

71 培養細胞におけるNADPH: cytochrome P450 reductase (reductase) 活性上昇と薬剤感受性変化との関係の研究

名古屋大

澤村明子、吉川史隆、石川尚武、玉腰浩司、若原文世、小幡直子、柴田清住、友田清、友田豊

[目的] NADPH: cytochrome P450 reductase (reductase)は、細胞内電子伝達に関与する酵素であり、各種薬剤代謝および活性化に関与すると言われている。reductaseのヒト遺伝子を用いて本酵素活性を上昇せしめた細胞株を確立し、薬剤感受性試験を施行、ある種の薬剤が本酵素による活性化を要することを *in vivo* で証明することを目的とした。[方法] chinese hamster ovary cell (CHO) にプラスミド PM² を用いてヒト reductase gene を遺伝子導入し、3つの細胞株 P450-1, P450-2, P450-3を確立した。Western blot 法にて酵素蛋白を確認しMTT法にてADR, MMC, Paraquat, CDDP, VLB, VCR, VP-16の感受性試験を行い、CHO親株をcontrolとして reductase gene の遺伝子導入細胞株との比較を行った。[成績] reductaseの酵素活性は、親株と比較してP450-1では9.3倍、P450-2では10.0倍、P450-3では11.2倍の値であった。薬剤感受性変化は、ADRについてはP450-1において親株の1.8倍の感受性上昇を認め、P450-2では1.8倍、P450-3では3.3倍の上昇を認めた。MMCについては同様に、P450-1で2.5倍、P450-2では3.0倍、P450-3では2.1倍の上昇を、ParaquatについてはP450-1で2.9倍、P450-2では4.3倍、P450-3では4.2倍の上昇を認めた。CDDP, VLB, VCR, VP-16については感受性上昇は認めなかった。[結論] reductase遺伝子導入した細胞株では、ADR, MMC, Paraquatの細胞障害性が増強された。一方、CDDP, VLB, VCR, VP-16については作用機序として薬剤がreductaseによる電子伝達を受けて活性化されるという報告はなく、実際に細胞障害性は親株と変わらなかった。本研究の実験結果はこれらの薬剤作用機序の仮説の裏付けとなるといえる。

72 癌抑制遺伝子p53を用いた卵巣癌の遺伝子治療に関する基礎的検討

旭川医大

柳沼 裕二、山下 剛、片山 英人、フリオセッサードウェーニウス、田熊 直之、河井 紀一郎、川村 光弘、石川 陸男

「目的」我々は卵巣癌で種々の癌抑制遺伝子の異常がmulti stepにその発癌に関与することを明らかにしてきたが、それらの異常の一つを正常に戻すことにより発癌を阻止できれば、癌治療への応用も可能となる。今回癌抑制遺伝子p53を用いて、卵巣癌の遺伝子治療の可能性を基礎的に検討した。

「材料、方法」卵巣癌細胞株にp53遺伝子の発現の見られないSK-OV-3株(対照)、導入する遺伝子は正常型p53、変異型p53cDNAを用いた。従来より正常型p53遺伝子を導入するとその細胞増殖抑制が強く、stable cloneが得にくいという問題があった。我々は発現ベクターにデキサメサゾンにより遺伝子の発現が誘導されるpMSGを使用し、選択効率の改善を試みた。リポフェクション法により遺伝子を導入し、HAT selectionによりp53cDNAが組み込まれた stable cloneを選択し、細胞の増殖動態、softagar colony formation assayを行い比較検討した。[成績] 1) 導入したp53遺伝子をstableに発現するcloneを効率良く多数得た。2) 対照とデキサメサゾン存在下で変異型p53を発現しているcloneでは細胞増殖が72時間後で 2×10^7 個/mlに対し、正常型p53を発現するクローンでは 2×10^6 個/mlと明らかに抑制された。3) softagar colony formation assayでも対照と変異型p53を発現しているcloneでは、colony形成能が20日後で141個/cultureであるのに比し、正常型p53を発現するクローンでは10個/cultureと著明に抑制された。[結論] ベクターにpMSGを使用することにより正常型p53を発現しうる多数のcloneを効率良く得ることができた。正常型p53により細胞増殖を抑制することができ、癌抑制遺伝子p53による卵巣癌の遺伝子治療の可能性を初めてin vitroで実証した。