

学 位 論 文 題 名

DNPim-1は SCID マウスにおける
膵癌細胞の in vivo 増殖を抑制する

学位論文内容の要旨

【目的と背景】

低酸素条件下では Hypoxia inducible factor-1(以下 HIF-1)の発現が亢進し、下流にあるさまざまな適応応答遺伝子の発現を介して低酸素環境に適応している。そこで、低酸素下で発現が亢進してアポトーシス抵抗性となる遺伝子を二次元電気泳動によって網羅的に探索した。

当初マウス白血病ウイルスの proviral insertion によって活性化する proto-oncogene として同定されていた Pim-1 が低酸素下で発現亢進することが見出された。Pim-1 は serine threonine kinase の一種で、抗アポトーシス作用を持つことが報告されていた。従って低酸素下で固形癌に強発現した Pim-1 が低酸素ストレスから細胞を保護する可能性が予想された。予想通り実際癌細胞が低酸素下で抗癌剤耐性を獲得し、dominant negative Pim-1(DNPim-1)導入株では低酸素下で獲得した抗癌剤耐性が消失することが最近 Cancer Res に報告された。この報告は Pim-1 がアポトーシス抑制のみならず固形癌の自然耐性に関与している可能性を示唆するものであった。また Pim-1 は、DNPim-1 導入株の造腫瘍性が失われることから固形癌の in vivo の腫瘍増殖にも必須な因子である可能性が示唆されている。そこで、申請者は DNPim-1 を用いた治療法として、11 個のアルギニンを融合させた DNPim-1 による遺伝子治療の可能性について検討した。

【材料と方法】

1.低酸素下で処理した腫瘍細胞株から Pim-1 を検出した。2. DNPim-1 発現 vector を作成し、DNPim-1 細胞株を樹立した。DNPim-1 導入株を SCID mouse に移植し、腫瘍増殖を検討した。3. tet-on system に DNPim-1 を組み込み、Hela 細胞に導入し、テトラサイクリンの有無による腫瘍増殖を検討した。4. 11R-DNPim-1+P3×FLAG CMV14 を作成し、293 細胞に導入し、DNPim-1 の発現を確認した。また、10nM のリコンビナント 11R-DNPim-1 を含む培地で Hela を処理し、細胞内より DNPim-1 を検出した。5.膵癌細胞株を SCID mouse の背部皮下に移植した膵癌モデルを作成し、11R-DNPim-1+P3×FLAG CMV14 を大腿筋内に投与し、腫瘍増殖を検討した。6.腫瘍組織の増殖及びアポトーシスを免疫組織学的に検討した。

【結果】

1. PCI-43、PCI-10、HCT-116 すべてにおいて、低酸素下で Pim1 蛋白の発現が亢進した。2. DNPim-1 細胞株 (3 クローン) と Vector control 株を SCID mouse の皮下に移植したところ、DNPim-1 株移植群 3 群の腫瘍が完全に消失した。3. Tet-on DNPim-1 導入株を SCID mouse の背部皮下に移植し、移植 5 日後より 14 日連続でドキシサイクリンを SCID mouse に投与した。ドキシサイクリンを投与した DNPim-1 細胞株のみ明らかな腫瘍体積の縮小を認めた。4. 11R-DNPim-1+P3×FLAG CMV14 を 293 細胞に発現させると、

細胞溶解産物と培養上清のいずれからも 11R-DNPim-1-FLAG 蛋白が検出された。5. リコンビナント 11R-DNPim-1-FLAG 発現蛋白は、主に細胞質内に存在した。6. 腫瘍に対する効果を検討したところ、(A) negative control 群では腫瘍は増殖し続けた。他の 3 群 ((B)DNPim-1 500 μ g 群、(C)DNPim-1 1000 μ g 群、(D)positive control 群) の腫瘍はいずれもほぼ完全に退縮した。B-D 群はいずれも A 群に対して有意差をもって腫瘍体積の減少を認めた。7. Anti-FLAG 免疫染色では DNPim-1 群、negative control 群両群共に大腿筋に投与された vector により生成されたペプチドが腫瘍細胞内に移行していた。増殖細胞フラクションを示す抗 MIB-1 抗体陽性細胞は、negative control 群、DNPim-1 群、positive control 群のいずれも陽性で、各群に有意差を認めなかった。アポトーシス細胞を示す抗 single strand DNA (ssDNA) 抗体陽性細胞は非常に少なく、各群に有意差を認めなかった。

