The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	STAT3 MEDIATES THE SURVIVAL SIGNAL IN ONCOGENIC ras-TRANSFECTED INTESTINAL EPITHELIAL CELLS
Author(s)	厨子, 慎一郎
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41221
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

【 90 】

氏　　名	厨　子　慎一郎
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　14214　号
学位授与年月日	平成10年12月4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	STAT3 MEDIATES THE SURVIVAL SIGNAL IN ONCOGENIC *ras*-TRANSFECTED INTESTINAL EPITHELIAL CELLS （活性化ras導入腸粘膜上皮細胞の細胞死耐性獲得における転与因子STAT3の関与）
論文審査委員	（主査） 教授　松澤　佑次 （副査） 教授　平野　俊夫　　教授　門田　守人

論文内容の要旨

「目的」

ras 遺伝子の活性化変異は大腸の癌化過程において重要な役割を果たすと考えられている。これまでに私は，活性化 *ras* 導入腸粘膜上皮細胞（IEC-ras 細胞）を作成し，IEC-ras 細胞において HB-EGF をはじめとする EGF-family 増殖因子の autocrine loop が活性化しており，また IEC-ras 細胞はこの活性化した EGF-family 増殖因子の autocrine loop を介して細胞死耐性を獲得することを示し，大腸腫瘍性病変の形成段階における EGF-family 増殖因子を介したジグナルの重要性を報告した（Int. J. Cancer：73，917-923（1997））。しかし，その細胞死耐性を調節する細胞内シグナルは明らかではない。

STAT は，サイトカインの重要なシグナル伝達物質として知られる転写因子であるが，近年増殖因子である EGF が STAT1 および STAT3 を活性化することが報告され，EGF のシグナルにおける役割が注目されている。そこで私は，活性化変異 *ras* 遺伝子による腸粘膜上皮細胞の細胞死耐性の獲得における STAT の関与を明らかにするために本実験を行った。

「方法ならびに成績」

1）活性化 *ras* 導入細胞（IEC-ras）における STAT3 の恒常的活性化

正常ラット腸粘膜上皮細胞 IEC-6 に活性化変異 c-Ha-*ras* 遺伝子を強制発現させ，IEC-ras 細胞を作製した。また，対照細胞 IEC-neo 細胞を作製し，各細胞を無血清培地にて24時間培養後，蛋白を採取し，抗 STAT3 および STAT1 抗体にて免疫沈降し，その活性化を抗ホスホチロシン抗体によるウエスタンブロット法にて評価した。その結果，IEC-ras 細胞において恒常的な STAT3 の燐酸化がみられた。

2）EGF 特異的受容体キナーゼ阻害剤 AG1478の効果

先述のように，私は IEC-ras 細胞において EGF-family 増殖因子の autocrine loop が活性化していることを明らかにしているので，IEC-ras 細胞に認められた恒常的な STAT3 活性化に対する EGF-family 増殖因子の autocrine loop の寄与を検討した。EGF 特異的受容体キナーゼ阻害剤 AG1478の効果をみたところ，IEC-ras 細胞における

STAT3の燐酸化はAG1478（20 ng/ml）によって強く抑制された。

3）Dominant-negative変異体STAT3導入腸粘膜上皮細胞における増殖能の変化

活性化されたSTAT3の影響を見るために，Dominant negative変異体のSTAT3をIEC-rasに発現させたIEC-R-DNSTAT3 clonesおよびIEC-neoに発現させたIEC-N-DNSTAT3 clonesを作成した。まず，増殖速度をhemocytometerを用いて測定したところ，Dominant negative変異体のSTAT3を発現させることによって，増殖速度には明らかな影響を認めなかった。

4）Dominant-negative変異体STAT3導入腸粘膜上皮細胞における細胞死耐性の変化

次にUVC照射およびmitomycin C（MMC）投与による細胞死誘導に対する耐性をTrypan blue色素排除法にて比較検討した。IEC-ras細胞には強い細胞死耐性が認められたが，この細胞にDominant negative変異体のSTAT3を発現させると，IEC-ras細胞の細胞死耐性は著明に減弱した。このときの細胞DNAを2％アガロース中にて泳動したところ，20 J/m^{2}のUVC照射あるいは5 mg/mlのMMC投与によって細胞死に陥った細胞のDNAはラダーを形成し，アポトーシスを起こしていると考えられた。また，フローサイトメーターによる細胞周期分析によって，Dominant negative変異体のSTAT3を発現させることによって細胞死耐性が減弱したIEC-ras細胞では，アポトーシスに陥った細胞の分画が増加することが確認された。

5）Dominant-negative変異体STAT3導入腸粘膜上皮細胞におけるBcl-2，Bcl-xL発現の変化　IEC-ras細胞の細胞死耐性の調節におけるアポトーシス耐性遺伝子産物Bcl-2およびBcl-xLの発現を検討した。IEC-ras細胞においてはIEC-neo細胞と比較してBcl-2，Bcl-xLともに発現が増強していたが，IEC-ras細胞にDominant negative変異体のSTAT3を発現させるとBcl-2，Bcl-xLともに発現が減弱した。

「総括」

1）活性化*ras*導入腸粘膜上皮細胞IEC-ras細胞において，恒常的なSTAT3の活性化がみられた。

2）IEC-ras細胞において見られたSTAT3の活性化はEGF特異的受容体キナーゼ阻害剤によって強く減弱された。

3）Dominant-negative変異体STAT3を導入することにより，IEC-ras細胞は増殖に影響をみなかったが，著明なアポトーシス耐性減弱を示した。

4）Dominant-negative変異体STAT3を導入することにより，IEC-ras細胞におけるBcl-2，Bcl-xLの発現は減弱した。

*ras*遺伝子の変異活性化を受けた腸粘膜上皮細胞には，EGF-family増殖因子のautocrine loopによって恒常的に燐酸化されたSTAT3を介して細胞死耐性を獲得するメカニズムが存在することを明らかにした。大腸粘膜の癌化過程においてSTAT3の活性化が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

大腸の前癌病変である大腸腺腫の形成段階において*ras*遺伝子の活性化変異は重要な役割を果たすものと考えられている。したがって*ras*遺伝子の活性化が上皮細胞の細胞死の調節に及ぼす影響およびその機序をあきらかにすることは大腸の癌化機序を解明する上で非常に重要である。

本研究では，活性化*ras*遺伝子を導入した腸粘膜上皮細胞IEC-*ras*を作製し，IEC-*ras*においてEGF family増殖因子のautocrine loopが活性化していること及びIEC-*ras*はそのautocrine loopに依存した細胞死耐性を獲得していることを明らかにした。さらに，IEC-*ras*においてはEGF family増殖因子のautocrine loopに依存した転写因子STAT3の強い活性化が認められていることをあきらかにし，dominant-negative STAT3を用いた検討によって，この活性化したSTAT3はBcl-2やBcl-xLの発現調節を介してIEC-*ras*の細胞死耐性を調節していることを明らかにした。

本研究は，*ras*遺伝子に変異を起こした腸粘膜上皮細胞が細胞死耐性を獲得する過程における細胞内シグナルSTAT3の関与を初めて明らかにしたものであり，大腸の前癌病変を対象とした新たな治療手段の手がかりを与えるものとして臨床的意義が大きく，学位に値するものと認める。