



| | |
|--------------|---|
| Title | Loss of p73 induction in a cisplatin-resistant bladder cancer cell line |
| Author(s) | 小野, 豊 |
| Citation | 大阪大学, 2001, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/42609 |
| 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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

| | |
|------------|---|
| 氏名 | 小野 <small>おの</small> <small>ゆたか</small> 豊 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 第 16108 号 |
| 学位授与年月日 | 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 医学系研究科外科系専攻 |
| 学位論文名 | Loss of p73 induction in a cisplatin-resistant bladder cancer cell line (シスプラチン耐性膀胱腫瘍細胞株における p73 蛋白の誘導の消失) |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 奥山 明彦 (副査) 教授 宮坂 昌之 教授 金倉 譲 |

論文内容の要旨

【目的】

p53 遺伝子は CDDP を含む抗癌剤による apoptosis 誘導の経路において中心的な働きをする遺伝子と報告されている。一方、膀胱腫瘍においては p53 遺伝子の異常が40%から60%以上との報告があるにもかかわらず、MVAC (MTX、VLB、ADM、CDDP) 療法など化学療法の有効率は70%以上である。このことは、抗癌剤の膀胱腫瘍に対する作用機序において p53 を介さない経路も働いていることを示唆している。今回、MVAC 療法の中で中心的な働きをしていると考えられる CDDP に対する耐性株を p53 蛋白の発現していない膀胱癌細胞株である T24 細胞より作成し、その耐性株の性質の解析を行うとともに膀胱腫瘍細胞株における CDDP による p53-independent の apoptotic pathway について検討した。

【方法ならびに成績】

膀胱癌細胞株 T24 を用い CDDP の濃度を増量しながら継代し CDDP 耐性細胞を 5 clone 作成した。2 × 10⁴ 個の細胞を CDDP 非存在下及び、8 μg/ml の CDDP 存在下で培養し、細胞増殖曲線を検討した。T24 親株は CDDP により 6 日目にはほぼ死滅するが、耐性株は全て増殖し得た。特に clone 8-2、10-3 は CDDP の有無にかかわらず同じような増殖曲線を示した。次に CDDP 8 μg/ml 存在下で 48 時間培養後、Hoechst stain を行い apoptotic cell をカウントした。親株ではクロマチンの凝集を示す apoptotic cell が 42.7% 見られるのに対し耐性株では減少していた。特に clone 8-2 では apoptosis はほとんど観察されなかった。

他の抗癌剤に対する交叉耐性を調べるために、MVAC 療法で用いられる各薬剤存在下で 48 時間培養し、MTT アッセイにより各薬剤に対する感受性を調べた。IC₅₀ で検討すると MTX では 4.7 倍、VLB では 14.0 倍、ADM では 4.8 倍、CDDP では 6.4 倍親株に比べ clone 8-2 は耐性を示した。

ところで CDDP は代表的な DNA damaging agent であり、CDDP が解毒されず十分細胞内に蓄積されれば、まず MLH1、MSH2 などの DNA 修復遺伝子を活性化する。そこで CDDP 8 μg/ml 存在下で親株および耐性株を培養し、MLH1、MSH2 の発現量の経時的変化を Western blot により調べたところ、どちらの細胞でも DNA 修復遺伝子は十分に発現しており、特に MSH2 は顕著に CDDP により誘導が見られた。以上よりこの耐性の原因は DNA 修復遺伝子そのものではなく、その下流にあると推測した。そこで最近 DNA 修復遺伝子により活性化されることが報告された p53-related gene である p73 の誘導能を検討した。親株では CDDP により p73 蛋白の誘導

が見られたのに対し、耐性株では p 73 蛋白の誘導が消失していた。またどちらの細胞でも p 53 蛋白の発現は認めなかった。

P 53 は主として caspase-8 を介する経路が重要な働きをするといわれているが、p 73 と caspase との関係はまだまだ詳細な報告はない。そこで p 73 の下流にあると考えられる caspase に関して、その initiator として代表的な caspase-8 及び-9 の活性を、effector として caspase-3 の活性を調べた。親株ではいずれも CDDP によりその活性化が認められたが、耐性株ではそのいずれもが消失していた。

【総括】

P 53 蛋白の発現していない膀胱癌細胞株 T 24 より、CDDP 耐性株を作成し、この CDDP 耐性株は MTX、ADM、VLB にも交差耐性を示した。

膀胱癌細胞株の CDDP による apoptosis には、p 53-independent な経路として p 73 を介した caspase の経路が一役を担っていると考えられるが、CDDP 耐性株においてはこの経路、特に p 73 の誘導に障害があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

膀胱癌におけるシスプラチン耐性の獲得は、臨床上の大きな問題となっているにもかかわらず、その機序については不明な点が多い。当該論文において、p 53 蛋白の発現が見られないシスプラチン耐性膀胱癌細胞株を作成し、シスプラチンによる p 73 蛋白誘導の消失、及びそれに引き続くカスベースの活性化の消失がシスプラチン耐性獲得の一つの機序であることが示されている。本研究は臨床上におけるシスプラチン耐性の獲得機序の解明につながるものであり、学位の授与に値すると考えられる。