



Gastrin Receptor Gene Expression in Several Human Carcinomas

松島, 由美

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1455

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001455>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



| | | |
|------------|--|-------|
| 氏名・(本籍) | まつ しま ゆ み 松 島 由 美 | (兵庫県) |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (医 学) | |
| 学位記番号 | 博い第987号 | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 | |
| 学位授与の日付 | 平成8年3月31日 | |
| 学位論文題目 | Gastrin Receptor Gene Expression in Several Human Carcinomas (ヒト癌におけるガストリン遺伝子の発現) | |

| | | |
|---------|-------|------------------|
| 審 査 委 員 | 主査 教授 | 千 葉 勉 |
| | 教授 | 齋 藤 洋 一 教授 前 田 盛 |

論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

胃酸分泌刺激因子として知られるガストリンは、正常もしくは腫瘍組織の増殖促進作用を持つという報告がある。実際、Zollinger-Ellison症候群やA型萎縮性胃炎など高ガストリン血症を呈する疾患では、ECL細胞を中心とする胃粘膜上皮細胞の過形成や腫瘍化が認められることが報告されている。またある種の胃及び大腸癌さらに肺小細胞癌の増殖をガストリンが促進するという報告がなされており、癌細胞の増殖をガストリンがその受容体を介して促進する可能性があるといわれている。しかし現在まで、これらの腫瘍におけるガストリン受容体遺伝子の発現について検討した報告はない。

今回我々は胃、大腸癌組織および胃、大腸癌細胞株さらに肺小細胞細胞株にガストリン受容体遺伝子が発現しているか否かを検討し、また細胞株に対するガストリンによる腫瘍増殖効果を検討した。

【実験材料および方法】

1) 腫瘍検体および細胞株

外科的切除検体より、胃癌組織8例、大腸癌組織10例および、胃癌細胞株14株：高分化型腺癌(MKN-1, MKN-7 MKN-28, MKN-74, GCIY, HCG27), 低分化型腺癌(KATOⅢ, MKN-45, OKAJ IMA, TMK-1, HSK-TC), 不明(AGS), 内分泌細胞癌(ECC10, ECC12) 大腸癌細胞株8株：(COLO201, COLO205, COLO320DM, COLO320HSR, DLD-1, HT29, LoVo, SW403) 肺小細胞癌細胞株7株：(H60, Lu134A, Lu134B, Lu135, Lu139, PC6, PC14)を使用した。

2) RNA抽出

胃、及び大腸癌の手術検体は、切除後直ちに液体窒素にて凍結し-80度に保存した。使用時に液体窒素内で粉碎し、GTCを加えホモジネートした後、セシウムクロライド法でRNAを抽出した。細胞株については約 5×10^7 個の培養細胞をPBSで洗浄した後GTCを加え、同様にRNAを抽出した。

3) ノーザン法

得られたRNAについて、ヒトガストリン受容体cDNAをプローベとしてRandom prime labeling

kit(Boeringer-Mannheim, Germany)を使用し、ノーザンブロット法によりガストリン受容体遺伝子の発現を検討した。

4) シークエンシング

RNAよりRT-PCRによりcDNAを合成し、Super Script Pre-amplification system(Bethesda Research Laboratories Inc., Gaithersburg, MD)を使用し、塩基配列を解析した。

5) DNA合成試験

細胞株の増殖を検討するため [^3H] -thymidineのDNAへの取り込み実験をおこなった。細胞培養液中に、種々の濃度のガストリンを添加し、37°Cで24時間培養後に [^3H] -thymidineを加え、4時間後に6%trichloroacetic acidを加え、エタノールで洗浄後、液体シンチレーションカウンターで、放射能活性を測定した。

【結果】

1) ノーザン法

ノーザン法により、肺小細胞癌細胞株7株中3株(H60, Lu134A, Lu135)、大腸癌細胞株8株中1株(LoVo)、胃内分泌細胞癌細胞株2株中1株(ECC10)、大腸癌組織10例中2例にガストリン受容体遺伝子の発現を認めた。しかし胃腺癌細胞株12株および胃癌組織8例についてはガストリン受容体遺伝子の発現は認めなかった。

2) シークエンシング

LoVo, ECC10についてそれぞれ、ガストリン受容体のcDNA, open reading frameの塩基配列を解析したところ、コントロールであるヒト脳におけるガストリン受容体の塩基配列と同一であった。

3) DNA合成試験

COLO201, COLO205, LoVo, ECC10について、ガストリンによる [^3H] -thymidineのDNAへの取り込みを検討した。ノーザン法によりガストリン受容体の発現を認めなかったCOLO201, COLO205については、ガストリン添加による細胞の増殖促進効果は認めなかった。一方ガストリン受容体の発現を認めたLoVo, ECC10については、LoVoにのみ $10^{-8}\sim 10^{-6}\text{M}$ の濃度でガストリン添加による細胞の増殖促進効果を認めた。