【考察】

Pim-1 の機能を knock down した DNPim-1 stable transfectant は全く造腫瘍性を失っており、in vivo の膀胱癌細胞の生存、増殖に Pim-1 の機能が必須である可能性を示唆していた。Tet-on system を用いて腫瘍が生着してから Pim-1 の機能を消去したところ、腫瘍が有意差をもって縮小しており、腫瘍組織が大きくなった状態でも生存や増殖に関して Pim-1 の機能が必須であること、また、持続的に Pim-1 の作用を阻害することで抗腫瘍効果が得られる可能性が考えられた。

次に Pim-1 の機能を持続的に阻害する治療法として、11 個のアルギニンとの融合蛋白が細胞内に入ることを利用した 11R-DNPim-1 蛋白を発現する 11R-DNPim-1/P3 $\times$ FLAG CMV14 発現ベクターの大腿筋への筋肉内投与を行った。発現ベクターには Pim-1 が分泌されるように TPO signal peptide を組み込んで作成した。11R-DNPim-1/P3 $\times$ FLAG CMV14 発現ベクターによって筋肉細胞内で産生された蛋白は細胞外に分泌され、血流に乗って全身に分布し、腫瘍組織にも到達していると予想していたが、実際に免疫染色によって確認された。発現された蛋白は全身にくまなく分布すると予想されるが、癌組織のみが低酸素下にあるため、Pim-1 蛋白は癌組織を中心に発現していると予想され、癌組織を中心に Pim-1 の機能が抑制されると考えられる。この 11R-DNPim-1/P3 $\times$ FLAG CMV14 の筋肉内投与により得られた抗腫瘍効果の機序について MIB-1、ssDNA を用いた免疫染色にて検討したが、両者共に 3 群間で全く差が出なかった。この事実は DNPim-1 導入株が、低酸素低グルコース下でアポトーシスしやすくなるという以前の結果とは矛盾していた。

Pim-1 は Akt/mTOR の系を介して、BCL family の一員である Bad のリン酸化を引き起こし、anti-apoptotic に働くということが報告されており、本実験でも明らかに腫瘍細胞の縮小を認めたことから、腫瘍の縮小がアポトーシスによる細胞死によってもたらされると考えた。しかし、本研究で示したとおり、11R-DNPim-1+P3 $\times$ FLAG CMV14 で得られた抗腫瘍効果は、アポトーシスによるものであることを確認できなかった。アポトーシスではないと考えるならば、細胞死に至る別の経路を考慮に入れる必要があり、DNPim-1 の抗腫瘍効果については更なる検討が必要と思われる。抗腫瘍効果のメカニズムは不明であるが、遠隔部位に投与した naked DNA で腫瘍縮小効果が得られたことおよび Hela での DNPim-1 導入による腫瘍退縮とを考慮すると、11R-DNPim-1 発現ベクターによる遺伝子治療法が膀胱癌のみならずあらゆる固形癌の有用な治療の一つとなりうることを示唆された。

【結語】

11R-DNPim-1 発現ベクターの筋肉内投与で抗腫瘍効果を示したことから、11R-DNPim-1 を利用した遺伝子治療の可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 田 中 一 馬

