

学位論文題名

Trichostatin A with adenovirus-mediated p53 gene transfer synergistically induces apoptosis in breast cancer cell line MDA-MB-231

(トリコスタチン A と p53 遺伝子導入の組み合わせは MDA-MB-231 細胞株においてアポトーシスを相乗的に誘導する)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 癌抑制遺伝子 p53 の変異はヒトの癌において最も一般的な遺伝子変異であり、癌の遺伝子治療上重要なターゲットである。内在性 p53 が欠損・変異している癌細胞株に野生型 p53 を再び発現させると増殖抑制やアポトーシスが誘導されることが報告され、また臨床試験における悪性腫瘍への p53 遺伝子導入は～60%の患者に有効であることが明らかにされた。しかしある種の癌腫では p53 遺伝子導入によるアポトーシス誘導が生じないとされており、p53 遺伝子導入時のアポトーシス誘導効率を高める有効な薬剤の発見が望まれている。

トリコスタチン A (以下 TSA) は元来抗真菌薬として同定されたヒストンジアセチラーゼ阻害剤である。TSA は哺乳類細胞の細胞周期を特異的に阻害し、白血病細胞株や幾つかの大腸癌細胞株にアポトーシスを介した細胞死を引き起こす。

最近いくつかのヒストンジアセチラーゼ阻害剤が、p53 遺伝子導入と組み合わせると p53 遺伝子導入単独と比較して、アポトーシスをさらに効率的に誘導することが報告された。われわれは TSA が p53 遺伝子導入との組み合わせにより、癌細胞株において p53 遺伝子導入単独と比較して相乗的にアポトーシス誘導を引き起こすかどうかを検討した。

【材料と方法】 乳癌細胞株 MDA-MB-231 を用いた。また野生型 p53 を発現する遺伝子組み換え (非増殖性) アデノウイルスベクターを用い (以下 Ad-p53)、同癌細胞株に様々な濃度で遺伝子導入させ、その後 TSA を様々な濃度で処理し、対照群と比較した。

まず p53 の発現については Northern- Blotting 法、Western-Blotting 法、pG 13Py-luc に pRL-CMV を併用したデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイで各々 mRNA、蛋白、レポーター活性レベルを測定・確認した。p21、Bcl-2、PIG 3 の発現は Northern-Blotting 法により測定、また Bax の発現は Northern-Blotting 法及び pMO3 を用いたレポーターアッセイで確認した。

細胞死は MTS assay を用いて測定を行った。アポトーシスはアネキシン V-PI 染色の後 FACS にて測定、および TUNEL 染色にて鏡検し確認した。

またミトコンドリア膜電位は CMXRos 染色により FACS を用いて、カスパーゼ 3 活性については CasPACE Assay System Kit (Promega) により測定した。

【結果】 野生型 p53 の mRNA 発現は Ad-p53 投与群に認められ、TSA の有無による影

響は認められなかったが、p21 の mRNA 発現は Ad-p53 単独群より Ad-p53+TSA 群の方がやや強かった。同じく p53 蛋白の発現についても TSA の有無による影響はなく、両群に差は認められなかった。また p53 レポーター遺伝子アッセイでは Ad-p53 単独群より Ad-p53+TSA 群の方が有意差はないがやや高かった。

アポトーシス誘導能・細胞死誘導能・カスパーゼ 3 活性能については Ad-p53 単独群は 0~100MOI まで低レベルであったが、Ad-p53+TSA 群は TSA 単独群、Ad-p53 単独群より相乗的に高レベルであったことが AnnexinV+PI 染色、TUNEL 染色、MTS assay、CasPACE Assay System Kit の結果より示された。

またカスパーゼ阻害剤である z-VAD は Ad-p53+TSA 群において用量依存的にカスパーゼ 3 活性とアポトーシス誘導を抑制した。

しかしながら p53 誘発アポトーシスに関与していると報告されている Bax 遺伝子の発現は、mRNA レベルやレポーター遺伝子アッセイでも Ad-p53+TSA 群と Ad-p53 単独群で差を認めなかった。

また他の p53 依存性アポトーシス関連遺伝子 Bcl-2、PIG 3 についても mRNA レベルでは同様に差を認めなかった。

ミトコンドリア膜電位の測定では TSA は p53 遺伝子導入による膜電位の低下を相乗的に促進するだけでなく、TSA 単独でも用量依存的に膜電位低下を引き起こすことがわかった。

