

日本財団補助金による  
1998年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

1999年3月6日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島章殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 殷 大力  
研究機関 神戸大学 医学部 脳神経外科 研究指導者 玉木 純彦 先生 職名 教授  
所在地 〒650-0017 神戸市中央区南四丁目7-5-1 電話 078-382-5111 内線 5969

研究テーマ 下垂体腺腫細胞に対するbromocriptineによるapoptosisの誘導機構

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表  有 ・ 無 (学会名・内容)

第57回 日本脳神経外科学会総会

下垂体腺腫細胞に対するbromocriptineによるapoptosisの誘導機構

(2) 学会誌等に発表した論文  有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

神経免疫研究

下垂体腺腫細胞に対するbromocriptineによるapoptosisの誘導機構

### 3. 今後の研究計画

1) 遺伝子の導入による apoptosis に対する影響の解析

p53, 2C2 と cpps2 の遺伝子発現プラスミドを培養細胞に導入し、これらの遺伝子の apoptosis に対する影響を調べた。

2) In vivo 脳腫瘍モデル動物への apoptosis の誘導と DNA 導入と増殖阻害  
apoptosis への影響

マウス腫瘍モデルを用いて、遺伝子発現プラスミドベクターを腫瘍局所に注入し、in vivo での遺伝子導入を行う。その後経時的に腫瘍増殖を顕微鏡的に観察し、遺伝子治療の抗腫瘍効果を検討する。

### 4. 研究指導者の意見

この度、財団法人日中医学協会から在留中国人研究者研究助成金をいただき、素晴らしい研究の成果をあげることができました。大変感謝を致します。殷大力先生は将来の医学、特に脳神経外科学の発展にとって必要な人材と思われます。今後、本邦及び中国において多くの研究成果を挙げ脳腫瘍の診断治療に貢献することを期待いたします。



研究指導者氏名

玉木紀彦



### 5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会-日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ  
下垂体腺腫細胞に対するbromocriptineによるapoptosisの誘導機構

研究者氏名

殷 大力

中国での所属・役職

中国 河南省人民病院 脳神経外科 主治医師

日本での指導者氏名・所属・役職

指導者： 玉木 紀彦 神戸大学 脳神経外科教授

要旨（日本語）

抄録：Bromocriptine (Bro)は脳下垂体腺腫に対する薬物療法として有用である。その作用機構は不明な点が多い。とくにBroによる下垂体腺腫のapoptosis誘導についてはわかっていない。今回、我々はWestern blottingとPolymerase chain reaction (PCR)にてp53, bcl-2, p21, IGF-I, IGF-IR発現変化とBro誘導性apoptosisの関係を検討した。Bro処理により、培養下垂体腺腫細胞にapoptosisの誘導が認められた。このapoptosis誘導には、p53とp21の発現亢進とbcl-2の発現低下が関与していたが、IGF-IとIGF-IRは関与していないと考えられた。

KEY WORDS

bromocriptine, pituitary, apoptosis.

研究報告

目的

↓

方法

↓

結果

↓

考察

↓

参考文献

1、目的

Programmed cell deathとしてのapoptosisは細胞死の形の一つであり、近年化学療法的作用機序との関連で注目されるようになってきた。種々の抗癌剤は癌細胞にapoptosisを起こすことが知られているが、bromocriptine (Bro)の作用機序は不明な点が多い。とくに下垂体腺腫細胞のapoptosis誘導については明らかでない。今回、我々はWestern blottingにてwild-type p53、bcl-2、p21、IGF-IとIGF-IR蛋白発現とBro誘導性のapoptosisの関係を検討し、さらにpolymerase chain reaction (PCR)にて上記遺伝子の発現変化を検討した。

## 2、方法

### 1) 細胞

下垂体腺腫細胞株 (GH3とAtT-20細胞) を用いた。培養はRPMIとD-MEM培地に10%FCS, glutamine, antibioticsを添加し、37°C, 5%CO<sub>2</sub>の条件下で行った。

