

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Tumor Necrosis Factor - $\alpha$ Stimulates Invasion of Src Activated Intestinal Cells  |
| Author(s)    | 河相, 直樹  |
| Citation     | 大阪大学, 2002, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/43790">https://hdl.handle.net/11094/43790</a>   |
| 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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

|            |   |
|------------|---|
| 氏名         | 河 相 直 樹   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士 (医学)   |
| 学位記番号      | 第 16631 号   |
| 学位授与年月日    | 平成14年1月31日  |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>医学系研究科内科系専攻   |
| 学位論文名      | Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Stimulates Invasion of Src Activated Intestinal Cells.<br>(Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ は Src 活性化腸上皮細胞の浸潤能を亢進させる。) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 堀 正二<br><br>(副査)<br>教授 門田 守人 教授 祖父江憲治  |

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

大腸癌による死亡を減少させるには一次予防による発症数の減少、早期発見による治療効率の向上、進行症例に対する新規治療の開発が考えられる。特に癌死を左右する、浸潤と続発する遠隔転移を抑止することは生命予後を大きく改善できることが期待される。一方、肝癌、胃癌の例からも発生母地の組織炎症は癌発生における危険因子と考えられるが、大腸癌の中でも炎症性腸疾患からの発生は発生率も高く、若年傾向にある。これらの炎症性腸疾患では間質での炎症細胞浸潤と炎症性サイトカインが多く存在し、発癌過程への影響が示唆されている。それに対し、腸炎の粘膜上皮では癌遺伝子 src の発現が亢進し、癌化によってさらに活性化することが知られている。一方、大腸癌の多くにおいて癌遺伝子 ras の活性化変異がみられるが、炎症性腸疾患に伴う大腸癌では、腸炎を背景としない大腸癌に比し ras の活性化変異は少ない。今回、組織炎症が大腸癌に及ぼす影響を検討する目的で、癌発生への関与が示唆されている炎症性サイトカイン tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の腸上皮細胞への影響について Ras を活性化した細胞と Src を活性化した細胞を用いて比較検討した。

#### 【方法ならびに成績】

ラット腸上皮由来の造腫瘍性のない細胞株 RIE (rat intestinal epithelial cell) に ras、src を強制発現させた細胞株 RIE-ras、RIE-src、及び vector のみを導入した RIE-m を作製した。RIE-ras、RIE-src は軟寒天内でコロニーを形成し、悪性転化していると考えられた。対数増殖期の細胞に TNF- $\alpha$  (40ng/ml) を加えると RIE-ras、RIE-m では変化がなかったが、RIE-src では細胞間接着が消失し形態が球状に変化した。trypan blue 染色ではアポトーシスはほとんど認められなかった。次に、軟寒天内での細胞増殖に対する TNF- $\alpha$  の影響を検討したところ、RIE-ras ではコロニーの大きさ、形態に変化がなかったが、RIE-src ではコロニーの大きさが増大し辺縁が鋸歯状になった。さらに、基底膜蛋白 Matrigel による invasion assay で浸潤能を検討したところ、RIE-src において TNF- $\alpha$  による浸潤能の亢進を認めたが、RIE-ras では有意な変化を認めなかった。これらの変化はいずれも Src 阻害剤 herbimycin A (0.5  $\mu$ g/ml)、radical scavenger pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC、10  $\mu$ M) により抑制されたが、ras 阻害剤 N-acetyl-S-farnesyl-L-cystein (50  $\mu$ M) では抑制されなかった。以上の結果から、TNF- $\alpha$  は RIE-src の浸潤能を亢進させ、その過程には活性酸素、Src チロシンキナーゼ (SrcTK) の関与が示唆された。そこで、flow cytometry により細胞内過酸化物を定量したところ、RIE-src では TNF- $\alpha$  による増加と PDTC によるその効

果の抑制が認められたが、RIE-ras、RIE-mでは変化がなかった。c-Srcで免疫沈降し、SrcTK活性を測定するとRIE-srcではTNF- $\alpha$ によりSrc発現の増加とチロシンリン酸化(Tyr416)による活性化とによってSrcTK活性が増加し、その効果はherbimycin A、PDTCで抑制されたが、RIE-ras、RIE-mではTNF- $\alpha$ による変化はなかった。従って、TNF- $\alpha$ がRIE-srcの浸潤能を亢進させる機構として活性酸素を介したSrcTK活性の亢進が考えられた。

次に、浸潤能に寄与する因子として細胞遊走能と細胞間接着分子E-cadherinについて検討した。TNF- $\alpha$ による変化はRIE-srcでのみ認められ、細胞遊走能の増加、E-cadherinおよびその裏打ち蛋白である $\beta$ -cateninでのリン酸化チロシンの増加、E-cadherin発現量の減少が観察された。herbimycin A、PDTCはTNF- $\alpha$ によるこれらの変化を阻害した。以上よりTNF- $\alpha$ によるRIE-srcの浸潤能亢進には細胞遊走能の亢進と細胞間結合の減弱が寄与している可能性が示唆された。

#### 【総括】

Src活性化腸上皮細胞では、TNF- $\alpha$ により活性酸素を介してSrcが活性化し、さらに細胞遊走能や細胞間結合を変化させ、浸潤能を亢進させる可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

大腸癌浸潤過程において発生母地の慢性炎症が及ぼす影響をラット腸上皮細胞株に癌遺伝子src及びras導入したin vitroのモデルにて検討し、炎症性サイトカインtumor necrosis factor- $\alpha$ がSrc活性化腸腫瘍細胞の浸潤性を高め、癌進展を助長する可能性を示唆したことは学位に値すると認める。