうか、Mitogen-activated protein kinase kinase（MEK）inhibitor である PD098059や、PI3-K inhibitor である Wortmannin を用いて検討を行った。IL-6、IFN-αは、抗 IGF-1 receptor 抗体存在下において DEX が誘導する apoptosis を阻害するが、この阻害は Wortmannin や PD098059の添加培養により、回避されることを TUNEL 法にて確認した。以上より、IL-6や IFN-αによる DEX 誘導 apoptosisの阻害に、MEK/MAPK 系や PI3-K 系の経路が重要であることが明らかとなった。

〔総括〕

形質細胞性白血病患者末梢血より、IGF-1 autocrine 機構が存在するヒト骨髄腫細胞株 OPM-6を樹立した。OPM-6において、DEX は Bcl-X_Lの mRNA の発現低下や caspase-3の活性化を伴って apoptosis を誘導し、特に抗 IGF-1 receptor 抗体存在下では、顕著に apoptosis が増大した。又、IL-6と IFN-αは、MEK/MAPK 系・PI3-kinase 系を介して、DEX が誘導する apoptosis を阻害することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、IGF-1 autocrine 機構を有する新規骨髄腫細胞株において、デキサメサゾンにより誘導される apoptosis の分子機構及び、その apoptosis が IL-6や IFN-αなどのサイトカインにより回避される機構について解析したものである。デキサメサゾンが骨髄腫細胞の apoptosis を誘導する機構については、まだ一定の見解は得られていないが、本研究では、Bcl-X_L遺伝子の発現低下や Caspase-3の活性化を介して apoptosis を誘導することを示した。また、骨髄腫の治療抵抗性の原因の一つとされる、各種サイトカインによるアポトーシスの回避機構として、本研究では、IL-6や IFN-αなどのサイトカインが MEK/MAPK 系や PI3-K 系を介して骨髄腫細胞のアポトーシスを回避することを明示し、特に IFN-αについて、これらのシグナル伝達系の関与を初めて明らかにした。今後、難治性の骨髄腫に対する新しい治療法を確立するうえで、本研究で得られた知見は、非常に有用であると考えられ、充分学位授与に値すると認める。