



Title	Loss of one allele of the p53 gene in the lens epithelial tumor in transgenic mice suppress apoptosis induced by a topoisomerase I inhibitor(CPT-11)
Author(s)	中嶋, 康雄
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43807
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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	なか じま やす お 雄 中 嶋 康 雄
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 9 0 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 14 年 3 月 25 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 one allele of the <i>p53</i> gene in the lens epithelial tumor in transgenic mice suppress apoptosis induced by a topoisomerase I inhibitor (CPT-11) (マウス水晶体上皮性腫瘍における CPT-11を用いたアポトーシス誘導の検討 (<i>p53</i> 遺伝子座の欠損による影響の比較))
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 村 田 雄 二 (副査) 教 授 野 村 大 成 教 授 宮 崎 純 一

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

アポトーシスは遺伝子で制御された細胞死で、DNA に損傷を与える物質により誘導される。特に癌治療の場合抗癌剤でアポトーシスが誘導される事が知られており、誘導されるアポトーシスは抗癌剤の種類や投与量に依存する。一方癌抑制遺伝子 *p53* の DNA 損傷に対する反応の主要な経路は、アポトーシス誘導と細胞周期 G1/S 期の停止である。塩酸イリノテカン (CPT-11) は topoisomerase I 阻害剤である camptothecin の誘導体で、代謝されて活性型の SN-38 に変わることにより抗腫瘍効果を発現する。今回我々は野生型 *p53* 遺伝子をもつマウス水晶体上皮性腫瘍と、*p53* の遺伝子座を欠損したマウス水晶体上皮性腫瘍を用いて、CPT-11により誘導されるアポトーシスがどのように変化するのかを、薬剤投与量および *p53* 遺伝子量を変えることにより in vivo で比較検討した。

【方法】

- ①SV40 T 抗原をマウス水晶体上皮に発現させ水晶体上皮腫瘍を発症するマウス α T3 と *p53* ノックアウトマウスを交配することにより α T3+/- (ヘテロ欠損型 *p53*) マウスを作製した。さらにこの α T3+/- マウスを交配することにより *p53* 対立遺伝子座の異なる次の3タイプのマウス α T3+/+ (野生型 *p53*)、 α T3+/-、 α T3-/- (ホモ欠損型 *p53*) を作製し、継代維持した。
- ②それぞれのマウスの妊娠18日目に CPT-11 を腹腔内に投与した。投与量は CPT-11 400mg/kg (1/2 MTD)、および 200mg/kg とした。薬液量は 1 ml/body 以下とした。対照として生理食塩水を用いた。
- ③投与24時間後に胎仔を腹腔内より摘出し、まず Hematoxylin-Eosin 染色にてアポトーシス小体を観察した。次に免疫組織染色法にて3タイプのマウスで *p53* 蛋白の発現量が異なることを確認した。最後に組織内でのアポトーシスの検出のために、TUNEL (Terminal-deoxynucleotidyltransferase mediated dUTP-biotin Nick End Labeling) 法を施行し、水晶体腫瘍表層より10層以内で、中心壊死部位を含まない部分に存在する TUNEL 陽性細胞を数え、腫瘍細胞あたりのアポトーシス陽性細胞の割合を調べた。

【成績】

水晶体腫瘍の平均アポトーシス誘導率を400mg/kg 投与群、200mg/kg 投与群、および対照群それぞれで比較検

討した。400mg/kg 投与群では α T3+/+、 α T3+/-、 α T3-/-それぞれで、5.5%、2.9%、1.8%、200mg/kg 投与群では3.2%、2.3%、1.2%とアポトーシスが誘導されたのに対し、対照群では0.3%、0.2%、0.2%とアポトーシスは誘導されなかった。これらの結果から、先ずアポトーシス誘導はCPT-11の薬剤投与量に比例して増加することが明らかとなった。次に400mg/kg 投与群、200mg/kg 投与群、いずれの群においても *p53* 遺伝子量に比例してアポトーシス誘導の増加することが明らかとなった。そして400mg/kg 投与群、200mg/kg 投与群の α T3-/-の結果から、*p53* 遺伝子の全く欠失した環境下においてもCPT-11はアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

【総括】

マウス水晶体上皮腫瘍における、アポトーシス誘導には *p53* の遺伝子量が強く関係していることが明らかになった。つまり野生型 *p53* と、ヘテロ欠損型 *p53* の間にもアポトーシス誘導に有意差を認め、これは *p53* 遺伝子座の一方が欠損するだけでもアポトーシス誘導能が低下するということが示唆された。一方CPT-11には *p53* 遺伝子に依存しないアポトーシス誘導経路の存在することが明らかになった。これはCPT-11が *p53* 依存性の抗癌剤に抵抗性の腫瘍にも効果があることが期待される。

論文審査の結果の要旨

抗癌剤により、固形腫瘍にアポトーシスが誘導されることはよく知られているが、その機序は不明な点が多い。

本論文において著者、中嶋康雄は、癌抑制遺伝子 *p53* と、topoisomerase I inhibitor であるカンプトテシンの誘導体で、日本で開発された抗癌剤CPT-11に着目した。そこでマウス水晶体上皮性腫瘍を発生させるマウスと *p53* ノックアウトマウスを用いて、*p53* 遺伝子背景の異なる腫瘍発生モデルマウスを作製した。これらのマウスに対し抗癌剤CPT-11を投与して次の結果を得た。CPT-11は *p53* 癌抑制遺伝子に依存する経路と依存しない経路でアポトーシスを誘導する。CPT-11によるアポトーシス誘導は *p53* 遺伝子量に依存的で、*p53* ヘテロ欠損でも減少する。前者については、*in vivo* の実験系では初めての報告であり、後者については全く初めての報告であった。

本論文は十分に新しい知見を含み、学位論文に値するものと認める。