

アデノウイルス 5 型初期遺伝子 E4orf6/7 による

P 53依存性細胞死の誘導

学位論文内容の要旨

【本研究の意義, 目的および方法】近年の分子腫瘍学の進歩により, がん細胞の増殖や転移のメカニズムを遺伝子レベルで解明することが可能となった. そのため, 従来の外科療法, 化学療法, 放射線療法に加え, 遺伝子治療によってがんの抑制を図ることもまた可能となってきている. 我が国ではわずか数種類を数える遺伝子治療臨床研究プロトコール数も, 米国では百数十を越えており, その大半はがんを対象としている. 遺伝子治療全般で最もよく用いられているベクターはレトロウイルスであるが, 最近ではがんを対象にしたアデノウイルス (Ad) ベクターも増加傾向にある. しかし, Adベクターの腫瘍特異性や細胞増殖抑制能については基礎的に解決すべき課題が残されており, 今後もAdの遺伝子解析を通してベクターの開発に貢献していかなければならないと考えられる.

Adの初期遺伝子産物E1Aやヒトパピローマウイルス (HPV) 16型, 18型の初期遺伝子産物E7はがん抑制遺伝子産物であるRBと結合することが知られている. E1AあるいはE7がRBと結合すると, RBと複合体を形成し不活化している細胞転写因子E2FがRB-E2F複合体から遊離し活性化される. 一方, E2F遺伝子は過剰発現させることによって細胞にアポトーシスを起こすことが知られている. Ad初期遺伝子E4は複数の遺伝子読み取り枠 (open reading frame: orf) を持つが, その遺伝子産物のひとつE4orf6/7は Ad E2遺伝子上流のプロモーター領域に結合したE2Fと複合体を形成し, E2プロモーターからの転写を活性化する. 本研究では転写因子E2Fの安定活性化に関与する第二のAd初期遺伝子E4orf6/7に着目し, その機能を解析する目的でまずAd 5型 (Ad5) E4orf6/7 cDNAをRT-PCRによりクローニングした. 次にこれを発現するプラスミドおよび組み換えアデノウイルスを作製し, E4orf6/7の転写活性はCATアッセイにより, 細胞増殖抑制能はG418コロニーアッセイにより, そしてアポトーシス誘導能は組み換えアデノウイルス感染NRK細胞のsub G1分画をフローサイトメトリーにより定量して検討した. また, E4orf6/7の部分

欠失変異株を作製し、転写活性およびアポトーシス誘導能に關与するE4orf6/7の機能ドメインの同定を試みた。

【結果および考察】 E2F結合配列を2つ有するAd E2プロモーター下流にCAT遺伝子を組み込んだCATリポータープラスミドをE4orf6/7発現プラスミドとともにCV-1細胞に導入して行なったCATアッセイにより、E4orf6/7 cDNAがE4全領域を含むE4断片とほぼ同レベルでE1A 12Sの転写活性を増強することが示された(相対活性比で約7倍)。G418コロニーアッセイによりE4orf6/7の細胞増殖抑制効果を検索した結果、E4orf6/7は初代培養REF細胞、3Y1細胞の増殖を抑制し(細胞生残率で約25-30%)、がん抑制遺伝子p53を両アレル欠失する10(1)細胞の増殖を抑制しなかった(細胞生残率で約90%)。このことからE4orf6/7の細胞増殖抑制能はp53依存性であることが示唆された。また、組み換えアデノウイルスの感染実験からE4orf6/7遺伝子がアポトーシス活性を有し、この活性がp53に依存性であることが示された。さらに、E4orf6/7欠失変異株の導入実験においてE4orf6/7のC末59アミノ酸をコードする変異株に転写活性および細胞増殖抑制能を認めた。以上の結果は、Ad E1AやHPV E7によるE2Fの遊離活性化と同様、E4orf6/7によるE2Fの安定化が細胞のアポトーシスを誘導することを示唆している。

【結論】 Ad5 E4orf6/7遺伝子の機能を検討する目的で、Ad5 E4orf6/7を発現するプラスミドおよび組み換えアデノウイルスを作製して転写活性化能、細胞増殖抑制能、アポトーシス誘導能について解析した。またE4orf6/7の変異株を作製して、E4orf6/7遺伝子における機能ドメインを同定し、以下の結論を得た。

1. E4orf6/7遺伝子はE1A誘導性E2転写活性を増強する活性を有し、そのメカニズムはE4orf6/7遺伝子産物が転写因子E2Fと結合し安定な活性型複合体を形成すること、すなわちE2プロモーター上におけるE2Fの安定化によることが強く示唆された。
2. E4orf6/7遺伝子はげっ歯類動物線維芽細胞REF, 3Y1の増殖を抑制し、またp53を欠失する10(1)細胞では細胞増殖抑制が認められないため、E4orf6/7遺伝子の細胞増殖抑制能はp53に強く依存すると考えられた。
3. p53の過剰発現によりE4orf6/7発現組み換えアデノウイルスがラットNRK細胞にアポトーシスを誘導することから、E4orf6/7遺伝子はp53依存性アポトーシスを誘導すると考えられた。
4. E2転写活性化および細胞増殖抑制に必要なE4orf6/7遺伝子の機能ドメインはE4orf6/7のC末59アミノ酸にマップされた。また、p53依存性アポトーシスの誘導に必要なE4orf6/7遺伝子の機能ドメインも同領域に存在することが予想された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 中 村 太 保
副 査 教 授 渡 邊 継 男
副 査 教 授 久 保 木 芳 徳

