

# 論文の内容の要旨

論文題目 アテロコラーゲンをを用いたアンチセンスオリゴヌクレオチドによる新規癌遺伝子治療法の確立

指導教官 久保田俊一郎助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月1日 入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 中澤久仁彦

## 要約

### 目的

ポリアミン合成の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素(ODC)は、ヒトの種々の癌で発現が亢進している。アテロコラーゲンを担体とするODCアンチセンスオリゴヌクレオチドによる新規の癌遺伝子治療法の確立を目的とする。

### 背景

ポリアミンは低分子の非蛋白性の窒素化合物で、代表的なポリアミンとしてプトレシン、スペルミジン、スペルミンがある。DNAと強く結合し、その複製を制御し、タンパク合成や細胞分裂に影響を与え、細胞の成長に必須であることが知られている。ポリアミンの代謝はオルニチンの脱炭酸で始まってプトレシンになるが、このステップはオルニチン脱炭酸酵素(ODC)で制御されている。ODCは、分子量約5万のサブユニットからなる二量体で、オルニチンをプトレシンに変換する律速酵素で、その過剰発現は繊維芽細胞のtransformationを引き起こし、また各種ヒト癌細胞で過剰発現している。

アンチセンス遺伝子治療は、*in vitro*では種々の遺伝子の発現を効果的に抑制するが、*in vivo*ではDNaseによる分解を受けるため、頻回の投与が必要で、より有用な担体の出現が望まれていた。ポリアミン合成の律速酵素であるODCは、ヒトの種々の癌で発現が亢進していることにより、antisense ODCによるODCの発現抑制は、癌の増殖さらに転移を抑制することが期待される。また腫瘍に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの十分かつ持続的な運搬を維持する担体や方法の確立が必要がある。

### 方法

最も高いODC値を示した3種のヒトの癌のcell line、つまりMKN45(胃癌)、COLO201(大腸癌)、RD(横紋筋肉腫)を実験に用いた。アテロコラーゲンに包埋したODCアンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞増殖における効果は、*in vitro*ではMTT assayを用いて評価した。*In vivo*では、単回のアテロコラーゲン包埋ODCアンチセンスオリゴヌクレオチドのヌードマウスに植え付けた腫瘍の成長に対する腫瘍内、筋肉

内、腹腔内投与の効果測定し、ODC値とポリアミン濃度を測定した。病理組織学的検索は投与後35日と42日に行った。さらに統計学的解析を行った。

## 結果

*In vitro*ではアテロコラーゲン包埋ODCアンチセンスオリゴヌクレオチドはODC値( $p < 0.0001$ )とポリアミン濃度( $p < 0.0001$ )の著名な抑制とにより、顕著にMKN45、COLO201、RD細胞の成長を抑制した( $p < 0.0001$ )。*In vivo*では、単回のアテロコラーゲン包埋ODCアンチセンスオリゴヌクレオチドの腫瘍内、筋肉内、腹腔内投与は35-42日間に渡ってMKN45、COLO201、RD細胞の増殖を顕著に抑制した。最も著明なMKN45、COLO201、RD細胞の成長に対する効果は腹腔内投与により得られた。腫瘍のサイズは対照の腫瘍(100%)のそれぞれ0.7、3.5、3.5%であった( $p < 0.0001$ )。病理組織学的にはcontrol群ではアテロコラーゲン包埋ODCアンチセンスオリゴヌクレオチド群では、HE染色で広範なnecrosis、Azan染色では線維組織・膠原線維の増生が見られた。幾つかのヒトの癌はODC高値を示しているため、結果はこの新しいアンチセンス法がヒトの癌の治療に有効である可能性を強く示唆している。

## 結論

1. atelocollagenを用いたODC antisense oligonucleotidesの投与により胃癌、大腸癌、横紋筋肉腫の増殖が*in vitro*、*in vivo*において顕著に抑制され、生体では5-6週の長期にわたり著明な増殖抑制効果が持続した。
2. 後腹膜肉腫の肝転移を有意に抑制した。
3. atelocollagenは生体内でnucleaseによるantisense oligonucleotidesの急速な分解を防ぐ作用があり、drug delivery systemの担体として有効であると思われた。
4. atelocollagenはインテグリンを介して細胞に接着することがわかった。
5. ヒト各種癌ではODCが過剰発現しているため、臨床での有用性が期待される。