

論文要旨

論文名：アルキル化剤の骨髄毒性軽減を目的とした薬剤耐性遺伝子の応用に関する研究

氏名：鈴木 睦

癌化学療法は、種々の化学療法剤の開発、既存の癌化学療法剤の併用による効果増強、支持療法などの進展にともない治療成績を顕著に上昇させてきている。その反面、現在上市されている癌化学療法剤の多くは用量規制因子として、消化器毒性、骨髄毒性などの副作用を有しており、十分な癌化学療法剤の投与が困難である場合も想定される。十分な癌化学療法剤の投与がなされない場合には、残存した癌細胞の1%がregrowthすることにより、癌が再発することとなる。そこで、癌再発のリスクを回避するため100%の癌細胞を殺すことを目的として、強化化学療法（intensive chemotherapy）が実施されている。また、作用機序の異なる癌化学療法剤を併用投与することにより、多方面から癌を縮小させ、効果的に殺腫瘍効果を期待する治療も実施されている。併用癌化学療法については、個々の薬剤の有する副作用のリスクを分散させる点からも非常に有効な手段であるが、やはり癌化学療法剤に共通して認められる傾向のある骨髄毒性などにより、癌化学療法剤は、十分に投与されていないことが多い。

癌化学療法剤に共通した副作用の一つは、造血器系に障害を与える骨髄抑制である。さらにアルキル化剤の二次発癌も造血器系をターゲットとしたリンフォーマなどが主流をなすことから、正常な骨髄細胞に癌化学療法剤の耐性遺伝子を個々に導入す

ることは、主要な副作用を軽減し、癌化学療法をより強化することが可能となる。この戦略をもとに、癌化学療法剤耐性遺伝子を用いた癌の遺伝子治療方法が開発研究され、アドリアマイシン、ビンカルカロイド、パクリタキセル等の種々の抗癌化学療法剤に耐性を付与するP糖蛋白質をコードするMDR1遺伝子や、ニトロソウレア系化学療法剤によるDNA損傷を修復するDNA修復蛋白質をコードするMGMT遺伝子を骨髄細胞に導入する臨床試験が実施されている。国内では癌研究会付属病院においてMDR1遺伝子に関する臨床試験の試験計画書が認可され、臨床試験が開始される。

現在の癌化学療法の主流を占めるレジメは、複数の癌化学療法剤を用いる併用癌化学療法であることから、異なる2種類の耐性遺伝子を同時に用いることが、今後の導入する困難さが大きく改善された。しかしながら、生体内にこれらの蛋白質が生理的な変動を超えて共発現した場合のリスクあるいは効果に関しては、未知の部分が多く、実際の検証が必要となる。

本研究は、異なる蛋白質を共発現させるレトロウイルスベクター (bicistronic retrovirus vector) において、主にアルキル化剤に対する耐性因子をコードする

MGMT遺伝子と、vincristine (VCR) などの癌化学療法剤耐性遺伝子であるMDR1遺伝子を共発現させることにより、bicistronic retrovirus vectorの有効性を細胞毒性および遺伝毒性を中心に検討することを目的に実施した (Fig.1)。

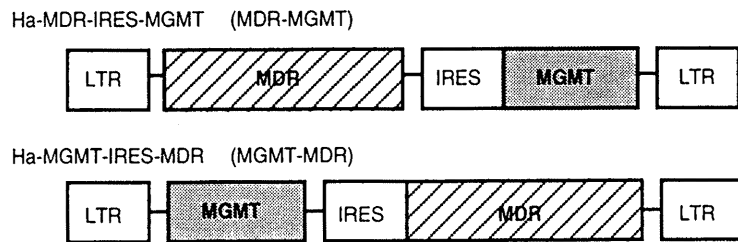


Fig.1 レトロウイルスベクター構成図

Ha-MDR-IRES-MGMTレトロウイルスを導入した各クローンは、親株であるHeLa MR細胞と比べ50~120倍のVCRに対する耐性を獲得させ、7~12倍のACNUに対する耐性を獲得して