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学 位 論 文 題 名

DNPim-1は SCID マウスにおける 膵癌細胞の in vivo 増殖を抑制する

低酸素条件下では Hypoxia inducible factor-1(HIF-1)の発現が亢進し、下流にあるさまざまな適応応答遺伝子の発現を介して低酸素環境に適応している。以前申請者らの研究グループでは低酸素条件下で各種癌細胞の抗癌剤抵抗性が亢進することや、マウス白血病ウイルスの DNA 挿入によって活性化する癌遺伝子である Pim-1 が低酸素下で発現亢進することを見出した。Pim-1 は抗アポトーシス作用を持つことが知られており、低酸素下で固形癌に強発現した Pim-1 が低酸素ストレスから細胞を保護する可能性が予想された。以上の仮説に基づき、今回申請者は Pim-1 の機能解析および DNPim-1 を用いた治療法として、11 個のアルギニンを融合させた DNPim-1 による遺伝子治療の可能性について検討した。DNPim-1 は Pim-1 の 1-81aa を欠失させて作成した。まず、低酸素で処理した腫瘍細胞での Pim-1 発現を確認した。次に、DNPim-1 が Pim-1 の作用を阻害することを Socs 蛋白のリン酸化で確かめた上で、DNPim-1 導入株と tet-on-DNPim-1 導入株を作成し、in vivo の腫瘍増殖について検討を行った。SCID マウスに DNPim-1 導入株を移植したところ、造腫瘍性を失った。また tet-on system に DNPim-1 を組み込んで導入株を作成して SCID マウスに移植し、DOX を用いて DNPim-1 を発現させると腫瘍増殖が抑制された。さらに、細胞内蛋白を強制的に分泌し、細胞内移行を高めるために TPO signal peptide と 11 個のアルギニンを N 末端に付加したベクター(tet-on 11R DNPim-1 vector)を作成し、そのベクターによる蛋白が強制的に分泌し、細胞内へ移行することを確かめた。次に SCID マウスの背部皮下に膵癌細胞株を移植し、11R-DNPim-1 発現ベクターを筋肉内投与したところ、腫瘍増殖は著明に抑制された。次に腫瘍組織を抗 MIB-1 抗体及び抗 ssDNA 抗体を用いて病理組織学的に細胞増殖とアポトーシスについて検討した。11R-DNPim-1 群では細胞増殖もアポトーシスも Mock に比べて有意差を認めなかった。これらの結果より、当初抗アポトーシスに働く Pim-1 を阻害することで腫瘍細胞のアポトーシスを促進し、抗腫瘍効果が出現すると考えられたが、アポトーシスとは異なる機序で抗腫瘍効果が出現している可能性がある。Hela 細胞へ導入した DNPim-1 によ

って腫瘍増殖抑制を得ていることからあらゆる固形癌に対する有力な治療法となりうることが示唆された。

口頭発表に際し、副査の田中教授より DNPim-1 を筋肉内に投与した時の腫瘍内、および血中の DNPim-1 の濃度についての検討、11R-DNPim-1 蛋白の腫瘍内投与についての検討の有無、DNPim-1 の生体への毒性により抗腫瘍効果が得られた可能性、また Pim-1 に point mutation を入れることで Pim-1 の機能阻害を起こすかどうかについての質問があった。これに対して申請者は、腫瘍内および血中の蛋白中に Western Blot 法で DNPim-1 を検知できなかったこと、11R-DNPim-1 蛋白を細胞内へ導入した際に顆粒状になっていて、実際に Pim-1 の機能阻害を起こしているかどうかは正確に知り得なかったこと、11R-DNPim-1 蛋白の腫瘍内投与は検討していないこと、サクリファイス時のマウスが皆元気であったこと、point mutation を入れたベクターについては今後の検討とすることを回答した。次いで副査の秋田教授より Pim-1 の別の作用の有無、腫瘍縮小のメカニズム、および今後の研究の発展および臨床応用についての質問があった。これに対して申請者は Pim-1 が当初 Cdc25A や p21waf といった遺伝子を制御していることから cell cycle に関わる働きがあると報告されていること、今回は提示しなかったが血管内皮に特異的な CD-31 抗体での免疫染色では DNPim-1 群で有意に陽性細胞が減少していたことから、血管新生を阻害することによるネクロシスで抗腫瘍効果を得ていることも考えられること、また、Pim-1 を阻害する small chemical compound の検索中であり、分子標的治療も考慮に入れていることを回答した。さらに、主査の浅香教授より低酸素で Pim-1 が亢進することを見出した実験法、Pim-1 knock out mouse での表現形の有無、他の癌種に対する検討につき質問があった。これに対して申請者は低酸素下で培養した細胞から抽出した蛋白を二次元電気泳動で見出したこと、Pim-1 knock out ではまったく表現形に差がないこと、Pim family をすべて knock out して初めて若干マウスの体格が減少したこと、舌癌に対する検討で気体できうる結果を得ていることを回答した。

本研究はヒト癌細胞株に対する DNPim-1 発現ベクターを用いた遺伝子治療の効果を初めて明らかにしたことで高く評価され、この研究を足がかりとして今後の癌治療への臨床応用が期待された。

審査員一同はこれらの結果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得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ものと判定した。