

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 Growth Suppression of Human Ovarian Cancer Cells by Adenovirus-mediated Transfer of the *PTEN* Gene

和 訳 アデノウイルス・ベクターを用いた *PTEN* 遺伝子のヒト卵巣癌細胞への導入による増殖抑制作用

指導教官 武谷 雄二 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏 名 水口 剛雄

染色体 10q23 に位置する癌抑制遺伝子 *PTEN* は、フォスファチジル・イノシトール脱リン酸化酵素をコードし、PI3 キナーゼを介す細胞増殖のシグナル伝達経路に対して抑制的に働く。最近、PI3 キナーゼの活性サブユニット *PIK3CA* が、卵巣癌において高頻度に増幅、活性化されていることが報告された。従って、*PTEN* 遺伝子の変異は卵巣癌においては稀であると報告されているが、もし *PTEN* 遺伝子の導入による過剰発現が、卵巣癌の活性化された PI3 キナーゼを介す細胞増殖経路を抑制することができれば、有効な卵巣癌治療と

なるかもしれない。その可能性を検証するため、我々はまず正常の *PTEN* 遺伝子を発現するアデノウイルス・ベクターを作製した。E1 および E3 領域を欠失した 5 型アデノウイルスの全ゲノムと CAG プロモーターを含むコスミドへ *PTEN* cDNA を組み込み、末端タンパク質付きアデノウイルス・ゲノム DNA と共に 293 細胞へトランスフェクションし、相同組み換えによりアデノウイルス AdCAPTEN を作製した。同時に、コントロール・ウイルス AdCA および β -ガラクトシダーゼ遺伝子を発現する AdCALacZ も作製した。AdCAPTEN をヒト卵巣癌細胞株 SK-OV-3 へ MOI 100 で感染させ、ウェスタン・ブロットにより経時的に *PTEN* 蛋白の発現量を調べたところ、感染後約 18 時間から過剰発現が確認された。

次に卵巣癌細胞の増殖に対する *PTEN* の作用を調べるため、9 つのヒト卵巣癌細胞株 (MDAH 2774, TYK-nu, SW 626, NIH:OVCAR-3, OV-1063, SK-OV-3, Caov-3, ES-2, MCAS) に AdCAPTEN および AdCA を感染させ、細胞数の変化を調べた。これら 9 株は全て、正常の *PTEN* 遺伝子を持つことがダイレクト・シーケンスにより予め確認された。*PTEN* 遺伝子の導入はウイルス・ベクターのみの感染と比較して、9 細胞株のうち 6 つ (MDAH 2774, TYK-nu, SW 626, NIH:OVCAR-3, OV-1063, SK-OV-3) の増殖を有意に抑制した。その増殖抑制の度合は、各細胞株での内因性 *PTEN* および *PIK3CA* 遺伝子の発現レベルとは関係せず、AdCALacZ (MOI 100) の感染により行った β -ガラクトシダーゼ・アッセイにおける各細胞株の遺伝子導入効率と相関した。更に、この増殖抑制作用の分子機構を解明するためフローサイトメトリーおよび TUNEL 染色を施行したところ、観察された増殖抑制作用はアポトーシスおよび G1 アレストを介しており、また高い遺伝子導入効率はアポトーシスの誘導と相関していることが分かった。

アデノウイルスによる遺伝子導入には、細胞でのアデノウイルス受容体すなわち HCAR (ヒト・コクサッキー・アデノウイルス受容体)、インテグリン αv 、 $\beta 3$ および $\beta 5$ の発現が必要と考えられている。そこで我々は、これらアデノウイルス受容体の各卵巣癌細胞株での発現レベルを RT-PCR 法により調べた。HCAR の発現は、調べた卵巣癌細胞 9 株では認められず、アデノウイルス受容体のうちインテグリン αv の発現レベルと遺伝子導入効率 ($P=0.014$)、および増殖抑制の度合 ($P=0.009$) とが有意に相関していた。

以上の事実は、アデノウイルス・ベクターを用いた *PTEN* 遺伝子の導入が、卵巣癌に対する有効な治療法となりうる可能性を示唆している。