The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Tumor Necrosis Factor -α 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	https://hdl.handle.net/11094/43790
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

【13】

氏　　名	河　相　直　樹（かわい なおき）
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 医学系研究科内科系専攻
学　位　論　文　名	Tumor Necrosis Factor-α Stimulates Invasion of Src Activated Intestinal Cells. （Tumor Necrosis Factor-α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） 教授　堀　正二 （副査） 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生数の減少、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-α（TNF-α）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-α（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が、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-α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-α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（0.5μg/mℓ）、radical scavenger pyrrolidine dithiocarbamate（PDTC、10μM）により抑制されたが、ras阻害剤N-acetyl-S-farnesyl-L-cystein（50μM）では抑制されなかった。以上の結果から、TNF-α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-α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-α 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-α による変化はなかった。従って、TNF-α 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-α 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 β-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-α によるこれらの変化を阻害した。以上より TNF-α 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-α 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-α 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。