学 位 論 文 題 名

アデノウイルス 5 型初期遺伝子 E4orf6/7 による p53依存性細胞死の誘導

審査は審査担当者2名(主査中村(太)と副査久保木)と副査1名(渡辺)により2回に分けて口頭により行われた。

Ad (アデノウイルス) の初期遺伝子産物E1Aやヒトパピローマウイルス (HPV) 16型, 18型の初期遺伝子産物E7はがん抑制遺伝子産物であるRBと結合することが知られている。E1AあるいはE7がRBと結合すると, RBと複合体を形成し不活化している細胞転写因子E2FがRB-E2F複合体から遊離し活性化される。一方, E2F 遺伝子は過剰発現させることによって細胞にアポトーシスを起こすことが知られている。Ad 初期遺伝子E4は複数の遺伝子読み取り枠 (open reading frame: orf) を持つが, その遺伝子産物のひとつE4orf6/7は Ad E2遺伝子上流のプロモーター領域に結合したE2Fと複合体を形成し, E2プロモーターからの転写を活性化する。本研究では転写因子E2Fの安定活性化に関与する第二のAd初期遺伝子E4orf6/7に着目し, その機能を解析する目的でまずAd 5型 (Ad5) E4orf6/7 cDNAをRT-PCRによりクローニングした。次にこれを発現するプラスミドおよび組み換えアデノウイルスを作製し, E4orf6/7の転写活性はCATアッセイにより, 細胞増殖抑制能はG418コロニーアッセイにより, そしてアポトーシス誘導能は組み換えアデノウイルス感染NRK細胞のsub G1分画をフローサイトメトリーにより定量して検討した。また, E4orf6/7の部分欠失変異株を作製し, 転写活性およびアポトーシス誘導能に関与するE4orf6/7の機能ドメインの同定を試みた。

結果

E2F結合配列を2つ有するAd E2プロモーター下流にCAT遺伝子を組み込んだCATリポータープラスミドをE4orf6/7発現プラスミドとともにCV-1細胞に導入して行ったCATアッセイにより, E4orf6/7 cDNAがE4全領域を含むE4断片とほぼ同レベルでE1A 12Sの転写活性を増強することが示された(相対活性比で約7倍)。G418コロニーアッセイによりE4orf6/7の細胞増殖抑制効果を検索した結果, E4orf6/7は初代培養REF細胞, 3Y1細胞の増殖を抑制し(細胞生残率で約25-30%), がん抑制遺伝子p53を両アレル欠失する10(1)細胞の増殖を抑制しなかった(細胞生残率で約90%)。

このことからE4orf6/7の細胞増殖抑制能はp53依存性であることが示唆された。また, 組み換えアデノウイルスの感染実験からE4orf6/7遺伝子がアポトーシス活性を有し, この活性がp53に依存性であることが示された。さらに, E4orf6/7欠失変異株の

導入実験においてE4orf6/7のC末59アミノ酸をコードする変異株に転写活性および細胞増殖抑制能を認めた。以上の結果は、Ad E1AやHPV E7によるE2Fの遊離活性化と同様、E4orf6/7によるE2Fの安定化が細胞のアポトーシスを誘導することを示唆していると考えられた。

【結論】 Ad5 E4orf6/7遺伝子の機能を検討する目的で、Ad5 E4orf6/7を発現するプラスミドおよび組み換えアデノウイルスを作製して転写活性化能、細胞増殖抑制能、アポトーシス誘導能について解析した。またE4orf6/7の変異株を作製して、E4orf6/7遺伝子における機能ドメインを同定し、以下の結論を得た。

1. E4orf6/7遺伝子はE1A誘導性E2転写活性を増強する活性を有し、そのメカニズムはE4orf6/7遺伝子産物が転写因子E2Fと結合し安定な活性型複合体を形成すること、すなわちE2プロモーター上におけるE2Fの安定化によることが強く示唆された。

2. E4orf6/7遺伝子はげっ歯類動物線維芽細胞REF, 3Y1の増殖を抑制し、またp53を欠失する10(1)細胞では細胞増殖抑制が認められないため、E4orf6/7遺伝子の細胞増殖抑制能はp53に強く依存すると考えられた。

3. p53の過剰発現によりE4orf6/7発現組み換えアデノウイルスがラットNRK細胞にアポトーシスを誘導することから、E4orf6/7遺伝子はp53依存性アポトーシスを誘導すると考えられた。

4. E2転写活性化および細胞増殖抑制に必要なE4orf6/7遺伝子の機能ドメインはE4orf6/7のC末59アミノ酸にマップされた。また、p53依存性アポトーシスの誘導に必要なE4orf6/7遺伝子の機能ドメインも同領域に存在することが予想された。

以上が本論文の要旨である。

引き続き論文提出者に本論文内容およびその関連事項、本研究の今後の発展性などについて質問された。

これらの質問に対して論文提出者より明快かつ適切な解答が得られた。

以上より、本論文提出者は博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。