

氏名(本籍)	丹後泰久(滋賀県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第443号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成15年3月27日
学位論文題目	<b>Adenovirus-Mediated p14ARF Gene Transfer Cooperated with Ad5CMV-p53 to Induce Apoptosis in Human Cancer Cells</b> (アデノウイルスを用いたp14ARF遺伝子導入は、p53遺伝子発現アデノウイルスベクターと協同して、ヒト癌細胞にアポトーシスを誘導する)
審査委員	主査 教授 岡部 英俊 副査 教授 瀬戸 昭 副査 教授 小笠原 一誠

## 論文内容要旨

### 【目的】

悪性腫瘍においてp14<sup>ARF</sup>遺伝子領域の異常が数多く報告されている。癌遺伝子産物MDM2はp53に直接結合することにより、その転写活性化能を阻害し、分解を促進することが知られている。p14<sup>ARF</sup>は、このMDM2の機能を阻害することにより、p53蛋白質を安定化することが近年明らかにされた。今回の実験では、p14<sup>ARF</sup>の機能に着目し、アデノウイルスベクターを用いてp14<sup>ARF</sup>とp53の二つの遺伝子を導入することにより抗腫瘍効果の増強がもたらされる検討を行った。

### 【方法】

正常型p53遺伝子を持った食道扁平上皮癌細胞株であるTE8、p53遺伝子を欠失した非小細胞肺癌株であるH358とH1299を用いた。

ベクターには、非増殖型p53遺伝子発現アデノウイルスベクターであるAd5CMV-p53、コントロールとしてE1A領域を欠失したアデノウイルスであるd1312を使った。また、今回作製したp14<sup>ARF</sup>遺伝子発現アデノウイルスベクターAd-ARFは、p14<sup>ARF</sup>遺伝子プラスミドをもとにTaKaRaのkitを用いて作製した。

RT-PCR, Western, blotting, Real-time RT-PCRを用い、遺伝子発現を調べた。

In vivoでの抗腫瘍効果を、BALB/cヌードマウスを用いて調べた。

### 【結果】

まずAd-ARFを3つの細胞株に感染させ、その発現を確認したところ (FIG, 1 AB)、ARFのmRNAと、ARF蛋白質の発現増強が確認された。

次にAd-p53とAd-ARFの併用を行った。併用方法は、Ad-p53 5MOIに対してAd-ARFを10MOIから100MOIまで用量をかえて組み合わせ、d1312を加えて合計105MOIにそろえた。半定量RT-PCRでは、いずれの細胞株でも併用したAd-ARFの用量によるp53mRNAの発現の変化は認められなかった。(FIG, 2A) Western blottingでは、いずれの細胞株でも併用したAd-ARFの用量依存性にp53蛋白質の増加を認めた。(FIG, 2B)

また培養細胞において、Ad-ARF単独投与では用量依存性にTE8に対する抗腫瘍効果の増強を認めたが、H358に対しては有意な腫瘍抑制効果を認めなかった。(FIG, 3A) Ad-ARFとAd-p53を併用すると、いずれの細胞株においても併用したAd-ARFの用量依存性に抗腫瘍効果の増強を認めた。(FIG, 3B) この抗腫瘍効果にアポトーシスが関与していることをHoechst33258染色によって

確認した。(FIG,3C)

続いて、Ad-p53とAd-ARFの併用によるp53標的遺伝子の発現の変化を調べた。(FIG, 4AB) p21は10MOI、p53R2は20MOI、Noxaは100MOIのAd-ARFの併用により、Ad-p53単独と比較しておよび2.5倍から4倍の発現の増強が認められた。

最後に動物実験を行った。ヌードマウスの背部皮下に移植したH358細胞に対して、Ad-ARF単独投与では有意な抗腫瘍効果は認めなかった。(FIG, 5A) Ad-p53単独では、 $3 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$  pfu投与した群で有意な増殖抑制効果を認めた。(FIG,5B) 至適用量に満たない $1 \times 10^8$  pfuのAd-p53に、3通りの用量のAd-ARFを併用したところ、Ad-ARFの用量依存性に増殖抑制効果の増強を認めた。(FIG, 5C)

#### 【考 察】

p53遺伝子治療では、多くの癌でアポトーシスが誘導されることが報告されている。ここでは、この治療の効果を増強する目的でp14<sup>ARF</sup>遺伝子発現アデノウイルスベクターを併用した。期待通り導入されたp53のmRNAは変化せず、p53蛋白質の発現が増強した。これは、p14<sup>ARF</sup>が転写調節によってではなく、蛋白質レベルでp53を安定化させるというこれまでの報告に矛盾しない。p53の抗腫瘍効果は主に転写因子としての働きによるものであるが、p14<sup>ARF</sup>とp53の併用では、細胞周期停止に関わるp21やDNA修復にp53R2の発現は比較的低い用量のAd-ARFの併用によりもたらされたが、アポトーシスに関与するNoxaの発現には、高い用量のAd-ARFの併用が必要であった。これは、アポトーシスを誘導するにはより高いp53蛋白質レベルが必要である可能性を示唆する。MDM2はp53蛋白質の分解を促進する癌遺伝子であるが、一方でp53の標的遺伝子でもあるため、p53遺伝子治療においてはMDM2の発現が増強され、p53蛋白質の分解が促進されていると考えられた。これは、p53遺伝子治療の障害となりうる問題であるが、今回の動物実験では、Ad-ARFと至適用量以下のAd-p53との併用は、高用量Ad-p53単独投与を凌ぐ抗腫瘍効果を認めており、これはp53遺伝子治療の効果を増強させるのに有効な手段であると考えられた。

#### 【結 論】

Ad-ARFとAd-p53の併用は、p53遺伝子治療の効果を増強する有効な治療法の一つと考えられた。今回の実験結果は、将来的な臨床試験にむけての基礎となるものと思われた。

## 学位論文審査の結果の要旨

p53遺伝子治療は近未来の癌治療戦略の一つとして期待されているが、これまでのところその効果は様々であり、治療効果を規定する分子機構の解明とともにより多くの症例に対する治療成績の改善が待望される。本論文では、p53を核内で安定化させる働きを持つp14<sup>ARF</sup>を発現するアデノウイルスベクターの共感染により、p53遺伝子治療の効果をin vitro及びin vivoにおいて増強できることを証明した。また、その機序にはp53標的遺伝子発現の増強が関与していることを示した。p53遺伝子治療に対する感受性低下の一つの要因として、導入されたp53蛋白質が十分に機能せず、アポトーシスを誘導する標的遺伝子の発現に至らないという可能性が考えられるが、そのような観点から今回の試みは合理的な手法であると思われる。今後p53遺伝子治療が広く臨床応用された場合、このような手段の開発は重要な問題であり、p53遺伝子治療の効果発現の機序を解明する一つの礎となりうる点でも、博士(医学)の学位を授与するに値するものと考えられる。