



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	(I) Early Alterations of Apoptosis and Cell Proliferation in Azoxymethane-initiated Rat Colonic Epithelium (II) Expression of Bcl-2, Bax and Bcl-XL proteins in the azoxymethane-induced rat colonic adenocarcinomas(内容の要旨(Summary))
Author(s)	廣瀬, 善信
Report No.(Doctoral Degree)	博士 (医学) 甲 第329号
Issue Date	1997-03-25
Type	博士論文
Version	
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/14784

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名 (本籍)	廣瀬善信 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 329 号
学位授与日付	平成 9 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	(I) Early Alterations of Apoptosis and Cell Proliferation in Azoxymethane-initiated Rat Colonic Epithelium (II) Expression of Bcl-2, Bax and Bcl-XL proteins in the azoxymethane-induced rat colonic adenocarcinomas
審査委員	(主査) 教授 森 秀 樹 (副査) 教授 野 澤 義 則 教授 河 田 幸 道

論文内容の要旨

発癌過程における細胞死 (アポトーシス) の様々な役割が最近注目されている。発癌過程のイニシエーション期においては、発癌物質などの因子の曝露によるDNA傷害が標的臓器におこり、修復不可能な傷害を受けた細胞は生体にとって有害なものとして認知され除去される。その除去機構にアポトーシスが関与すると考えられる。イニシエーション期の組織形態学的変化については、ヒトにおけるその検討が困難であり、動物を使った発癌実験モデルでの報告が古くからあった。しかし、動物モデルでのイニシエーション期に相当する発癌剤投与直後の変化は、「変性壊死」と解釈されていた。したがって、アポトーシスという観点で発癌のイニシエーション期をもう一度見直す必要がある。また、Bediらは、細胞は癌化の過程においてアポトーシス耐性を獲得しており、その過程にアポトーシスに抑制的に働く蛋白であるBcl-2が関係することを報告した。したがって、発癌過程のポストイニシエーション期においては、腫瘍細胞がアポトーシス耐性になることで、更なる遺伝子変異が蓄積されやすくなることや腫瘍の発育速度が規定されることが考えられる。これまでに、Bcl-2に関連する蛋白としてアポトーシスに促進的に働くBax・Bcl-XSや抑制的な働きを持つBcl-XLなどが同定され、それらのヒト癌での発現異常が報告されている。しかし、動物を用いた発癌モデルでのそれらの検討はごく少数を見るのみである。本研究は、動物モデルを用いた化学発癌過程におけるアポトーシス及びその関連蛋白 (Bcl-2, Bax, Bcl-X) の発現を検索することを目的とし、実験1) では化学発癌剤に曝露された直後のラット大腸組織におけるアポトーシスの発現とそれに伴う細胞増殖の変化を検討し、実験2) では化学発癌剤によって誘発された大腸癌におけるBcl-2, Bax, Bcl-Xの発現について検討した。

研究材料と方法

実験1) 6週齢雄F344ラットに化学発癌剤であるazoxymethane (AOM) を15mg/kg体重の濃度で1回皮下投与し、その後8時間、3日、7日で屠殺した。生食のみを1回皮下投与して同様の処置を行ったラットをコントロールとした。摘出した大腸は通常ホルマリン固定パラフィン包埋とした。大腸粘膜上皮におけるアポトーシスの発現を、DNAの断片化を検出するTUNEL法にて解析した。また細胞増殖の変化をPCNAの免疫染色・BrdUの取り込み・細胞分裂数にて評価した。

実験2) 6週齢雄Sprague-DawleyラットにAOMを15mg/kg体重の濃度で週1回計2回皮下投与し、その後38週で屠殺した。AOMにより誘発された大腸癌は通常ホルマリン固定パラフィン包埋または凍結保存とし、凍結組織からは蛋白を抽出した。アポトーシス関連蛋白のBcl-2・Bax・Bcl-XLの発現を、免疫組織化学・western blot法にて検索した。Western blot法で得られたバンドは、densitometerによって定量化した。

