



Title	Role of p21waf1/cip1 in effects of oxaliplatin in colorectal cancer cells
Author(s)	畑, 泰司
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47398
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

氏 名	畑 泰 司
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 0 6 5 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 9 月 20 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Role of p21 ^{waf1/cip1} in effects of oxaliplatin in colorectal cancer cells (大腸癌細胞に対する oxaliplatin の効果発現に際して p21 ^{waf1/cip1} 遺伝子が果たす役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人 (副査) 教 授 野 口 眞 三 郎 教 授 金 倉 謙

論 文 内 容 の 要 旨

(目的) 新規白金製剤である oxaliplatin は 5-FU/leucovorin との併用で大腸癌に対して高い臨床効果をもたらす。Oxaliplatin の薬剤特性として platinum-DNA adduct 形成による細胞障害は知られているが多くは未だ不明である。本研究では各種の抗癌剤感受性に関係する p53 遺伝子とその下流で細胞周期調節に働く p21^{waf1/cip1} (p21) に注目して、oxaliplatin の抗腫瘍メカニズムについて検討した。

(対象と方法)

1. 大腸癌細胞株として以下の p53 wild, mutant 株を用いた。
p53 wild type 株 : HCT116、LoVo
p53 mutant 株 : DLD1、SW480、HT29、CaCo2
また HCT116 (p53wild、p21wild、mismatch repair (MMR) deficient) を遺伝子操作により改変した亜株として : ①HCT116 p53 null (p53^{-/-})、②HCT116 p21 null (p21^{-/-})、③HCT116 MMR proficient HCT116+ch3 の 3 種を利用した。
2. 細胞性質として細胞増殖 assay、細胞周期 (Flow cytometry) 解析を行った。
3. Western blot、免疫染色により各種蛋白の発現を、real time RT-PCR により RNA 発現を調べた。
4. 細胞周期の G1-S 移行を強制的に遅らせる手段として antisense cyclin D1 を誘導する adenovirus を用いた。
5. p21 蛋白の分解を調べるために、proteasome inhibitor として Lactacystin を用いた。

(成績)

1. 細胞増殖抑制 : 大腸癌細胞株の IC50 は p53 wild 株 : 0.4~2.5 μ M、p53 mutant 株で 1.0~9.1 μ M であった。p53 null HCT116 や p21 null HCT116 は親株の HCT116 に比べて有意に oxaliplatin への抵抗性を示した。
2. p53 下流遺伝子群の発現誘導 : Oxaliplatin を HCT116 (p53 wild) に作用させた際の p53 下流遺伝子 (細胞周期制御因子 p21、アポトーシス誘導因子 BAX、DNA 修復遺伝子 GADD45) の発現誘導を調べたところ p21 蛋白の増加がみられ、その標的分子である Rb (retinoblastoma) 蛋白のリン酸化抑制が確認された。LoVo (p53 wild) においても p21 誘導がみられたが p53 null HCT116 では p21 誘導はみられなかった。一方、p53 mutant

株では逆に p21 蛋白の減少がみられた。

3. 細胞周期解析 : Oxaliplatin によって p53 wild 株では G0-G1 arrest が、p53 mutant 株では S 期への急速な移行とそれに続く G2-M arrest がみられた。p53 null HCT116 株や p21 null HCT116 株では G0-G1 arrest はみられなかった。一方、第 1 世代白金製剤である Cisplatin (CDDP) を HCT116 に作用させたところ p21 誘導および G0-G1 arrest はみられず、G2-M arrest がみられた。p21 null HCT116 においても同様であった。
4. MMR deficient HCT116 と MMR proficient HCT116 との比較 : HCT116 は DNA mismatch repair (MMR) を欠く特殊な細胞株であるが、この機能を復元させた MMR proficient HCT116+ch3 細胞を用いた場合も、oxaliplatin は p21^{waf1/cip1} を誘導し、G0-G1 arrest を起こし、同程度の細胞増殖抑制効果を示した。
5. p53 変異株における p21 蛋白低下・G2-M arrest のメカニズムと意義 : p53 変異株である SW480 や DLD1 では oxaliplatin 処理によって p21mRNA は増加したが p21 蛋白は減少した。Proteasome inhibitor, Lactacystin の投与により p21 蛋白レベルは増加した。Antisense cyclin D1 により DLD1 の G1-S 移行を抑制すると、細胞増殖抑制効果は逆に減少し、p21 分解に伴う S 期への急速な移行は G2-M 停止に向けての重要なステップと考えられた。また oxaliplatin による G2-M 期停止のメカニズムとして、mitosis の進行に働く CDC2, survivin 蛋白レベルの低下、および cyclin B1 の核移行阻害を認めた。

(結論)

Oxaliplatin は p53 遺伝子の status にかかわらず大腸癌細胞の増殖を抑制した。p53 野生型の大腸癌細胞においては、oxaliplatin によって p21 蛋白が誘導され G0-G1 arrest を引き起こすことが細胞増殖抑制効果を発揮する上で重要である。一方、p53 変異型大腸癌では、oxaliplatin により p21 蛋白は proteasome 依存性の分解を受けた結果、急激な S 期流入を来し G2-M arrest に至る。このように oxaliplatin による大腸癌抑制のメカニズムとして p21 の発現制御を介した p53 遺伝子依存性・非依存性の pathway の存在が明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

新規白金製剤である oxaliplatin (L-OHP) は 5-FU/leucovorin との併用で大腸癌に対して高い臨床効果をもたらし、現在では大腸癌化学療法の key drug となっている。L-OHP の薬剤特性として platinum-DNA adduct 形成による細胞障害をもたらすことは知られているがその他のメカニズムの多くは未だ不明である。本研究では各種の抗癌剤感受性に関係する p53 遺伝子とその下流で細胞周期調節に働く p21^{waf1/cip1} (p21) に注目して L-OHP の抗腫瘍メカニズムについて検討した。その結果、p53 野生型の大腸癌細胞においては、L-OHP によって p21 蛋白が誘導され G0-G1 arrest を引き起こすことが細胞増殖抑制効果を発揮する上で重要であること、p53 変異型大腸癌では、L-OHP により p21 蛋白が proteasome 依存性の分解を受けた結果、急激な S 期流入を来し G2-M arrest に至ることがわかった。このように L-OHP による大腸癌抑制のメカニズムとして p21 の発現制御を介した p53 遺伝子依存性・非依存性の pathway の存在がはじめて明らかとなった。本研究の成果は、L-OHP の増殖抑制に関する生物学的特性の解明に繋がるのみならず、他の抗がん剤併用の際に細胞周期を考慮に入れた効果的な化学療法の開発に繋がる可能性があり、学位に値すると認める。