



Title	Tumorigenicity Conferred by Inhibition of Apoptosis
Author(s)	岡, 清正
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41650
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

氏名	岡 清 正
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 14473 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	Tumorigenicity Conferred by Inhibition of Apoptosis (腫瘍原性はアポトーシスの抑制により獲得される)
論文審査委員	(主査) 教授 秋山 徹 (副査) 教授 上田 重晴 教授 野島 博

論文内容の要旨

【目的】

細胞ががん化すると、細胞形態の変化、不死化、接着非依存性増殖、腫瘍原性といった様々ながん化形質が現れる。これらの形質の多くは、別々の遺伝子によって引き起こされる独立した現象であるが、その分子機構はほとんど解明されていない。本研究では、同じ遺伝的背景を持ち腫瘍原性以外はほぼ同じがん化形質を示す2種類の細胞株を用いて、がん化形質の中で最も重要である腫瘍原性の分子的基盤について解析した。

【方法ならびに成績】

子宮頸がん細胞株HeLaとヒト正常細胞とを融合させると、その融合細胞(CGL1)は、足場非依存性増殖や不死化といった性質は変わらずに残っているが、腫瘍原性を失う。この細胞は安定だが、継代していく内に腫瘍原性を再び獲得した細胞(CGL4)が得られている。

腫瘍原性細胞CGL4は無血清培地で増殖できるが、非腫瘍原性細胞CGL1は増殖できないことを見出した。そこで、CGL1の無血清培地での細胞死がアポトーシスかネクローシスかを調べるために、様々な検定を行った。まず、アポトーシスに重要な働きをするCPP32(caspase-3)が活性化していることを見つけた。すなわち、無血清培地中で2日間培養した後のCGL1では、血清存在下と比べCPP32活性が約3倍上昇していた。この時、CGL4は血清の有無によって有意な差は認められなかった。さらにアポトーシスの指標となるDNAの断片化を調べたところ、無血清培地中ではCGL1でのみDNAの断片化が検出された。以上のことより、CGL1は無血清培地中でアポトーシスを起こすことが確認された。また他のアポトーシス刺激、アクチノマイシンD処理やUV照射でもCGL1の方が感受性の高いことが分かった。

次に、アポトーシス感受性の差と腫瘍原性の差とに関係があるかどうかを調べた。CGL1、CGL4をヌードマウスに接種すると接種した細胞塊に由来する膨らみができるが、7日目位からCGL4は大きくなり腫瘍を形成し始める。これに対し、CGL1の膨らみは7日目位まで接種時と変わらぬ大きさを保つが、その後急速に小さくなって消える。そこで接種後、2、4、6、9日目に接種部位をホルマリン固定し、in situ TUNEL assayを行った。その結果、CGL1で接種後6日から9日の間にTUNEL陽性細胞が観察された。よって、CGL1はヌードマウスに接種した時もアポトーシスを起こすことが確認できた。

CGL 1 のアポトーシスを抑制する目的で, Bcl- 2 遺伝子, adenovirus E 1 B 19 k 遺伝子, cowpox virus crmA 遺伝子を CGL 1 に導入した。得られたクローンについて, 無血清培地中での増殖能を調べると, 全てのクローンで増殖することができた。この時, DNA の断片化も抑えられていた。これらのクローンを用いて, アポトーシスの抑制が腫瘍原性につながるかどうか調べた。その結果, Bcl- 2 遺伝子, E 1 B 19 k 遺伝子を導入した CGL 1 は, ヌードマウスの皮下に腫瘍を形成した。のことから, 肿瘍原性にアポトーシスの抑制が必須であることが分かった。また, crmA 遺伝子を導入した CGL 1 では腫瘍は認められなかったので, 無血清培地中でのアポトーシス誘導刺激と, ヌードマウス皮下のそれとは異なることが考えられる。

【総括】

HeLa 細胞とヒト線維芽細胞との融合細胞に由来する非腫瘍原性細胞 (CGL 1) と腫瘍原性細胞 (CGL 4) とを比較することにより, 肿瘍原性についての分子機構を解析した。CGL 1 は, 無血清培地中およびヌードマウス皮下でアポトーシスを起こしていた。そこで, CGL 1 にアポトーシス抑制遺伝子である Bcl-2, E 1 B 19 k を導入すると無血清培地中で増殖でき, ヌードマウスに腫瘍を形成した。これらのことから, 肿瘍原性にはアポトーシスの抑制が必須であることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

がん化した培養細胞は様々ながらん化形質を示すが, この中で腫瘍原性 (ヌードマウス皮下での腫瘍形成能) は実際のがんと最も良く関連した表現型であると考えられる。従って, 肿瘍原性に伴って細胞内でどのような変化が起こっているのかを分子レベルで解析することは, 細胞がん化機構の全体像を解明する上で非常に重要であるが, これまでのような研究はほとんど行われていない。

本研究は, 肿瘍原性以外のがん化形質や遺伝的背景はほぼ同一である 2 種類の細胞株を比較, 解析することによって, 肿瘍原性細胞はアポトーシスに抵抗性であること, 非腫瘍原性細胞のアポトーシスを阻害すると腫瘍原性を獲得することを明らかにした。

この研究は, 細胞がん化機構の解明に大きく貢献するものであり, 学位の授与に値すると考えられる。