

氏 名	李 正 煜
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2366 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	ヒト膵癌細胞株におけるアポトーシスに関する研究

論文調査委員 (主 査) 教授 平 岡 真 寛 教授 武 田 俊 一 教授 今 村 正 之

論 文 内 容 の 要 旨

膵癌は難治性であり化学療法や放射線療法に対しても抵抗性を示すものが大部分である。そこで我々は、ヒト膵癌細胞株を用いて、化学療法剤の投与や放射線の照射を行い、それらにより細胞死を認める際のアポトーシス誘導の機序、及びアポトーシスの制御に重要とされる Bcl-2 関連蛋白の役割を考察した。Bcl-2 関連蛋白としては、アポトーシス誘導因子として作用する Bax とアポトーシス抑制因子として作用する Bcl-2, Bcl-XL に着目した。

研究 1 (膵癌細胞株における抗癌剤によるアポトーシス誘導と Bcl-2 関連蛋白):

ヒト膵癌細胞株 PANC-1 細胞にシスプラチンと VP-16 を接触させ、それらの細胞増殖抑制効果を検討したところ両者とも用量依存性に細胞増殖を抑制し、50%増殖抑制をきたす濃度はそれぞれ $3\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ であった。一方、TUNEL 染色陽性率は薬剤接触前 (5%) に比して接触後は用量依存性 ($100\mu\text{M}$, 23%) にまた時間依存性 (24時間, 18%) に増加し、これらの抗癌剤による細胞増殖抑制機序に癌細胞のアポトーシスが関与しているものと考えられた。さらに、薬剤接触後、細胞を経時的に回収し、主なアポトーシス関連因子とされる Bax と Bcl-2 の変動を Western blot 法で検討したところ、Bax は時間依存性に up-regulate したが Bcl-2 の発現に変動を認めなかった。

研究 2 (膵癌細胞の放射線感受性と Bcl-2 関連蛋白発現の関連):

PANC-1 細胞株と AsPC-1 細胞株の放射線照射前の Bax, Bcl-2, Bcl-XL の発現を検討し、この差異と放射線感受性との関連を検討し、さらに、両細胞株に 5G の放射線を繰り返し照射することで樹立した放射線耐性株を用いて放射線耐性の機序を Bcl-2 関連蛋白の発現から検討した。

(1) PANC-1 細胞と AsPC-1 細胞は放射線照射によって線量依存性に細胞増殖が抑制され、いずれの細胞株でも TUNEL 染色陽性率は線量依存性に増加した。50%増殖抑制をきたす線量はそれぞれ 5.0Gy, 3.0Gy で、PANC-1 細胞が AsPC-1 細胞より放射線感受性が低かった。照射前で比較すると PANC-1 細胞が AsPC-1 細胞より Bax/Bcl-2 比が低かったが、Bcl-XL に差を認めなかった。(2) 放射線耐性株は親株に 5Gy の放射線を週 1 回、それぞれ計 24 回と 17 回照射することで樹立した (PANC-1/Rad-24, AsPC-1/Rad-17)。耐性株と親株で Bcl-2 関連蛋白の発現を比較すると、PANC-1 細胞、AsPC-1 細胞のいずれにおいても、耐性株で Bax が著しく減少し、Bcl-2 に変化を認めず、耐性株では Bcl-XL が著しく増加していた。(3) 親株と耐性株に放射線を照射し、照射後の Bcl-2 関連蛋白の発現を検討すると、親株耐性株共に Bax は時間依存性に up-regulate したが Bcl-2 に変動を認めず Bax/Bcl-2 比が増加するものの、耐性株では Bcl-XL は照射前後で著しい高発現を持続した。

結論及び意義: 1) 膵癌細胞株におけるシスプラチン, VP-16, 放射線照射によるアポトーシスの誘導にアポトーシス誘導因子である Bax と抑制因子である Bcl-2 の発現比率 (Bax/Bcl-2 比) の増加が関係する。2) 放射線耐性株においても、放射線照射後は Bax/Bcl-2 比が増大することから、耐性には Bcl-XL の強発現が関与している。従って、Bcl-2 関連蛋白は、膵癌細胞のアポトーシス誘導を規定する重要な分子であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

膵癌は難治性癌であり、放射線化学療法に抵抗性を示すものが多いが、その成因については必ずしも明らかではない。申請者は①放射線化学療法によるアポトーシス誘導機序、②放射線耐性（抵抗性）獲得機序について、Bcl-2 関連蛋白の変動という観点から、ヒト膵癌細胞株（PANC-1 細胞、AsPC-1 細胞）を用いた *in vitro* 系において検討したものである。Bcl-2 関連蛋白としては、アポトーシス誘導因子である Bax とアポトーシス抑制因子である Bcl-2, Bcl-XL に着目した。

① PANC-1 細胞に抗癌剤（CDDP, VP-16）を接触させると、用量・時間依存性にアポトーシスが誘導され、PANC-1 細胞は p53 変異株であるにもかかわらず時間依存性に Bax が up-regulate され、Bax/Bcl-2 比が上昇した。また、放射線照射によっても同様にアポトーシスが誘導され Bax の up-regulation, Bax/Bcl-2 比の上昇を認めた。

② PANC-1 細胞、AsPC-1 細胞に放射線照射を繰り返すことで、Bcl-XL が過剰発現した放射線耐性株を樹立し得た。放射線耐性株に放射線を照射すると、Bax は up-regulation されるにもかかわらず、アポトーシスは誘導されず、Bcl-XL の過剰発現の持続が、放射線耐性獲得に関与することを示唆するものである。

以上の研究はヒト膵癌細胞株での放射線化学療法剤によるアポトーシス誘導機序に Bax/Bcl-2 発現比率の変化が重要な規定因子であることを示し、放射線耐性の獲得機序を解明する上で示唆に富むところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年2月21日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。