The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Adenovirus-mediated p53AIP1 gene transfer as a new strategy for treatment of p53-resistant tumors
Author(s)	吉田, 浩二
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45480
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【89】

氏　　名	吉　田　浩　二（よし だ こう じ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　１９３２２　号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学　位　論　文　名	Adenovirus-mediated *p53AIP1* gene transfer as a new strategy for treatment of p53-resistant tumors **（p53 抵抗性腫瘍に対する新治療戦略、アデノウィルスを用いた *p53AIP1* 遺伝子導入）**
論文審査委員	（主査） 教　授　門田　守人 （副査） 教　授　青笹　克之　　教　授　野口眞三郎

論　文　内　容　の　要　旨

［ 目的 ］

p53 はヒト癌に多くの mutation が報告されている重要な癌抑制遺伝子である。p53 は転写因子であり、細胞周期に関わる $p21^{waf1}$ やアポトーシスに関わる *Bax*、*p53AIP1*、*Noxa*、*PUMA* など様々な下流遺伝子を活性化させて機能を発揮するが、一方で DNA 修復に関わる *p53R2* などのように全く相反する機能を有する下流遺伝子も存在する。p53 は細胞を生存に導くのか、細胞死（アポトーシス）に導くのかを、リン酸化修飾などにより下流遺伝子の発現を調節し決定していると考えられている。なかでも *p53AIP1* は、細胞が修復不可能な強い DNA ダメージを受けた際 p53 Ser46 がリン酸化され、その発現が誘導されるアポトーシス実行因子である。*p53* 遺伝子治療の臨床治験も行なわれているが、ある種の癌は p53 依存性アポトーシスに対して抵抗性である。それは p53 が多様な機能を持つため *p53* 遺伝子を導入しても必ずしも細胞をアポトーシスに導くとは限らないためと推測される。今回、*p53AIP1 遺伝子*を癌細胞へ導入し、アポトーシス誘導能の有効性を in vivo、in vitro で *p53* 遺伝子導入と比較検討した。

［ 方法ならびに成績 ］

〈in vitro 実験〉*p53AIP1*、*p53*、*lacZ* 遺伝子を組込んだアデノウイルス（Ad-p53AIP1、Ad-p53、Ad-lacZ）を、ヒト癌細胞株 30 種に 80MOI で感染させ 96 時間後に細胞を回収、FACS にて Sub-G1 population を測定しアポトーシス誘導能を評価した。30 種の癌細胞株のうち 20 種で Ad-p53AIP1 感染により 15%以上の Sub-G1 値を認め、うち 12 種類は Ad-p53 と比較して高い値を示した。中でも、LS174T（+/+）、A549（+/+）などは、Ad-p53 では全くアポトーシスが誘導されなかったが、Ad-p53AIP1 により 50%以上の Sub-G1 値を示す著明なアポトーシスが誘導された。*p53* 遺伝子導入をした際の p53AIP1mRNA の発現をノザンブロットで検討すると LS174T（+/+）と A549（+/+）では発現は誘導されず、アポトーシスも誘導されなかった。さらに p53 感受性株 H1299（p53-null）、p53 抵抗性株 LS174-T（+/+）に Ad-p53、Ad-p53AIP1 を同時に共感染させると、アポトーシス誘導に相乗効果が認められた。

〈in vivo 実験〉ヌードマウス皮下に H1299（p53-null）1×10^6 個を注射して xenograft を作製し、腫瘍径が 100-300

mm^3 に達した時点で Ad-p53AIP1、Ad-p53、Ad-EGFP を 1×10^9 puf ずつ腫瘍へ連日 5 回投与し、その後の腫瘍径を測定した。16 日目の平均腫瘍重量は Ad-p53AIP1 投与群では 183 mg、p53 投与群では 202 mg、コントロール群では 1028 mg と、Ad-p53AIP1 は Ad-p53 同様の高い腫瘍増殖抑制効果を示した。Ad-p53AIP1、Ad-p53 を投与した腫瘍切片は、TUNEL 染色にて細胞がアポトーシスに陥っていることが確認された。p53 抵抗性株の LS174T（+/+）でも Ad-p53AIP1 投与により腫瘍増殖抑制傾向を認めた。

