

4 . プロジェクト研究

研究課題 1

肺癌細胞の遺伝子発現プロファイルと抗癌剤感受性

Prediction of chemosensitivity by gene-expression profiling in lung cancer

研究者氏名 呼吸器内科部 堀尾芳嗣

共同研究者 荻部陽子, 富田秀太, 谷田部恭, 高橋 隆

[目的]

肺癌は1998年以降癌死亡原因のトップとなり、日本人男性の癌死の1位、女性の2位を占める予後不良の悪性腫瘍である。しかし、現状における肺癌の化学療法の効果は十分とは言えず、best supportive care に比べれば有意な生存期間の延長を得られるものの治療にはほど遠い。プラチナ製剤 + 新規抗癌剤による治療でも、非小細胞癌の奏効率は30-40%と低く、患者の持つ癌の遺伝子発現情報などに基づく個別化治療による治療成績の向上が不可欠と考えられている。この研究は、肺癌細胞株を用いて抗癌剤感受性と癌細胞の遺伝子発現の網羅的探索を通じて、抗癌剤感受性予測の可能性を探索することにある。

[方法・結果]

ヒト肺癌細胞株（非小細胞癌と小細胞癌）20種類と肺癌治療に汎用される抗癌剤シスプラチン、カルボプラチン、エトポシド、SN-38（CPT-11の代謝活性体）、ゲムシタビン、ピノレリン、パクリタキセル、ドセタキセル、アムルピシンを用いる。感受性試験は、MTS アッセイにて行い、in vitro での各種抗癌剤のIC50値を明らかにした。cDNA マイクロアレイ（Invitrogen の GeneFilter Human Microarray Release I & II）による約9,000遺伝子の発現データのうち、再現性がありかつカット・オフ値以上の発現強度の340遺伝子の発現強度と各種抗癌剤のIC50値との相関係数の高い抗癌剤感受性規定遺伝子候補を複数見出した。その候補となる遺伝子の発現とIC50値の相関の再現性の検討をリアルタイム PCR にて行った。

また、アムルピシンとSN-38、ゲムシタビン、ピノレリン、パクリタキセルとの間に、2つの細胞株を用いて in vitro での抗がん剤併用の感受性試験を行い、相乗効果があるかどうかの検討を行った。アムルピシンとピノレリンなどにおいて弱い相乗効果を認めた。

[結語]

cDNA マイクロアレイによる候補遺伝子に関する解析は、肺癌の遺伝子情報に基づく個別化治療に発展して併用化学療法の奏効率が大幅に上昇し、生存期間の延長につながる可能性がある。但し、今回の研究を通じて in vitro での抗がん剤併用の感受性試験や cDNA マイクロアレイの結果の解釈には慎重さが必要であることやさらなる検証が必要であることを痛感した。

研究課題 2

飲酒・喫煙による食道がんの発がん危険度に影響を与える遺伝子の多型の検索

Isolation of genetic polymorphisms which influence the esophageal cancer risk of smoking and drinking

研究者氏名 中央実験部 組本博司

共同研究者 篠田雅幸

以前からの研究により、我々は *L-myc* 遺伝子のイントロン2に存在する多型（L，S）について、飲酒・喫煙による食道がんの発がん危険度はともに遺伝子型ごとに大きく異なるという結果を示してきた。しかしながら、多型は *L-myc* 遺伝子のイントロン2に存在するため、なぜ食道がんの飲酒・喫煙による発がん危険度に関与するかは明かではなかった。そのメカニズムを明らかにするため、昨年度まず mRNA の発現量を食道がん培養細胞株を用いて調べたが、リアルタイム PCR において遺伝子型ごとの差異は見られなかった。次に *L-myc* mRNA の5' 非翻訳領域が IRES（Internal ribosome entry site）の活性を持ち、*L-myc* タンパク質の発現量を調節していることを明らかにした。さらに、この領域を検討したところ新規多型を2カ所多型を見いだした。

