

Title	Bcl-xL is over-expressed and modulates apoptosis in human gastric carcinomas
Author(s)	近藤, 真也
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42902">https://hdl.handle.net/11094/42902</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏 名	近 藤 真 也
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 0 7 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 2 年 2 月 1 5 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	Bcl-x <sub>L</sub> is over-expressed and modulates apoptosis in human gastric carcinomas (胃癌のアポトーシス感受性におよぼす Bcl-x <sub>L</sub> の役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松 澤 佑 次 (副査) 教 授 門 田 守 人 教 授 辻 本 賀 英

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [目的]

アポトーシスは胃粘膜の恒常性を保つ上で重要な役割を果たしている。DNA 損傷により遺伝子異常を生じた細胞はアポトーシスにより除去される。何らかの原因によりアポトーシスの異常をきたした細胞は遺伝子異常が集積し、次第に浸潤、転移といった癌の形質を獲得していくものと考えられる。しかし胃粘膜上皮細胞がアポトーシスの異常をきたす機序については明らかでない。

本研究は胃癌におけるアポトーシス調節異常の機序を明らかにすることを目的として、アポトーシス抑制因子である Bcl-x<sub>L</sub> の胃腺腫および胃癌組織における発現を検討した。さらに、Bcl-x<sub>L</sub> を発現している胃癌細胞を用い、細胞内に発現する Bcl-x<sub>L</sub> がアポトーシス感受性に及ぼす役割について検討した。

### [方法ならびに成績]

#### 1) ヒト胃癌組織における bcl-x<sub>L</sub> 遺伝子の発現

対象は胃腺腫11例、早期胃癌 8 例および進行胃癌 6 例。内視鏡下生検により、病変部および背景粘膜より生検材料を採取した。bcl-x<sub>L</sub> mRNA 量を competitive RT-PCR 法により測定したところ、胃腺腫11例中 6 例、早期胃癌 8 例中 5 例および進行胃癌 6 例中 3 例において、癌部 bcl-x<sub>L</sub> 遺伝子発現が背景粘膜と比べ増強していた。

#### 2) ヒト胃癌組織における Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白の発現

Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白の発現をウェスタンブロット法により検討したところ、bcl-x<sub>L</sub> 遺伝子の過剰発現が認められた胃腺腫、胃癌症例において、腫瘍部の Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白の発現が背景粘膜と比べ増強していた。また免疫組織学的検討において、腫瘍細胞中に bcl-x 蛋白の強い Immunoreactivity が認められた。

#### 3) bcl-x antisense oligonucleotides によるアポトーシス感受性の変化

癌細胞に発現している Bcl-x<sub>L</sub> のアポトーシス感受性におよぼす影響をみるため、Bcl-x<sub>L</sub> を発現しているヒト胃癌由来の MKN-45細胞を bcl-x antisense で処理し、アポトーシス感受性の変化を検討した。MKN-45細胞の Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白発現量は bcl-x antisense により濃度依存的に抑制された。血清除去後の cell viability を trypan blue exclusion 法

により検討したところ、bcl-x antisense で前処理した群では血清除去後の cell viability がコントロール群と比べ低下していた。また bcl-x antisense で前処理した群では Fas 抗体投与 2 日後の cell viability がコントロール群と比べ著明に低下していた。さらにフローサイトメーターにより DNA 含量の低下したアポトーシス細胞の割合を測定したところ、bcl-x antisense により Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白発現量の減少した細胞では、Fas 抗体投与後にアポトーシスが誘導された細胞が増加していた。

#### 4) bak 遺伝子導入のアポトーシス感受性に及ぼす影響

次に、Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白と結合し Bcl-x<sub>L</sub> のアポトーシス抑制作用を阻害することが知られている Bak 蛋白を過剰発現させ、細胞のアポトーシス感受性の変化を検討した。bak 遺伝子を導入した MKN-bak 細胞において Bak 蛋白の発現増加が確認された。他のアポトーシス関連蛋白 (Bax、Bcl-x<sub>L</sub>、Bcl-x<sub>S</sub>、Bcl-2、Fas) の発現は、bak 遺伝子導入により影響をうけなかった。MKN-bak 細胞において、Fas 抗体投与による cell viability の低下およびアポトーシス細胞の増加が認められた。

MKN-bak 細胞において、5-FU 投与および cisplatin 投与による cell viability の低下が認められた。MKN-bak 細胞では 5-FU および cisplatin 投与によりアポトーシスが誘導された細胞が増加していた。

#### [総括]

胃腺腫および胃癌において、アポトーシス抑制因子である Bcl-x<sub>L</sub> の発現が増強していることを明らかにした。さらに、ヒト胃癌由来細胞において Bcl-x<sub>L</sub> の発現および機能を抑制することによりアポトーシス感受性が亢進することを明らかにした。本研究の結果、胃癌細胞におけるアポトーシス耐性獲得には Bcl-x<sub>L</sub> の発現増強が重要な役割を果たしていることが示された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、胃癌におけるアポトーシス耐性獲得の機序を、アポトーシス抑制因子である Bcl-x<sub>L</sub> に注目して検討を加えたものである。著者らは胃腺腫および胃癌組織における Bcl-x<sub>L</sub> の発現を検討し、約半数の胃腺腫および胃癌組織において Bcl-x<sub>L</sub> の発現が RNA レベルおよび蛋白レベルで増強していることを明らかにした。さらに胃癌由来細胞を用いた検討において、Bcl-x-antisense 処理および Bcl-x<sub>L</sub> の機能を阻害する Bak の過剰発現により、Bcl-x<sub>L</sub> の発現および機能を抑制することにより、抗癌剤などのアポトーシス誘導刺激に対する癌細胞の感受性が増強することを明らかにした。これらの結果により、胃癌細胞のアポトーシス耐性獲得には Bcl-x<sub>L</sub> の発現増強が重要な役割を果たしていることが明らかになった。胃癌の多くは抗癌剤に耐性であることが胃癌治療の大きな問題となっているが、本研究により Bcl-x<sub>L</sub> の発現、機能を抑制することにより癌細胞のアポトーシス耐性が解除されることが明らかになり、Bcl-x<sub>L</sub> を標的とした新たな胃癌治療の可能性が示されたことは意義深いと思われる。

以上のことより、本研究は胃癌の病態を解明し、より合理的な治療法を開発するうえで重要な知見であり、学位に値すると認めるものである。