［ 総括 ］

p53AIP1 は p53 下流遺伝子の一つで、p53 のアポトーシス実行因子である。アデノウィルスを用いて様々な癌種の細胞株に *p53AIP1* 遺伝子を導入したところ、約 60%の細胞株でアポトーシスが誘導された。野生型 *p53* を持つ癌細胞株の多くは p53 依存性アポトーシス抵抗性と考えられたが、*p53AIP1* 遺伝子導入により効果的にアポトーシスが誘導される株が存在した。p53 抵抗性株の LS174T（+/+）と A549（+/+）は、*p53* 遺伝子を導入してもアポトーシスは誘導されず、p53AIP1mRNA の発現も誘導されなかったが、*p53AIP1* 遺伝子を導入するとアポトーシスが誘導された。さらに *p53* 遺伝子と *p53AIP1* 遺伝子の共導入は、アポトーシス誘導に相乗効果を認めた。ヌードマウス皮下腫瘍モデルにおいては、*p53AIP1* 遺伝子の腫瘍内局所導入は腫瘍増殖を抑制した。

p53 のアポトーシス実行因子 *p53AIP1* の遺伝子導入が、p53 依存性アポトーシス抵抗性癌に対して有効である可能性が示された。*p53AIP1* 遺伝子導入が *p53* 遺伝子の代用となり得る可能性を示唆するものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

p53 は様々な下流遺伝子を活性化させてその機能を発揮し、細胞を生存に導くか、細胞死（アポトーシス）に導くかを、リン酸化修飾などにより下流遺伝子の発現を調節し決定していると考えられている。*p53AIP1* は細胞が修復不可能な強い DNA ダメージを受けた際、Ser46 がリン酸化され発現が誘導されるアポトーシス実行因子である。*p53* 遺伝子治療の臨床治験も行なわれているが、ある種の癌は p53 依存性アポトーシスに対して抵抗性である。それは p53 が多様な機能を持つため *p53* 遺伝子を導入しても必ずしも細胞をアポトーシスに導くとは限らないためと推測される。本研究では、*p53AIP1 遺伝子*を癌細胞へ導入し、アポトーシス誘導能の有効性を in vivo、in vitro で *p53* 遺伝子導入と比較検討した。

p53AIP1、*p53*、*lacZ* 遺伝子を組込んだアデノウイルス（Ad-*p53AIP1*、Ad-*p53*、Ad-*lacZ*）を、ヒト癌細胞株 30 種に 80MOI で感染させ 96 時間後に細胞を回収、FACS にてアポトーシス誘導能を評価した。30 種の癌細胞株のうち 20 種で Ad-*p53AIP1* 感染により 15%以上の Sub-G1 値を認め、うち 12 種類は Ad-*p53* と比較して高い値を示したが、中でも、LS174T（+/+）、A549（+/+）などは、Ad-*p53* では全くアポトーシスが誘導されないにもかかわらず、Ad-*p53AIP1* により 50%以上の Sub-G1 値を示す著明なアポトーシスが誘導された。*p53* 遺伝子導入をした際の p53AIP1mRNA の発現をノザンブロットで検討すると LS174T（+/+）と A549（+/+）では発現は誘導されず、アポトーシスも誘導されなかった。さらに p53 感受性株 H1299（p53-null）、p53 抵抗性株 LS174-T（+/+）に Ad-*p53*、Ad-*p53AIP1* を同時に共感染させると、アポトーシス誘導に相乗効果が認められた。

ヌードマウス皮下に H1299、LS174T を用いて xenograft を作製し、Ad-*p53AIP1*、Ad-*p53*、Ad-*EGFP* を 1×10^9 puf ずつ腫瘍へ連日 5 回投与し、その後の腫瘍径を測定した。16 日目の平均腫瘍重量は Ad-*p53AIP1* 投与群 183 mg、Ad-*p53* 投与群 202 mg、コントロール群 1028 mg と、Ad-*p53AIP1* は Ad-*p53* 同様の高い腫瘍増殖抑制効果を示した。また、*p53* 抵抗性株の LS174T（+/+）でも Ad-*p53AIP1* 投与により腫瘍増殖抑制傾向を認めた。

以上の研究から、*p53* の下流遺伝子でアポトーシス実行因子である *p53AIP1* の遺伝子導入が、*p53* 依存性アポトーシス抵抗性癌に対して有効である可能性が示された。本研究は、より有効な遺伝子治療の開発や *p53* の機能解析に大きく寄与する事が期待されるものであり、学位の授与に値するものと考えられる。