【考察】

今回の我々の検討では、肺小細胞癌細胞株、大腸癌組織および細胞株、胃内分泌細胞癌細胞の一部にガストリン受容体遺伝子の発現を認めた。

肺小細胞癌細胞株にガストリン受容体遺伝子が発現していることについては、最近のSethiらの報告を裏付けるものである。また肺小細胞癌は、Gastrin-releasing peptide(GRP)や、ガストリンを産生しているという報告もあり、GRP、ガストリンが肺小細胞癌のオートクリン因子である可能性が示唆される。

大腸癌細胞株および大腸癌組織の一部にガストリン受容体遺伝子を認め、大腸癌細胞株LoVoがガストリンにより増殖促進されることについては、現在のところ適当な解釈がなく、今後の研究が待たれる。

胃の腺癌細胞の細胞株および組織にはガストリン受容体遺伝子の発現を認めなかったが、胃内分泌細胞癌細胞株にガストリン受容体遺伝子の発現を認めた。胃内分泌細胞癌は胃小細胞癌ともよばれ、肺小細胞癌に対する胃の相対物と考えられるが、その生物学的相対性については明らかではない。今回胃内分泌細胞癌細胞株においてガストリン受容体遺伝子の発現を認めたことはこれらが類似した性

格を有することを示唆する。

また胃内分泌細胞癌細胞株ECC10の由来する癌組織には腺癌の組織成分も認められたことより、ECC10は腺癌より内分泌細胞癌へ分化の過程を経たものと推察されている。我々の検討ではECC10は、ガストリン添加により増殖促進されなかった。このことより、ガストリン受容体はECC10については、増殖因子というより分化を反映する徴候と考える。

【結語】

1) ノーザン法により、肺小細胞癌細胞株、大腸癌組織および細胞株、胃内分泌細胞癌細胞株の一部にガストリン受容体遺伝子の発現を認めた。

2) 大腸癌細胞株LoVo、胃内分泌細胞癌細胞株ECC10のガストリン受容体遺伝子の遺伝子配列には異常は認めなかった。

3) 大腸癌細胞株LoVoはガストリンにより増殖が促進された。

論文審査の結果の要旨

胃酸分泌刺激因子として知られるガストリンは、正常もしくは腫瘍組織の増殖促進作用を持つという報告がある。実際、Zollinger Ellison症候群やA型萎縮性胃炎など高ガストリン血症を呈する疾患では、ECL細胞を中心とする胃粘膜上皮細胞の過形成や腫瘍化が認められることが報告されている。またある種の胃及び大腸癌さらに肺小細胞癌の増殖をガストリンが促進するという報告がなされており、癌細胞の増殖をガストリンがその受容体を介して促進する可能性があるといわれている。しかし現在まで、これらの腫瘍におけるガストリン受容体遺伝子の発現について検討した報告はなかった。

本研究者は胃、大腸癌組織および胃、大腸癌細胞株さらに肺小細胞癌細胞株の一部にガストリン受容体遺伝子が発現していることをはじめて見出した。またガストリン受容体遺伝子が発現している細胞株についてガストリンによる腫瘍増殖効果を検討し、ある大腸癌細胞株(LoVo)はガストリンの添加によりその増殖が促進されることを示した。

外科的切除検体(胃癌組織8例、大腸癌組織10例)及び、胃癌細胞株14株(胃腺癌細胞株12株、胃内分泌細胞癌細胞株2株)、大腸癌細胞株8株、肺小細胞癌細胞株7株よりRNAを抽出し、得られたRNAについて、ヒトガストリン受容体cDNAをプローブとしてノーザンブロット法を行い、肺小細胞癌細胞株中3株(H60, Lu134A, Lu135)、大腸癌細胞株8株中1株(LoVo)、胃内分泌細胞癌細胞株2株中1株(ECC10)、大腸癌組織10例中2例にガストリン受容体遺伝子が発現していることを示した。しかし胃腺癌細胞株12株及び胃癌組織8例についてはガストリン受容体遺伝子の発現は認めなかった。またLoVo、ECC10のRNAよりRT-PCRによりcDNAを合成し、ガストリン受容体のcDNA, open reading frameの塩基配列を解析したところ、コントロールであるヒト脳におけるガストリン受容体の塩基配列と同一であった。

そこで次に、ガストリンによる細胞株の増殖を検討するため [^3H] -thymidineのDNAへの取り込み実験を行った。その結果、ノーザン法によりガストリン受容体の発現を認めなかったCOLO201、COLO205については、ガストリン添加による細胞の増殖促進効果は認めなかった。

一方ガストリン受容体の発現を認めたLoVo、ECC10について検討したところ、LoVoにのみガストリン添加による細胞の増殖促進効果を認めたが、ECC10では効果が認められなかった。

以上のように本研究者はガストリン受容体が肺小細胞癌細胞株，大腸癌組織及び細胞株，胃内分泌細胞癌細胞株の一部に発現していることを明らかにし，ガストリンがガストリン受容体を介して，これらの癌の増殖を促進している可能性を示唆した。

以上，本研究はガストリン受容体遺伝子について，そのヒト腫瘍における発現を研究したものであるが，従来ほとんど行われなかった，ヒト・ガストリン受容体の腫瘍における意義について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって，本研究者は，博士（医学）学位を得る資格があると認める。