

## 学位論文題名

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤と癌抑制遺伝子 p53  
遺伝子導入は相乗的に癌細胞のアポトーシスを誘導する

## 学位論文内容の要旨

癌抑制遺伝子 p53 の変異はヒト癌において最も多く認められる遺伝子異常である。p53 変異や欠失によって p53 の機能を喪失している癌細胞に正常 p53 遺伝子を導入するとアポトーシスが誘導され、造腫瘍性が失われることが報告されてきた。p53 遺伝子導入の臨床治験の結果は 60% 以下の患者でのみ効果が認められたとの成績が得られた。さらに、ある種の癌細胞は p53 遺伝子の導入によるアポトーシスに抵抗性であることが知られている。したがって p53 遺伝子導入療法をより効果的にするためには、併用薬剤の探索が重要と考えられる。現在は放射線療法や化学療法がそのような併用療法の候補として臨床的に検討されている。

Trichostatin A (TSA) は当初抗真菌剤として見出された抗生物質であるが、最近ヒストン脱アセチル化酵素を阻害することが報告された。さらに哺乳動物細胞の細胞周期を特異的に阻害し、白血病細胞や癌細胞のアポトーシスを誘導することも数多く報告された。従ってヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は、直接アポトーシスを誘導する機序を介する以外に、p53 遺伝子発現の亢進や p53 の下流遺伝子発現亢進等の機序を介して、p53 遺伝子導入と相乗的にアポトーシスを誘導する可能性を仮説として考えることもできる。

まず第一に TSA や FR901228 が p53 遺伝子導入と相乗的に癌細胞のアポトーシスを誘導するの否かを検討した。ついで p53 遺伝子導入とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の同時処理後の p53 遺伝子発現量、p53 の下流で働くアポトーシス関連蛋白質の mRNA 発現量、ミトコンドリアの膜電位、カスパー 3 活性を検討した。

その結果、1) MDA-MB-231 細胞を p53 遺伝子導入とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による相乗的に癌細胞死誘導した。PCI-10 と SW-480 細胞では、同様に相乗効果を認めた。2) MDA-MB-231 細胞を TSA 単独および併用処理した後の p53 mRNA も蛋白質も発現増加が示さなかった。3) MDA-MB-231 細胞を p53, TSA 単独および併用処理した後の p21 mRNA が 25 MOI 濃度の Ad-p53 導入によって誘導された。TSA の併用は p21 mRNA 発現に対して p53 単独と比較して若干の相加的效果しか認められなかった。p53 導入が p21 プロモーター活性を誘導していることを示しており、TSA は若干の増加効果を示した。Bax mRNA 発現も同様に 25 MOI 濃度の Ad-p53 導入によって誘導された。しかしながら TSA は Bax mRNA 発現の増強効果を示さなかった。ルシフェラーゼアッセイも同様に TSA が Bax のプロモーター活性を増強しなかった。その他に p53 の下流にてアポトーシスに関連するとされている蛋白群の発現についても検討したが、PIG3 と PERP は Ad-p53 導入によって誘導されたが、TSA の併用は何らの増強効果も示さなかった。4) MDA-MB-231 細胞を p53, TSA 単独および併用処理した後のミトコンドリア膜電位の変化を示している。p53 単独や TSA 単独処理後にはミトコンドリア膜電位の軽度の低下を認めるが、併用すると少なくとも TSA 250nM ではミトコンドリア膜電位相乗的に低下させることが明らかになった。TSA 以外のヒストン脱アセチル化酵素 FR901228 も同様に p53

と併用すると相乗的にミトコンドリア膜電位を低下させた。5) P53 単独では100MOI まで濃度をあげてもカスパー3 活性の軽度の上昇しか認められなかった。同様に TSA 単独(250 and 500 nM)でもカスパー3 活性の軽度の上昇しか認められなかった。一方両者を併用すると相乗的なカスパー3 活性の上昇を濃度依存的に認めた。

以上の結果は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤単独、また p53 導入単独では低レベルのアポトーシスを誘導するのみであったが、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤と p53 遺伝子導入を併用することで相乗的に癌細胞株のアポトーシスを誘導できた。その機序については、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤と p53 遺伝子導入によって引き起こされた細胞死シグナルがミトコンドリア膜電位を相乗的に低下させる可能性が示唆された。正常 p53 導入によって癌細胞がアポトーシスに陥るその機序はいまだ明確ではない。本研究で、p53 遺伝子導入によって誘導されると報告されてきた p21 と Bax の転写が、p53 遺伝子導入単独によって誘導されることを示したが、p21 と Bax の転写レベルとアポトーシスには何らの関係も見出されなかった。この事実は、ある種の細胞においては Bax の転写がアポトーシス誘導には十分ではないことを示唆する。さらに、p53 遺伝子導入と TSA の併用によって bcl-2 を含めて p53 の下流にてアポトーシスに関与すると報告されてきたさまざまな遺伝子発現に変化がなかったこと、ミトコンドリア膜電位の相乗的低下、カスパー3 活性の相乗的増強という結果が得られたことは、p53 遺伝子導入と TSA の併用が何らかの機構で相乗的にミトコンドリア膜電位を低下させ、続いてカスパーカスケードを動かしてアポトーシス誘導の増強をもたらしていると考えられる。TSA 単独でもミトコンドリア膜電位を p53 非依存的に低下させており、TSA や FR901228 がミトコンドリア膜電位の低下と言う段階にて p53 遺伝子導入と相乗効果をもたらしたと考えられる。著者の成績は、p53 アデノウイルスの注射部位から離れた部位に存在して導入 p53 コピー数が少ない細胞に対してもヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を併用することでアポトーシスを誘導できる可能性を示唆するとともに、p53 導入単独に抵抗性の癌細胞株にもヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を併用することでアポトーシスを誘導できる可能性も示唆する。すでに FR901228 は生体にも使用可能であることが報告されており、著者らは現在 FR901228 と p53 導入の併用効果の *in vivo* 効果を検討している。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博  
副 査 教 授 守 内 哲 也  
副 査 教 授 今 村 雅 寛  
副 査 教 授 長 嶋 和 郎