研究結果と考察

実験1)

a) AOMによって引き起こされる大腸粘膜上皮の変化は陰窩の増殖帯内に限局していた。それらは細胞サイズの縮小・核濃縮・アポトーシス小体様の細胞の断片化を伴っており、TUNEL染色陽性であった。AOM投与後のTUNEL陽性細胞数の変化は、8時間をピークとする有意な増加を示すが、その後は漸減し7日後にはコントロールと同レベルにまで減少した。

b) 大腸陰窩におけるBrdUの取り込みは、AOM投与後8時間において減少する傾向にあるが、3日後には有意

に増加し、7日後にはコントロールと同レベルであった。一方PCNA染色陽性細胞数の変化は、AOM投与後8時間では変化は見られないが、3日後に有意に増加し、7日後にはコントロールレベルとなった。細胞分裂数の変化は、AOM投与後8時間で有意に減少し、3日後・7日後には増加する傾向にあった。

c) 陰窩を構成する細胞数は、AOM投与後8時間ではコントロールに比して変化は見られないが、3日で有意に減少し、7日で有意に増加した。

d) AOM投与後に誘発される死細胞には、BrdUの取り込みはみられないがPCNA陽性を伴うものが数多く存在した。

e) これらのAOMによる細胞増殖の抑制を伴う細胞除去、その後の細胞増殖の亢進という変化はproximal colonよりもdistal colonのほうが顕著であった。

以上より、AOMによって引き起こされる大腸粘膜上皮の変化はアポトーシスによる細胞死であると考えた。AOM投与直後に細胞分裂数が顕著に抑制されたことより、AOM投与後のアポトーシスの発現には細胞周期のG2期での停止が関与する可能性が示唆された。また、AOM投与後のPCNAとBrdUの染色結果に差があったことから、PCNAの結果はAOM投与直後の細胞増殖を正確に反映していない可能性があり、これはPCNAが細胞増殖のみでなくDNA修復にも関係するという最近の報告に一致する興味深い結果であると考えた。

実験2)

a) Western blot法では、AOM誘発の大腸癌は非腫瘍部粘膜に比べて有意にbcl-2蛋白の発現が少なかった(0.6 fold; $p < 0.001$)。Bax蛋白については、非腫瘍部に比べ大腸癌で有意に発現が高かった(7.33 fold; $p < 0.001$)。Bcl-XLは非腫瘍部に比べ大腸癌で有意な発現上昇がみられた(3.23 fold; $p < 0.001$)。また、Bcl-XSの発現は認めなかった。

b) 生食のみ投与のラットの大腸粘膜と、AOMで処置されたラットの大腸(非腫瘍部)粘膜を比べると、Bcl-2, Bax, Bcl-Xのいずれにも有意な発現の差はなかった。

c) 免疫染色では大腸癌細胞の細胞質にBaxやBcl-Xの強い陽性像を認めた。

以上より、AOM誘発のラット大腸癌においては、アポトーシス関連蛋白(Bcl-2, Bax, Bcl-X)の発現が非腫瘍部に比し大きく変化していることがわかった。アポトーシス耐性という面からこの結果を見てみると、Bcl-XLの発現増加が重要な意味を持っていることが示唆された。また、これらのアポトーシス関連蛋白の変化は最近報告されたヒト大腸癌での変化に類似しており、この動物モデルはヒト大腸癌におけるアポトーシスの役割を探るうえで良いモデルになると考えた。

論文審査の結果の要旨

申請者 廣瀬善信は、化学発癌剤(AOM)投与直後のラット大腸粘膜におけるアポトーシスと細胞増殖を詳細に検索し、細胞増殖の抑制を伴うアポトーシスの導入、その後の細胞増殖の亢進という変化を明らかにした。また、AOM誘発ラット大腸癌におけるアポトーシス関連蛋白(Bcl-2・Bax・Bcl-XL)の発現異常を明らかにした。本研究の成果は、発癌過程とアポトーシスの関係の解明の一助となるものであり、腫瘍病理学の進歩に少なからず貢献するものと認められる。

[主論文公表誌]

(I) Early Alterations of Apoptosis and Cell Proliferation in Azoxymethane-initiated Rat Colonic Epithelium

Japanese Journal of Cancer Research 87 (6) : 575~582

(II) Expression of Bcl-2, Bax and Bcl-XL proteins in the azoxymethane-induced rat colonic adenocarcinomas

Molecular Carcinogenesis : in press