

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 大腸癌の遺伝子治療に関する基礎的研究—アポトーシス誘導療法の検討—

指導教官 名川弘一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成11年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 内田宏昭

[研究の背景および目的]

切除不能大腸癌症例に対し化学療法や放射線療法が施行されることが多いが、その効果は満足できるものではなく、より効果的な治療法の開発が必要である。近年、アポトーシス促進性遺伝子を用いた遺伝子治療法の開発が試みられ、有望なストラテジーであると考えられている。アポトーシス関連遺伝子の中でも特に *caspase-8* は各種癌細胞に対し強力な殺細胞効果を有し、臨床応用を目指したさらなる検討に値すると考えた。アデノウイルスベクターは種々の癌細胞に効率よく遺伝子導入することが可能であることから、癌の遺伝子治療用ベクターとして有用であると考えられる反面、大量投与により重篤な全身性副作用を生じることが報告されている。したがってさらなる臨床応用を進めるためには、十分な治療効果を確保しつつ使用するベクターの量を最小化するための新しいアプローチが求められる。そこでアデノウイルスベクターによる遺伝子導入に既存の治療法を併用することによる効果を検討することとした。本論文では、それ単独ではほとんどアポトーシスを生じない少量の *caspase-8* 発現アデノウイルスベクターに 5-FU あるいは X 線照射を併用することにより、大腸癌細胞 DLD-1 に強いアポトーシスを誘導することが可能であることを報告する。

[方法]

大腸癌細胞株 DLD-1 を用いて各実験を行った。細胞への遺伝子導入はすべてアデノウイルスベクターを用いて行った。アデノウイルスベクター Adv-Casp8、Adv-p21、Adv-p27、Adv-bcl-xL、Adv-LacZ、Adv-GFP は目的遺伝子 (それぞれ *caspase-8*、*p21^{WAF1/CIP1}*、*p27^{Kip1}*、*bcl-xL*、*lacZ*、*GFP*) 発現カセットを挿入したコスミドベクターとアデノウイルス 5 型 DNA-末端蛋白複合体を 293 細胞にコトランスフェクションすることにより作製した。*caspase-8* 発現アデノウイルスベクターの作製に際しては、293 細胞への傷害を避けるため Cre/loxP システムを用いた。アデノウイルスベクターによる遺伝子発現の強度を評価するために、Adv-LacZ あるいは Adv-GFP を感染させ 48 時間後に X-gal 染色あるいはフローサイトメトリーを行った。生細胞の検出は MTT アッセイに準じて行った。細胞死の程度の評価は、トリパンブルー染色による死細胞の割合の測定と、DNA 断片化を検出する染色後のフローサイトメトリーにより行った。*caspase-3*、*8*、*9*、PARP、*p21*、*p27*、TRAF-1、2、cIAP-1、2、cFLIP、*bcl-2*、*bcl-xL* の発現量の評価はウエスタンブロット解析にて行った。特に *caspase-3*、*8*、*9*、PARP については、切断型フラグメントを認識する抗体を用いることにより、カスパーゼの活性化の評価を行った。

[結果]

DLD-1 細胞は 5-FU に高度な耐性を示し、100 μ M の 2 日間処理を行っても細胞増殖抑制効果はみられるものの殺細胞効果はほとんど生じなかった。そこで以下の実験での 5-FU 処理に際しては、すべて 100 μ M の濃度を用いた。MTT アッセイにより、DLD-1 細胞に対する Adv-Casp8 感染後の殺細胞効果を 5-FU 処理併用の有無で比較検討したところ、5-FU 処理併用により DLD-1 細胞の Adv-Casp8 に対する感受性が増強した。50%生存とするために必要な Adv-Casp8 の量が、5-FU の併用により非併用の約 3 分の 1 に減少した。またこの実験により、Adv-Casp8 感染単独で明らかな細胞死が生じるウイルス量は MOI 10 以上であることがわかったため、以下の実験での Adv-Casp8 感染に際してはすべて MOI 3 のウイルス量を用いた。DLD-1 細胞に対する Adv-Casp8 感染と 5-FU 処理の併用による細胞死誘導効果を検討したところ、それぞれ単独処理ではわずかな死細胞を生じるのみであったのに対し、併用処理後には著明な細胞死が生じ、かつその細胞死にはアポトーシスの特徴である DNA 断片化を伴っていることがわかった。また併用処理により *caspase-3* およびその基質である PARP の