本年度は、これら新規多型に関して、ハプロタイプの解析、IRES 活性、喫煙・飲酒による食道がんの発がん危険度について解析した。*L-myc* mRNA の5' 非翻訳領域に存在する2カ所の多型は、C/A の多型とその約20塩基下流のGの繰り返し、8又は9、あるいは完全に欠失している多型であった。詳細な解析により C-8 G 型、A-9 G 型またはGの繰り返し欠失した C-ΔG 型の3ハプロタイプを形成していることが明らかになった。しかしながら、2種類のルシフェラーゼ遺伝子間にこの領域をクローン化したアッセイではハプロタイプ間に IRES 活性の差は検出できなかった。そこで、この領域を mRNA 上の本来の位置である5' 末端に接続し、HeLa S3およびcos7細胞に導入して、IRES 活性を調べたところ、どちらの細胞においても C-8 G 型の方が A-9 G 型より2倍程度活性が高かった。このことは *L-myc* 蛋白質の発現量にハプロタイプ間で違いがある可能性を示唆している。さらに、食道がん患者90例、非がん患者241例の遺伝子型を調べ、喫煙及び飲酒による食道がん発がん危険度を解析したところ、喫煙による危険度は、A-9 G/A-9 G、A-9 G/C-8 G、C-8 G/C-8 G 型でそれぞれ6.09, 9.48, 1.33となっており、遺伝子型ごとの危険度に差が見られた。また、飲酒による危険度は、それぞれ19.30, 14.83, 6.05となっていた。さらに、エキソン1の多型はイントロン2の多型と連鎖不平衡を示すことも明らかとなった。これらの結果から、*L-myc* 遺伝子のイントロン2に存在する多型の喫煙・飲酒による食道がん発がん危険度への影響は、エキソン1の多型の結果を反映していることが示唆される。

研究課題 3

増殖型単純ヘルペスウイルス及び HSV アンブリコンベクターを用いた新規ウイルス療法の開発—婦人科悪性腫瘍への応用をめざして—

Replication-selective virotherapy combined with HSV amplicon vectors for gynecologic cancer

研究者氏名 婦人科部 那波明宏

共同研究者 葛谷和夫, 鶴見達也

(1) 卵巣癌治療に適した抗腫瘍効果を有する新規ヒト単純ヘルペスウイルス (HSV) の開発

卵巣癌治療に適した新規ヒト単純ヘルペスウイルス (HSV) を開発する目的で増殖型 HSV を改変した。さらに、その治療効果を評価するために、卵巣癌腹膜播種ヌードマウスモデルにおいて、卵巣癌に対する代表的抗癌剤である taxol との治療効果を比較検討した。ICP 6 gene を lac-Z gene の挿入により不活化した HSV 1 型変異株 (hrR 3) ならびに ICP 6 gene を lac-Z gene の挿入により不活化しかつ感染細胞に細胞融合を誘導する HSV 1 型変異株 (HR522) を作製した。7 週齢 BALBc/nunu 腹腔内に 1×10^7 HRA 卵巣癌細胞を注入移植後 7, 14 日目に 5×10^7 pfu (high titer), 5×10^6 pfu (low titer) の作製した各ウイルス、或いは、taxol (20mg/kg) を腹腔内投与した。low titer ウイルス投与群では、2 回目のウイルス投与後 5, 10 日目に ganciclovir (GCV; 1 mg/body; i.p) を追加した。各治療群における生存率の有意差検定は Log-Rank 法にて評価し、抗腫瘍効果を病理学的に検討した。無治療群では腫瘍細胞接種後 16 日までに全例死亡した。これに対して腫瘍接種後 60 日以上長期生存は、HR522 + GCV 治療群の 71%, hrR 3 単独治療群の 67% に見られ、taxol 治療群と比較して明らかに生存率の改善が認められた ($p < 0.0001$)。HR522 注入後 30 日目までは腫瘍組織内にのみ blue-stained 感染細胞が認められ、その部位に一致してアポトーシスによる抗腫瘍効果を認めた。さらに、HR522 は親株 hrR 3 と比べると明らかに ganciclovir との併用治療効果が有意に優れていた。

(2) タキソールプロドラッグと活性化酵素導入 HSV アンブリコンシステムによる新たな VDEPT の開発

ウイルス療法を卵巣癌治療へ応用する場合、化学療法との併用の仕方を検討することは極めて重要である。そこで、タキソールプロドラッグと活性化酵素導入 HSV アンブリコンシステムによる新たな VDEPT の開発を計画した。卵巣癌治療用 HSV アンブリコンシステムを確立、検証する前段階として、この遺伝子が in vivo で実際に発現するかどうかを確認する必要がある。このため、まず、卵巣癌 SKOV-3 細胞に、テトラサイクリン誘導型発現ベクターである tet-off vector を使用し、rabbit carboxylesterase を誘導発現できる stable transfectant SKOV-3 RCES-9 細胞を樹立した。SKOV-3 細胞はヌードマウス移植実験に使用出来る細胞である。ドキシサイクリンの非存在下で carboxylesterase 活性は、ドキシサイクリンの存在下と比べ約 10 倍の上昇を示した。タキソールプロドラッグは、近畿大学薬学