### 2) Broの刺激

細胞1X10<sup>7</sup>個に対しBroを0.01-40 μg/ml作用させ、48時間、72時間培養した後に評価を行った。

### 3) DNA fragmentationとHoechst 33258 staining

10 μg/ml Bro作用後、apoptosisの有無を2%アガロースゲル電気泳動法とHoechst 33258 stainingにて調べた。

### 4) Western blottingとPCR

Bro作用後1時間、6時間、24時間、48時間、72時間目に、下垂体腺腫細胞から蛋白およびDNAを抽出した。Western blottingとPCRを行い、wild-type p53、bcl-2、p21、IGF-IとIGF-IRの発現変化を調べた。

## 3、結果

### 1) Broによるapoptosisの誘導

Broはdose-dependentにGH3とAtT-20細胞の増殖を抑制した。10 μg/mlのBro作用後、48時間と72時間の状態で培養下垂体腺腫細胞にDNA ladder patternが認められた。Bro作用後1時間から24時間まではDNA fragmentationが認められなかった。GH3とAtT-20細胞はBro作用後48時間目に、それぞれに60%と58%のtypical apoptotic morphologyが認められた。

### 2) p53, bcl-2, p21, IGF-I, IGF-IRの発現変化

Bro作用後、1時間より72時間までp53の発現亢進と1時間より24時間までp21の発現亢進、さらに24時間より72時間までbcl-2の発現低下が認められた。IGF-IとIGF-IRの蛋白はBro作用前後、発現変化が認められなかった。

## 4、考察

Broはドーパミン作用をもつ麦角製剤で、プロラクチン産生腺腫およびGH産生腺腫<sup>1)</sup>の治療によく使われているが、ACTH産生腺腫<sup>2)</sup>の治療にも使われている。Broは血中プロラクチン値と成長ホルモン値を低下させるだけでなく、腫瘍の縮小効果も有している。電子顕微鏡を用いた研究によってBroの投与により、細胞のnuclear pyknosis、aggregated chromatin、rough endoplasmic reticulumとGolgi apparatusの

volume densitiesの減少、細胞質の減少とmitochondriaの萎縮と腫脹ということが証明されている<sup>3-5)</sup>。以上の所見及び他の生物化学の研究によってBroがホルモンとDNAの生物合成を抑制することが明らかにされた<sup>6)</sup>。腫瘍細胞のapoptosisに対する感受性は化学療法効果の重要な要因とされている。種々の抗癌剤は癌細胞にapoptosisを起こすことが知られているが、Broの詳細な作用機序は不明な点が多い。我々の実験結果から培養下垂体腺腫細胞株においてもBroにより細胞死が誘導され、その死の形態はDNA fragmentationとHoechst 33258 stainingの所見より、apoptosisであることが分かった。

