

審査の結果の要旨

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。しかし多くの癌化学療法剤に共通した副作用に造血器系に障害を与える骨髄抑制があり、この事により癌化学療法剤の投与量が制限されている。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れば、このような副作用が軽減され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、ピンカアルカロイド、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* (multidrug resistance 1) 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* (*O*⁶-methylguanine-DNA methyl transferase) 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。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発現させることが不可欠となる。また、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。本研究では、*IRES* (internal ribosome entry site) により、異なる蛋白質を LTR に制御された 1 本の mRNA から共発現させるレトロウイルスベクター (bicistronic retrovirus vector) を用い、主にアルキル化剤 (ACNU) 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レトロウイルス (Ha-MDR-IRES-MGMT レトロウイルス及び Ha-MGMT-IRES-MDR レトロウイルス) を作製した。これらのレトロウイルスを HeLa MR 細胞およびマウス骨髄細胞に導入し、癌化学療法剤の細胞毒性及び遺伝毒性に対する有効性を検討することによって以下の成果を得た。

1. Ha-MDR-IRES-MGMT 及び Ha-MGMT-IRES-MDR レトロウイルス導入による薬剤耐性の獲得。

HeLa MR 細胞に Ha-MDR-IRES-MGMT レトロウイルスを導入した後の各クローンは、VCR に対し親株の 50 ~120 倍の耐性を獲得し、ACNU に対し親株の 7 ~12 倍の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

スを導入した各クローンは、VCR に対し親株の 4 ~21 倍の耐性を獲得し、ACNU に対し親株の 23 ~26 倍の耐性を獲得した。また、これらの各クローンにおいて、P 糖蛋白質及び MGMT 蛋白質の発現が確認され、それらの発現量は薬剤感受性の結果とほぼ相関した。

さらに Ha-MDR-IRES-MGMT あるいは Ha-MGMT-IRES-MDR レトロウイルスをマウス骨髄細胞に導入し癌化学療法剤に対する感受性を検討した。VCR による選別前は、いずれのレトロウイルスが導入されたマウス骨髄細胞においても非導入時とほぼ同程度の薬剤感受性であった。VCR による選別後、Ha-MDR-IRES-MGMT レトロウイルスを導入したマウス骨髄細胞では、いずれもレトロウイルス非導入時と比べ、VCR に対して 27 倍、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マウス骨髄細胞では、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。また、ほぼ全てのマウス骨髄細胞において、P 糖蛋白質の発現が認められ、MGMT 蛋白質の発現量の増加及び MGMT 酵素活性の上昇が認められた。これらの結果より、マウス骨髄細胞においても共発現した P 糖蛋白質及び MGMT 蛋白質は、癌化学療法剤に対して耐性を獲得させていることが明らかとなった。

2. Ha-MDR-IRES-MGMT 及び Ha-MGMT-IRES-MDR レトロウイルス導入による遺伝毒性の軽減。

HeLa MR 細胞に Ha-MDR-IRES-MGMT あるいは Ha-MGMT-IRES-MDR レトロウイルスを導入した各クローンにおける、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の ACNU 存在下の突然変異の出現頻度及び姉妹染色分体交換頻度は、親株である HeLa MR 細胞の ACNU 非処理時と同程度であることが明らかとなった。これらの結果から、HeLa MR 細胞に対する ACNU の遺伝毒性は、Ha-MDR-IRES-MGMT あるいは Ha-MGMT-IRES-MDR レトロウイルスを導入することで、軽減することが確認された。

マウス骨髄細胞に Ha-MDR-IRES-MGMT あるいは Ha-MGMT-IRES-MDR レトロウイルスを導入することにより *in vivo* 系に近い状態における、ACNU の遺伝毒性に対する効果を検討した。VCR による選別前、いずれのレトロウイルスを導入したマウス骨髄細胞でも、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の ACNU 存在下で、レトロウイルス非導入時とほぼ同程度に姉妹染色分体交換の観察頻度の上昇が観察された。VCR による選別後、いずれのレトロウイルスが導入されたマウス骨髄細胞においても、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の ACNU 存在下で、姉妹染色分体交換の観察頻度の上昇は認められなかった。これらの結果より、マウス骨髄細胞においても ACNU の有する遺伝毒性が十分に軽減していることが明らかになった。

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的に増殖させられる可能性が示された。さらに、異なる癌化学療法剤耐性因子を骨髄細胞に共発現させることにより、癌化学療法剤の有する骨髄毒性を軽減させ、さらなる高用量の癌化学療法剤による治療の可能性を示した。これらの成果は、癌化学療法剤による癌治療の可能性が広がることを示したものであり、博士（薬学）の学位に値するものと判断した。