



Title	Effects of p21cipl/waf1 overexpression on growth,apoptosis and differentiation in human colon carcinoma cells
Author(s)	伊澤, 光
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47526
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	伊 澤 光
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 0 7 5 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 12 月 25 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	Effects of p21 ^{cipl/waf1} overexpression on growth, apoptosis and differentiation in human colon carcinoma cells (大腸癌細胞における p21 ^{cipl/waf1} 遺伝子過剰発現の細胞増殖、アポトーシス、細胞分化への影響についての検討)
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

(背景)

p21^{cipl/waf1} (p21) は cyclin-dependent kinase (CDK) 活性阻害を通じて細胞周期を負に制御する。本研究では、大腸癌における p21 蛋白発現の意義と p21 分子の大腸癌に対する治療法としての有用性を検討した。まず癌の進展に伴い p21 蛋白発現がどのように変化するかを調べるために、癌化の初期段階である腺腫内癌での発現と進行大腸癌における p21 蛋白発現とを比較検討した。p21 蛋白の発現制御のメカニズムとして転写因子 p53 による発現誘導が知られているので、腺腫内癌・進行癌における p53 蛋白発現も併せて検討した。次に、大腸癌細胞株に p21 遺伝子導入により p21 蛋白高発現株を樹立し、その細胞増殖、細胞分化、アポトーシス誘導への影響について検討した。

(方法)

1. 抗 p21 抗体を用いた免疫染色により、大腸癌細胞株 (HCT116, SW480)、大腸正常粘膜 53 例、大腸腫瘍性病変 112 例 (腺腫 40 例、腺腫内癌 19 例、および癌組織 53 例) を対象に p21 蛋白と p53 蛋白の発現を調べた。p21 を強発現する進行大腸癌については SSCP 法による p53 遺伝子変異の有無について検索した。
2. 細胞分化能の検索が可能な大腸分化型癌細胞株 HT29 にリポフェクション法により p21cDNA を導入、neomycin 耐性コロニーを作製。Western blot 法により p21 蛋白レベルを調べ、CDK2 kinase assay により CDK2 kinase 活性の阻害能について調べた。
3. p21 高発現クローンを用いて、以下の項目について検討した。i) 2 次元培養条件での増殖能、ii) 細胞周期の変化、ii) 寒天内 (足場非依存性) の細胞増殖能、iii) 絨毛酵素 alkaline phosphatase をマーカーとした細胞分化能、iv) DAPI DNA 染色により sodium butyrate、5-FU によるアポトーシス誘導。

(成績)

1. 大腸癌細胞株 (HCT116, SW480) と大腸正常粘膜・癌組織における p21 発現が、抗 p21 抗体を用いた western blot 法と免疫染色法の両者でよく相関することをまず確認した。
免疫染色によると p21 蛋白は大腸正常粘膜の最終分化領域 (粘膜先端部) で僅かに発現を認め、腺腫では 12 例 (30%)

に僅かな発現を認めるのみであった。腺腫内癌の段階では 19 例中 10 例 (52.6%) で p21 蛋白発現を認めたものの、進行大腸癌の段階では 53 例中 12 例 (22.6%) と p21 発現率の低下を認めた。癌組織での p21 発現は一部に限局した発現パターンや、僅かな発現にとどまるものが大部分であり、び慢性の強い p21 発現を認めたものは腺腫内癌の 2 例 (10.5%) と進行大腸癌の 3 例 (5.6%) にすぎず、これらの例すべてにおいて p53 蛋白の発現は認められず、特に p21 蛋白強発現の進行大腸癌 3 例では p53 遺伝子変異も認められなかった。

2. 大腸癌細胞 HT29 に p21cDNA を導入し、western blot 法にて p21 蛋白を過剰発現する 2 個のクローン #C1、#C2 を得た。これらの細胞株は Histon H1 を基質とした CDK2 kinase 活性を十分に抑制し、コントロール細胞に比べて、細胞周期の G0/G1 期の cell population の有意な増加を示した (63.6-66.0% vs 53.4-54.7%, $p=0.002$)。

3. p21 過剰発現株 #C1、#C2 において以下の結果が得られた。

- ・二次元培養条件下での細胞増殖曲線から増殖抑制がみられた。
- ・足場非依存性の寒天 (soft agar) 内での強い細胞増殖抑制を認めた (16.0-17.0 vs 26.7-27.0, $p=0.031$)。
- ・絨毛酵素 alkaline phosphatase をマーカーとして細胞分化能を調べると、明らかな分化抑制が認められた。
- ・Sodium butyrate によるアポトーシス誘導は有意に低下したが ($p<0.05$)、5-FU によるアポトーシスは変化を認めなかった。

(総括)

大腸癌の初期段階である腺腫内癌では約半数に p21 蛋白の発現を認めたが、進行期の大腸癌では p21 発現は約 2 割に減少していた。p21 蛋白を強発現する進行大腸癌症例では野生型 p53 依存性の発現誘導の関与が示唆された。以上の組織標本を用いた検討から大腸癌組織では p21 発現は低頻度であり、p21 を利用した遺伝子療法のような標的となると考えられる。実際に大腸癌細胞株に p21 遺伝子導入を行うと、増殖活性は、2 次元・3 次元培養ともに強く抑制された。一方、p21 は各種細胞の細胞分化やアポトーシスの過程で発現誘導することが知られているが、p21 強制発現は必ずしも細胞分化・アポトーシスを亢進させるとは限らず、その遺伝子導入に際しては各種の生物学的効果を総合的に考慮する必要があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究では、大腸多段階発癌における各段階の組織標本 (大腸腺腫、腺腫内癌、進行大腸癌) を用いて、細胞周期制御分子 p21^{waf1/cip1} (p21) 蛋白を免疫組織化学的手法により検出し、その発現の変化を詳細に検討した。その結果、腺腫から腺腫内癌への過程での p21 蛋白の発現亢進を認めたが、進行大腸癌では逆に p21 発現の低下を認めた。特に p53 蛋白を異常蓄積する進行大腸癌ではほとんどの例で p21 の発現がみられなかった。次いで進行大腸癌の 8 割で p21 発現が欠落していたことから、大腸癌に対する p21 補充療法の可能性を探るために p53 変異を有する大腸癌 HT29 細胞に p21 遺伝子を導入し、その細胞生物学的性質について検討した。その結果、p21 を高発現するクローンでは細胞周期制御を通じて、腫瘍増殖を強力に抑制することがわかった。本研究により、大腸早期癌と進行癌での p21 蛋白発現の違いが浮き彫りとされ、進行大腸癌に対する p21 による分子治療の可能性が示唆された。以上の結果はこれまでの腫瘍学に新しい知見を与えるものであり学位の授与に値すると考えられる。