## 学位論文題名

### ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤と癌抑制遺伝子 p53 遺伝子導入は相乗的に癌細胞のアポトーシスを誘導する

申請者はまず Trichostatin A (TSA) や FR901228 が p53 遺伝子導入と相乗的に癌細胞のアポトーシスを誘導するの否かを検討した。 ついで p53 遺伝子導入とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の同時処理後の p53 遺伝子発現量, p53 の下流で働くアポトーシス関連蛋白質の mRNA 発現量, ミトコンドリアの膜電位, カスパー3 活性を検討した。 MDA-MB-231 細胞を p53 遺伝子導入とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤併用処理によって相乗的に細胞死が誘導された。 p53 遺伝子導入単独と併用処理を比較すると p53 mRNA 量も蛋白質量も増加していなかった。 TSA 処理は Bax mRNA 発現の増強効果を示さず, Bax のプロモーター活性の増強も示さなかった。 p53 の下流にてアポトーシスに関連するとされている他の蛋白群の発現についても検討したが, p53 遺伝子導入単独と比較して TSA の併用は何らの増強効果も示さなかった。 p53 単独や TSA 単独処理後にはミトコンドリア膜電位の軽度の低下を認めるのみであるが, 併用すると相乗的に低下させることが明らかになった。 TSA 以外のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 FR901228 も同様に p53 と併用すると相乗的にミトコンドリア膜電位を低下させた, また両者を併用すると相乗的なカスパー3 活性の上昇を濃度依存的に認めた。 以上の結果は, ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤と p53 遺伝子導入の併用療法は, 相乗的にミトコンドリア膜電位の低下とカスパー3 の活性化を介してアポトーシスを誘導することを示唆する。 また両者の併用遺伝子治療は有用と考えられた。

口頭発表後, 副査守内教授からヒストン脱アセチル化酵素阻害剤と p53 遺伝子導入併用の報告の有無について, FR901228 の生体内投与の可能性について, ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤と p53 遺伝子導入の臨床応用の可能性についての質問があった。 申請者はこれらに対し「今までの両者併用報告が少ないこと, FR901228 の生体内での使用可能, FR901228 単独ではすでに臨床治験も行われており, p53 遺伝子導入との併用は期待できると考えられる。」と回答した。 次いで, 副査今村教授から, p53 遺伝子の作用機序について, TSA と FR901228 によるカスパー3 活性の増加の差についての質問があった。 申請者は, 「導入した p53 の発現が mRNA, 蛋白質レベルでは TSA 併用による増強が認められなかったことや p53 の下流遺伝子の発現増強もみとめられなかったことから p53 非依存的の pathway を介して apoptosis を誘導する可能性が考えられること, TSA と FR901228 のヒストン脱アセチル化酵

素阻害作用機序はまた明らかになっていないので明確には答えられない。」と回答した。副査長嶋教授から、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の機能としてミトコンドリアの膜電位を調べるに至った経緯について、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は他の遺伝子の転写活性化について、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤と p53 遺伝子導入によるカスパー3活性の増加率と FACS 解析でのアポトーシスの増加度についての質問があった。申請者は、「p53 の下流遺伝子の発現増強もみとめられなかったこと、培養細胞で見ると、形態的に変化は見られなかったこと、カスパー3活性の増加率はアポトーシスの増加を説明可能と考えられる。」と回答した。さらに、主査の浅香教授から、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤と p53 遺伝子導入の期待する効果について、低酸素下におけるアポトーシス誘導効果についての質問があった。申請者は、最初の質問に対して「今回の結果により、p53 アデノウイルスの注射部位から離れた部位に存在して導入 p53 コピー数が少ない細胞に対してもヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を併用することでアポトーシスを誘導できる可能性を示唆するとともに、p53 導入単独に抵抗性の癌細胞株にもヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を併用することでアポトーシスを誘導できる可能性もある。」と回答し、2 番目の質問には「低酸素のアポトーシスを誘導について今後検討する必要がある。」と回答した。最後に浅香教授が、上記審査員の質問への補足質問とその回答の確認を行って、発表を終了した。

本研究は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は p53 遺伝子導入と相乗的に癌細胞のアポトーシスを誘導したことをはじめて明らかにしたこと、また両者の併用遺伝子治療は有用と考えられたことで高く評価された。今後のさらなる研究と将来の癌治療への応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。