いることが確認された。Ha-MGMT-IRES-MDRレトロウイルスを導入した各クローンは、親株であるHeLa MR細胞と比べ4~21倍のVCRに対する耐性を獲得しさせ、23~26倍のACNUに対する耐性を獲得させた (Fig.2)。親株と比較してHa-

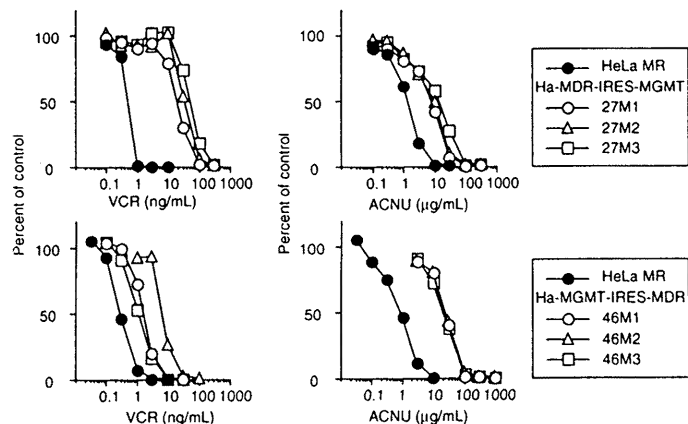


Fig.2 各レトロウイルスを導入したHeLa MRクローンにおける薬剤感受性

MDR-IRES-MGMT あるいは Ha-MGMT-IRES-MDR レトロウイルスからの P 糖蛋白質の発現量および MGMT 蛋白質の発現量および酵素活性は、癌化学療法剤に対する感受性と比例し変化した。また、ACNU による遺伝毒性を軽減することが示された (Fig.3)。

Ha-MDR-IRES-MGMT あるいは Ha-MGMT-IRES-MDR レトロウイルスを骨髓細胞に導入し、その後に薬剤において選別を実施すると、ほぼ全ての細胞において、P 糖蛋白質の発現が認められた。これらの癌化学療法剤耐性細胞において、

MGMT 蛋白質の発現量の増加、

および MGMT 酵素活性の上昇が認められた。また、VCR と ACNU に対する感受性の検討において Fig.4 の上段 (A、B) は VCR 選別前を示し、下段 (C、D) は VCR 選別後を示す。HaMDR レトロウイルスを導入したマウス骨髓細胞以外は、VCR 選別前にレトロウイルスの導入の効果はほとんど認められなかった。VCR 選別後は、Ha-MDR-IRES-MGMT および Ha-MGMT-IRES-MDR レトロウイルスを導入したいずれのマウス骨髓細胞においても VCR および ACNU に対して耐性を獲得した (Fig.4)。耐性度の比較で P 糖蛋白質の発現とほぼ一致し、Ha-MDR-IRES-MGMT

レトロウイルスを導入した骨髓細胞では VCR に対して 27 倍の耐性度の上昇が認められ、ACNU に対しては 7 倍の耐性度の上昇が認められた。同様に、Ha-MGMT-IRES-MDR レトロウイルスを導入した骨髓細胞は、VCR に対して 8 倍、ACNU に対して 16 倍の耐性度の上昇が認められた。ACNU による遺伝毒性に対する効果では、VCR による選別前 (左) は姉妹染色分対交換の頻度

