

Title	Overexpression of Bcl-2 protects human hepatoma cells from Fas-antibody-mediated apoptosis.
Sub Title	ヒト肝癌細胞におけるFas誘導性アポトーシスに対するBcl-2の効果
Author	高橋, 正彦(Takahashi, Masahiko)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.2 (2003. 6) ,p.26-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030602-0026">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030602-0026</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# Overexpression of Bcl-2 protects human hepatoma cells from Fas-antibody-mediated apoptosis.

(ヒト肝癌細胞におけるFas誘導性アポトーシスに対するBcl-2の効果)

高 橋 正 彦

## 内容の要旨

背景/目的: Fas抗原はアポトーシス誘導シグナルを細胞内へ伝達する細胞表層上の分子として同定され、Fasリガンド (FasL) や抗Fas抗体の刺激によって、Fas発現細胞にアポトーシスを誘導する。一方、*bcl-2*遺伝子は様々なアポトーシス誘導刺激を抑制することが報告されている。本研究は肝癌細胞株におけるFas誘導性アポトーシスに対するBcl-2の効果を検討することを目的とする。

方法: 実験にはヒト培養肝癌細胞株HepG2及びHCC-Tを使用した。細胞表面に存在するFas抗原発現はフローサイトメトリー法で、Bcl-2の発現はウエスタンブロッティング法を用いて検出した。抗Fas抗体およびアンチセンスオリゴヌクレオチド添加後に細胞生存率とアポトーシスの検索を行った。アポトーシスの検出はHoechst 33342による形態学的観察及びTUNEL法で行った。Bcl-2発現によって、HepG2細胞がFas誘導性アポトーシスに抵抗性となるかどうかを調べるために、HepG2を*Lac-Z*と*bcl-2*遺伝子が同時に発現するレトロウイルスベクターLZBCに感染させた。さらにHepG2でのFas誘導性アポトーシスに対するBcl-2の抑制効果を調べるために、ヒト*bcl-2*遺伝子を発現するプラスミドベクターを作成し、Bcl-2を持続的に発現する細胞株をクローニングした。

結果: ウエスタンブロッティングではHCC-Tに内因性Bcl-2の発現が認められたが、HepG2では検出不能であった。HCC-TはFas誘導性アポトーシスに抵抗性であったがHepG2細胞の33%はFas刺激によってアポトーシスを生じた。HCC-Tは*bcl-2*に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドのトランスフェクションによって、Fasによる刺激なしにアポトーシスを生じたことより、Bcl-2はこの細胞において細胞の生存のために必須の遺伝子であると考えられた。LZBC感染HepG2細胞において、X-galによる染色では10%がβ-ガラクトシダーゼ活性陽性を示した。抗Fas抗体添加によりX-gal陽性細胞の比率は10%から50%へと明らかに増加し、生存細胞のライセートにおけるβ-ガラクトシダーゼ活性も6倍高値を示したことから、Bcl-2を発現する肝癌細胞はFas誘導性アポトーシスに対し抵抗性を示すことが明らかになった。HepG2細胞にBcl-2を遺伝子導入して作成した細胞株Hep-Bclも、Fas誘導性アポトーシスに抵抗性を示した。

結論: Bcl-2の発現により培養肝癌細胞においてFas誘導性のアポトーシスは抑制され、ある種の細胞株においてBcl-2は生存に必須であることが示された。ウイルス性肝炎はFas誘導性のアポトーシスが関与していることから、Bcl-2の発現は肝炎、肝硬変を母地とする肝細胞癌の発症進展に関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

*bcl-2*遺伝子産物は、様々なアポトーシス誘導刺激に対して保護作用を示すことが報告されているが、Fas誘導性アポトーシスに対するBcl-2の抑制効果に関しては、一定の見解は得られていない。C型ウイルス肝炎においてはFas誘導性アポトーシスの関与が報告され、また肝癌はC型慢性肝炎、肝硬変を母地として発生することから、Bcl-2遺伝子を獲得した肝細胞がFas誘導性アポトーシス刺激を回避することによって生存し、癌化要因の1つとなっている可能性が考えられる。本研究で著者は内因性Bcl-2を発現するヒト肝癌細胞株HCC-TはFas誘導性アポトーシスに抵抗性であり、また*bcl-2*遺伝子導入により、ヒト肝癌細胞株HepG2のFas誘導性アポトーシスが抑制されることを示した。ヒトBcl-2 mRNAに対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド投与によるBcl-2発現抑制では、HCC-Tに対してFasの刺激なしでアポトーシスを誘導することを示した。

審査では、まずレトロウイルスの誘導効率が低いことが指摘され、実験結果に支障はないものの今後の課題であると回答された。ヒトBcl-2を遺伝子導入したHep-Bcl細胞のBcl-2発現量が低いことが指摘され、また発現の強弱で複数の細胞を選んで実験すべきとの指摘があった。Hep-Bcl細胞の発現量は比較的低値であったがFas誘導性アポトーシスは抑制されており、HepG2ではBcl-2発現量は十分であった可能性があるが、今後HepG2で高発現するプロモーターの選択など改良すべき点があると回答された。また、コントロールには目的遺伝子を含まないプラスミドのみを導入したMOCK細胞が望ましいと指摘された。Bcl-2 mRNAに対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド投与のみでHCC-Tにアポトーシスが誘導されるメカニズムについて質問があった。Bcl-2はミトコンドリアに存在しアポトーシスを抑制しているが、HCC-TにおいてはBcl-2がアポトーシス抑制だけでなく、細胞の生存に必要なミトコンドリア機能も抑制している可能性があるという回答された。今後アポトーシス細胞のミトコンドリア膜電位の低下を調べるべきとの指摘がなされた。次に本研究の臨床応用への展望について質問があった。まず肝癌細胞におけるFas誘導性アポトーシスに対するBcl-2の抑制効果について解析し、その結果をもとにアンチセンスオリゴヌクレオチド投与によるBcl-2発現抑制で肝癌にアポトーシスを誘導できる可能性があるという回答された。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題を残しているものの、肝癌細胞株におけるFas誘導性アポトーシスはBcl-2の発現により抑制されることを明らかにし、Bcl-2陽性肝癌においてはBcl-2に対する遺伝子治療の可能性を示した点で肝臓学上有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 石井 裕正  
外科学 北 島 政樹 医化学 末松 誠  
病理学 坂 元 亨宇 病理学 岡田 保典  
学力確認担当者: 北島 政樹  
審査委員長: 北島 政樹

試問日: 平成15年2月18日