部 岩城教授の研究室で調製した。タキソール 2' 位にエチル基をエステル置換したものである。現在までの薬理学的検討にて以下の点が判明している。A) ヒト血清中では比較的安定で、10 時間後でもほとんど活性型タキソールに分解しない。B) マウス、ラット血清中では約 15 分で活性型タキソールに分解される。これは、この 2 種の血清中に分泌型 carboxylesterase が存在するためと考えられる。C) MDR 強発現の大腸癌 Caco-2 細胞の薬剤取り込み実験において、タキソールは細胞外にくみ出しを受けたが、タキソールプロドラッグはくみだされなかった。このことは、タキソール薬剤耐性克服にプロドラッグ化が有利に働くことを示唆している。HSV アンブリコンベクターの作製は、DNA 複製開始点 (ori) と a 配列 (packaging site) とを持つ環状 DNA として pHGCX (CMV プロモーター、GFP 遺伝子挿入) を用いた。現在、MDR 強発現細胞株である KBC-2 を用いて、活性化酵素発現効率およびタキソールプロドラッグの抗腫瘍効果を検討中である。

研究課題 4

TEL-AML 1 陽性 B 細胞白血病の発症機構解析

Analysis of molecular pathways leading to B cell leukemia harboring TEL-AML 1

研究者氏名 遺伝子医療研究部 都築 忍

共同研究者 森島泰雄, 中村栄男, 瀬戸加大

[緒言]

TEL-AML 1 は t (12; 21) 染色体相互転座により形成される異常融合遺伝子で、この異常をもつ白血病は、小児白血病中最多の 25% を占める。TEL-AML 1 融合遺伝子は出生前 (胎児期) にすでに検出されるものの、生後数年を経ないと白血病を発症しない。このことから、TEL-AML 1 細胞は直ちには異常増殖能を獲得せず、未分化なまま、かつ細胞死を起こさず体内にとどまり、何らかの付加異常を獲得することによりはじめて白血病化するという 2 段階の白血病化機構が想定される。

[目的]

そこで本研究では、(1) TEL-AML 1 融合遺伝子の機能を明らかにし、さらに (2) 生後に起こる付加異常を同定し、TEL-AML 1 とあわせて白血病の発症機構を明らかにすることを目的とする。

[方法]

(1) マウスの造血細胞に TEL-AML 1 遺伝子を導入し、この細胞を骨髓移植することにより、TEL-AML 1 発現細胞がどのような性質・異常をもつかを明らかにする。(2) 付加的遺伝子異常を明らかにするために、臨床検体を用いたアレイ CGH 解析を行う。(3) (2) で見出した付加的異常をマウスに再現して白血病化にどのように寄与するか解析する。

〔結果〕

(1) TEL-AML 1 遺伝子を発現する血液細胞は、マウス体内で次第に増加した。(2) TEL-AML 1 発現血液細胞は、骨髓球系の分化には異常は見られなかったが、B 細胞の分化には異常をきたし、特にプロ B 細胞の蓄積が顕著であった。この知見は、TEL-AML 1 白血病がプロ B 細胞性であることと符合する。しかしながら、1 年以上経過しても白血病を発症することにはなかった。(3) 臨床検体を用いた解析により、12p の特定領域の欠失が多数の症例にみられたことから、これが白血病化に必要な付加異常である可能性が示唆された。(4) そこで、TEL-AML 1 を発現し、かつ上記12p の責任遺伝子が欠失した血液細胞を作成するために RNA 干渉法を用いた。現在、TEL-AML 1 と付加異常 (12p 責任遺伝子発現の欠失) の両方をもった血液細胞の動態をマウスを用いて解析している。

〔結語〕

TEL-AML 1 を発現する細胞は、B 細胞に異常をきたしつつ生体内で増殖することを見出した。このことは、プロ B 細胞性白血病を発症する上で重要なステップであると考えられる。しかしながら、1 年以上経過しても白血病は発症せず、従って何らかの付加異常が白血病化に重要であることがわかる。臨床検体を用いた解析から、12p の特定領域の欠失がこの付加的異常である可能性が示唆された。TEL-AML 1 を発現し、上記12p 責任遺伝子の発現を欠いた血液細胞を作成することに成功したので、今後さらに解析を進めて、白血病化への寄与について解析して行きたい。