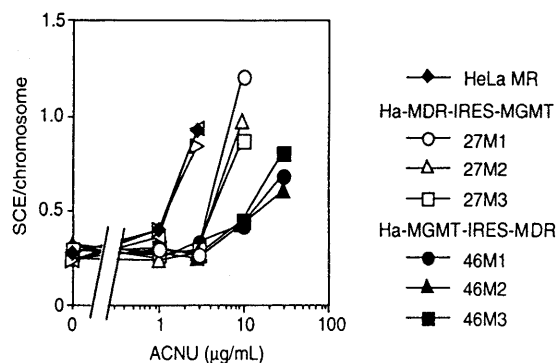


Fig. 3 各レトロウイルスを導入した各クローンにおける姉妹染色分対交換の頻度

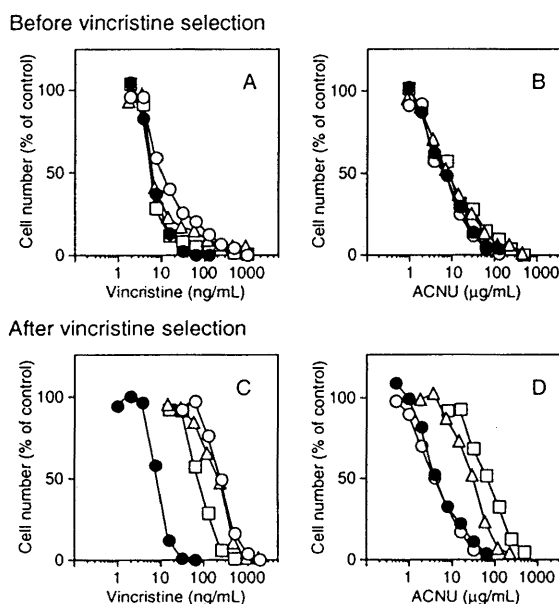


Fig. 4 各レトロウイルスを導入したマウス骨髓細胞における各薬剤に対する感受性の変化

の上昇はいずれのマウス骨髄細胞においてもコントロールのレベルとほぼ同様であった。しかし、VCR 選別後で、Ha-MDR-IRES-MGMT あるいは Ha-MGMT-IRES-MDR レトロウイルスを導入した骨髄細胞では、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の ACNU 存在下で、バックグラウンドレベルであった 以上のことから異なる作用機序を有する 2 種類の癌化学療法剤耐性因子を骨髄細胞に共発現させることが可能であること、さらに P 糖蛋白質の基質となる癌化学療法剤を用いて他方の遺伝子を発現する骨髄細胞を選択に生体内においても増幅させられる可能性が示された。

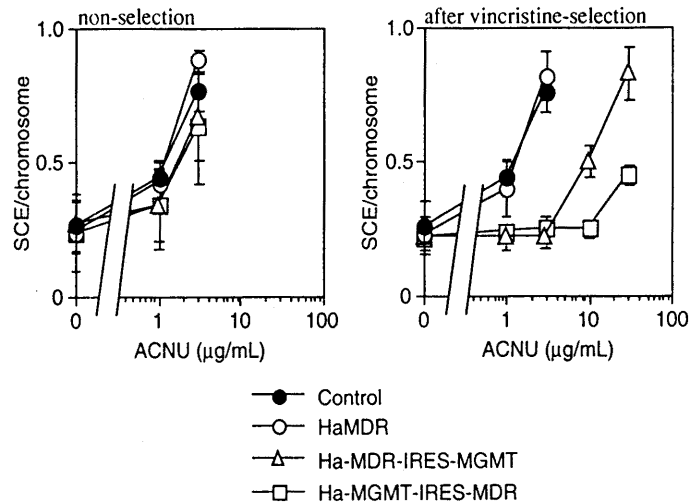


Fig. 5 各レトロウイルスを導入したマウス骨髄細胞における姉妹染色分体交換頻度。

現在では、進行した脳腫瘍に対する、ピンカアルカロイド系薬剤と ACNU などと併用癌化学療法が実施される。よって、本研究によって試験を実施した異なるタイプの耐性遺伝子を発現させるレトロウイルスベクター、Ha-MDR-IRES-MGMT もしくは Ha-MGMT-IRES-MDR レトロウイルスはこのような治療計画に対して、骨髄毒性および遺伝毒性の回避に有効なレトロウイルスベクターであると考えられる。

MGMT 遺伝子など癌化学療法剤耐性遺伝子は、癌化学療法の治療成績を悪化させているが、一方では、副作用軽減および強化癌化学療法を目的とした応用的な利用も注目されてきている。耐性遺伝子などの癌化学療法分子標的を中心とした基礎的な研究をさらに応用させた治療方法の開発は、単に癌化学療法の治療成績を向上させるだけでなく、必要以上の副作用を軽減させ、QOL を向上させる一因にもなりえるものと考えられる。