切断が認められ、カスパーゼの活性化が確認された。Adv-Casp8 の MOI 3 での感染により、procaspase-8 の発現量は内因性発現量の約 2 倍に増加した。切断型 caspase-8 を認識する抗体を用いたウエスタンブロット解析では、caspase-8 の活性化に伴う完全切断型フラグメントは併用処理後においてのみ認められた。アデノウイルスベクターによる感染 48 時間後のレポーター遺伝子 *lacZ* および *GFP* の導入発現は 5-FU 処理の存在により増強し、Adv-GFP 感染による 1 細胞あたりの GFP の平均蛍光強度は約 2~3 倍に高まった。Adv-Casp8 感染と併用するパートナーを 5-FU 処理から p21 あるいは p27 の過剰発現に代替しても、DLD-1 細胞に DNA 断片化を伴う強い細胞死を誘導し、この細胞死には caspase-8 の活性化を伴っていた。5-FU 処理による DLD-1 細胞の TRAF-1、2、cIAP-1、2、cFLIP、bcl-2、bcl-xL の蛋白発現量に明らかな変化は認めなかった。

DLD-1 細胞に 2.5Gy あるいは 5Gy の X 線を照射したところ、わずかな細胞死を生じるのみであった。これに MOI 3 での Adv-Casp8 感染を併用したところ、線量依存的に強い細胞死を誘導し、この細胞死には DNA 断片化を伴っていた。X 線照射単独では部分的な caspase-8 の活性化を生じるにとどまったが、Adv-Casp8 感染の併用により線量依存的に強い caspase-8 の活性化が認められた。X 線照射単独によりわずかながら生じた DNA 断片化と caspase-8、9 の活性化は、bcl-xL の過剰発現により消失した。Adv-Casp8 感染と X 線照射の併用処理による強い DNA 断片化と caspase-8、9 の活性化は、bcl-xL の過剰発現により抑制された。

[考察]

大腸癌に対する化学療法の第一選択薬は 5-FU であるがその治療効果は不十分である。今回検討に用いた DLD-1 細胞は 5-FU に対し高度耐性を呈するが、その背景として変異型 p53 の存在や、細胞内の bax の bcl-xL に対する発現量比が低いことが指摘されており、このような分子生物学的特性を有する癌細胞の存在により腫瘍の 5-FU 抵抗性が生じるものと考えられる。したがってこのような癌細胞に効率よくアポトーシスを誘導するための新規治療法の開発が強く望まれ、本論文に報告した戦略はきわめて有用であると考えられる。それぞれ単独ではほとんど細胞死を生じない条件で、Adv-Casp8 感染と 5-FU 処理の併用は DLD-1 細胞に強力なアポトーシス誘導を伴う細胞死を生じた。5-FU 処理による caspase-8 の活性化や抗アポトーシス分子の発現量の変化は検出されず、併用効果の主なメカニズムは、5-FU の細胞増殖抑制

効果が、導入された *procaspase-8* 遺伝子およびその産物が細胞分裂に伴い分配・希釈されるのを阻害し、その結果として1細胞あたりの遺伝子導入発現量を実質的に増加させることであると考えられた。

Adv-Casp8 感染との併用効果を検討する既存の治療法として X 線照射も検討に含めた。DLD-1 細胞への X 線照射により、弱いながらもミトコンドリアを介するアポトーシス経路の活性化が認められた。これに比較的少量の Adv-Casp8 感染を併用することにより強い *caspace-8* の活性化を伴うアポトーシスを誘導し、この現象はミトコンドリアを介するアポトーシスシグナルを遮断することにより抑制された。DLD-1 細胞には内因性 *procaspase-8* が豊富に存在し、その約2倍程度の過剰発現により X 線照射後に著明な *caspace-8* の活性化が生じたことから、過剰発現された *procaspase-8* は内因性 *procaspase-8* よりも X 線刺激を受けたミトコンドリアの下流で活性化されやすい状態にあるのかもしれない。この併用処理は X 線照射に耐性を示す大腸癌に対する有効なアプローチである可能性がある。

本論文ではウイルス量依存的に強力なアポトーシス誘導能を呈する Adv-Casp8 を比較的少量用い、これに既存の治療法を併用することにより、強い殺細胞効果が得られることを報告した。この戦略により、十分な治療効果を得るためのアデノウイルスベクターの使用量の削減が可能となり、癌の遺伝子治療の有効性と安全性を高めることが期待できると考える。