

Title	Soluble Flt-1 Has Cytotoxic Effects on BeWo Choriocarcinoma Cells
Author(s)	山下, 美智子
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69441
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 山下 美智子	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 木 村 正
	副 査 大阪大学教授 金 田 安史
	副 査 大阪大学教授 土 岐 祐一
論文審査の結果の要旨	
<p>固形癌の増殖には血管新生が深く関わっており、VEGF (Vascular endothelial growth factor) は血管新生における重要な位置を占めている。VEGFは、VEGFレセプター1 (Flt-1: Fms-like tyrosine kinase-1) に結合することで血管新生作用を示す。Soluble Flt-1 (sFlt-1) はキナーゼ部分を欠くFlt-1のスプライシングバリエーションであり、Flt-1と競合してVEGFに結合することにより血管新生を阻害する。申請者は絨毛癌細胞株であるBeWoにsFlt-1遺伝子導入を行い、BeWoに対するsFlt-1の細胞障害性を証明した。本研究はこれまで考えられてきた抗血管新生作用に加え、直接的な細胞障害性に焦点を当て、sFlt-1 が悪性腫瘍に対する治療の一つとなりうる可能性を示したものであり、学位の授与に値すると考える。</p>	

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	山下 美智子
論文題名 Title	Soluble Flt-1 Has Cytotoxic Effects on BeWo Choriocarcinoma Cells (soluble Flt-1 は絨毛癌BeWo細胞に対して細胞障害性をもつ)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>胎盤とガンの性質には複数の共通点がある。固形癌の増殖には血管新生が直関わっており、VEGF (Vascular endothelial growth factor) は血管新生における重要な位置を占めている。VEGFは、VEGFレセプター1 (Flt-1: Fms-like tyrosine kinase-1) に結合することで血管新生作用を示す。Soluble Flt-1 (sFlt-1) はFlt-1のスプライシングバリエーションであり、キナーゼ部分を欠く。sFlt-1はFlt-1と競合してVEGFに結合することにより、血管新生を阻害する。この抗血管新生作用より、sFlt-1による抗腫瘍効果の報告が複数ある。また、ヒト大腸癌・卵巣癌細胞に対して、sFlt-1が細胞障害性をもつことが報告されている。sFlt-1は胎盤から多く分泌され、産科的合併症である妊娠高血圧症候群にも強い関連があることから、我々はヒト絨毛癌由来細胞株BeWoに着目し、sFlt-1のBeWoに対する細胞障害性につき検討した。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>BeWo細胞をディッシュに播種後24時間で、リポフェクション法を用いて遺伝子導入を行った。sFlt-1を導入したものを実験群とし、遺伝子導入自体の毒性を考慮するため、コントロールとしてEGFPを導入した細胞も作成した。遺伝子導入施行後96時間、37°C5%CO₂下で培養し各実験に供した。</p> <p>まずELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) を用いて細胞上清中のsFlt-1を測定し、sFlt-1の過剰発現が成功していることを確認した。細胞数はsFlt-1群においてEGFP群に比し有意に減少していた。sFlt-1群のBrdU (Bromodeoxyuridine) 取り込みは、遺伝子導入を行っていないBeWo細胞と同等であった。よって、細胞増殖の停止ではなく、細胞死によって細胞数が減少した可能性が示唆された。</p> <p>次にLDH assay を用いて細胞障害性を評価した。これは細胞死の際に細胞内よりLDH (lactate dehydrogenase) が放出されることを利用し、無処置細胞を0、界面活性剤添加細胞を100とした際の実験群の細胞障害性 (% Cytotoxicity) を算出するものである。LDH assayの結果、sFlt-1群はEGFP群に比し、有意な% Cytotoxicityの上昇を認めた。</p> <p>続いて細胞死のメカニズムを検討した。TUNEL (TdT-mediated dUTP nickend labeling) 染色で、sFlt-1群は無処置BeWoに比し、アポトーシス細胞の増加を認めなかった。また、アポトーシスの際、protein keratin 18がカスパーゼにより断片化されることを利用し、アポトーシスの定量化を行った。ELISAにより、断片化されたccK18を測定した結果、sFlt-1群はEGFP群に比しccK18値が高値の傾向にあったが、有意な上昇は認めなかった。</p> <p>sFlt-1群における細胞数の減少が、抗VEGF効果によるものかどうかを検討するため、ELISAを用いてPIGF (placental growth factor) とVEGFを測定した。sFlt-1群とEGFP群で細胞上清中のPIGF、VEGF濃度に有意差を認めず、PIGFやVEGFの中和効果とは関係のない細胞障害が示唆された。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>sFlt-1は絨毛癌BeWo細胞に対し細胞障害性を示した。今回示されたsFlt-1の細胞障害性はin vitroにおけるガン細胞株でのものであり、直接的な細胞障害性が示唆された。</p> <p>今回我々は、sFlt-1について、これまで考えられてきた抗血管新生作用に加え、細胞障害性に焦点を当てた。本研究の結果は、sFlt-1が悪性腫瘍に対する治療の一つとなりうる可能性を示唆するものである。</p>	