近年、apoptosis関連遺伝子に関する多くの研究成果によりapoptosis分子機構が次第に明らかにされてきた。なかでもp53, bcl-2, p21, IGF-I, IGF-IRとapoptosisとの関連は注目されるようになってきた。p53はapoptosisの誘導に必要とされている<sup>7,8)</sup>。p53は nuclear phosphoproteinであり、細胞の増殖と分化を調節する機能も持っている<sup>9)</sup>。癌抑制遺伝子p53の機能喪失は広い範囲の癌の原因として重要な役割を果たしている<sup>9)</sup>。多くの腫瘍細胞は正常p53機能の回復により細胞周期停止またはapoptosisに陥る<sup>10)</sup>。一方、DNA-damaging agentsの治療により細胞のp53の発現亢進が認められている<sup>11,12)</sup>。bcl-2遺伝子は濾胞性B細胞リンパ腫のt(14,18)転座の解析を通して発現された癌遺伝子で、主に26 kDの膜蛋白に翻訳され、ミトコンドリアに局在すると報告されている<sup>13,14)</sup>。特徴的なことは、bcl-2を過剰発現させた細胞は延命効果が現われることである<sup>13,14)</sup>。その後、bcl-2は種々の系でgrowth factor withdrawalによって誘導された細胞死(apoptosis)、或はp53-dependent apoptosisを抑制することが明らかにされて<sup>13-16)</sup>。bcl-2は、p53とoppositeの機能を有していると考えられている<sup>15,16)</sup>。p21(WAF1/CIP1)はp53蛋白の下流で、機能としてはG1 cyclin-dependent kinaseを抑制し、さらにPCNAの活性も抑制するとされている<sup>17)</sup>。p21は、p53依存性またはp53非依存性に細胞分化に重要な役割をしていることが知られている<sup>18)</sup>。IGF-1とIGF-1Rは正常細胞のdevelopment, growthとsurvivalに重要な役割をしている。IGF-1とIGF-1RがetoposideとUV-lightによって誘導したapoptosisを抑制できると言われている<sup>19,20)</sup>。これらのことより、我々もBro誘導性apoptosisとp53, bcl-2, p21, IGF-I, IGF-IRの発現の関係を検討した。今回、Western blottingとPCRを用いて、Bro作用後、p53, p21の発現亢進とbcl-2の発現低下を証明した。IGF-IとIGF-1Rの蛋白はBro作用前後、発現変化が認められなかった。以上のことはBroが培養下垂体腺腫細胞にp53依存性のapoptosisを誘導することを示している。

## 5、結語

これらの点は下垂体腺腫細胞に対するBroの抗腫瘍効果にapoptosisが関与していることを示している。このapoptosis誘導機構には、wild-type

p53とp21のupregulation, bcl-2のdownregulationが関与しているが、IGF-1とIGF-1Rは関与していないと考えられた。Bro誘導性apoptosisはp53依存性のapoptosisであることが示された。

## 6、文献

- 1) Bonneville, JF., Ponlignot, D., Cattin, F., et al.: Radiology, 143:451-455, 1982
- 2) Lamberts, SWJ.: J Clin Endocrinol Metab, 51:307-311, 1980
- 3) Kabuto, M., Kubota, T., Hayashi, M., et al: Neural Med Chir, 25:886-893, 1985
- 4) Eljarmak, D., Lis, M., Cantin, M., et al: Hormone Res, 21:160-167, 1985
- 5) Hallenga, B., Seager, W. and Ludecke, DK. : Exp Clin Endocrinol, 92:59-68, 1988
- 6) Prysor-Jones, RA. and Jenkins, JS.: J Endocr, 88: 463-469, 1981
- 7) Lowe, SW., Ruley, HE., Jacks, T., et al: Cell, 74:957-967, 1993
- 8) Lowe, SW., Schmitt, EM., Smith, SW., et al: Nature, 362:847-849, 1993
- 9) Levine, AJ., Momand, J. and Finlay, CA.: Nature, 351:453-456, 1991
- 10) Yonish-Rouach, E., Grunwald, D., Wilder, S., et al: Mol Cell Biol, 13:1415-1423, 1993
- 11) Kastan, MB., Onyekwere, O., Sidransky, D., et al: Cancer Res, 51:6304-6311, 1991
- 12) Fritsche, M., Haessler, C. and Brandner, G.: Oncogene, 8:307-318, 1993
13. Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., et al: Nature, 348:334-336, 1990
14. Tsujimoto, Y.: Oncogene, 2:3-7, 1987
15. Nunez, G., London, L., Hockenbery, D., et al: J Immunol, 144:3602-3610, 1990
16. Vaux, D.L., Cory, S. and Adama, J.M.: Nature, 335:440-442, 1988
17. Chen, J., Jackson, P.K., Korsmeyer, M.W., et al.: Nature, 374:386-388, 1995
18. Steinman, R.A., Hoffman, B., Iro, A., et al.: Oncogene, 9:3389-3396, 1994