**【考察】** ヒストンジアセチラーゼ阻害剤の TSA はヒストンのアセチル化を進め、転写因子がヌクレオソーム DNA に結合するのを促進する。TSA は、転写因子である p53 がプロモータ領域への結合を強めることで、p53 依存性の下流遺伝子、例えば p21 や Bax の転写活性を高めると仮定すれば、Ad-p53 単独群より TSA+Ad-p53 群の方がより効果的に細胞周期の休止やアポトーシスを招くと考えるのは理にかなっている。本実験の結果、MDA-MD-231 細胞において TSA 単独投与の場合、500 nM までアポトーシス誘導は低レベルであったが、p53 遺伝子導入との組み合わせで相乗的に誘導された。

p53 遺伝子導入が p53 変異遺伝子の存在する細胞内でアポトーシスを誘導するメカニズムはまだ不明確である。幾つかの実験系において p53 転写活性がアポトーシスに必要であるという根拠は多くの論文で述べられており、さらにヒストンジアセチラーゼ阻害剤の中には p53 転写活性を高めアポトーシス誘導を招くとの報告もある。一方で p53 転写活性とは全く関係なくアポトーシス誘導がおこるとする報告もある。

われわれは今回、p21 や Bax の転写誘導が p53 遺伝子導入で誘発されることを明確に示したが、アポトーシス誘導能と p21 と Bax の発現レベルは必ずしも相関を示さなかった。これはある種の癌細胞にとって Bax の蛋白発現がアポトーシス誘導に十分ではないことを示唆する。

今回の検討では p53 遺伝子発現は TSA の併用によりミトコンドリア膜電位の低下とカスパーゼ 3 の活性化をもたらすことを示した。この結果から TSA が p53 遺伝子導入の際相乗的にアポトーシスを引き起こすメカニズムとしては、少なくとも Bax とは関係ないミトコンドリア膜電位の相乗的低下とカスパーゼ経路の相乗的活性化が関与している可能性が示唆された。TSA 単独でも p53 とは独立してミトコンドリア膜電位を低下させるので、本検討からは TSA による直接的な膜電位の低下に一部原因があることがうかがえた。さらに p53 はミトコンドリアに移動して膜電位を低下させその後カスパーゼ 3 を活性化させるという報告もあり、本実験の結果と矛盾しない。TSA と p53 遺伝子導入の組み合わせで誘発される細胞死シグナルはミトコンドリア膜電位の低下に収束するように思われるが、TSA と p53 遺伝子導入が相乗的にアポトーシスを誘導する仕組みを理解するためには今後様々な癌細胞株を用いた検討が必要である。

【結論】 今回の検討の結果により、低濃度の Ad-p53 と TSA 併用によってアポトーシスが誘導されるという結果は、Ad-p53 を注入した部位から離れているために Ad-p53 が低濃度な癌組織においてもアポトーシスを誘導できる可能性が示され、さらに p53 遺伝子導入単独ではアポトーシス誘導に抵抗を示す癌細胞に対しても有効である可能性も示された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

## Trichostatin A with adenovirus-mediated p53 gene transfer synergistically induces apoptosis in breast cancer cell line MDA-MB-231

(トリコスタチン A と p53 遺伝子導入の組み合わせは MDA-MB-231 細胞株においてアポトーシスを相乗的に誘導する)

癌抑制遺伝子 p53 の変異はヒトの癌において最も一般的な遺伝子変異であり、癌の遺伝子治療上重要なターゲットである。内在性 p53 が欠損・変異している癌細胞株に野生型 p53 を再び発現させると増殖抑制やアポトーシスが誘導される。しかし、ある種の癌腫では p53 遺伝子導入によるアポトーシス誘導が生じないとされており、p53 遺伝子導入時のアポトーシス誘導効率を高める有効な薬剤の発見が望まれている。トリコスタチン A (以下 TSA) は元来抗真菌薬として同定されたヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である。最近いくつかのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が、p53 遺伝子導入と組み合わせると p53 遺伝子導入単独群と比較して、アポトーシスをさらに効率的に誘導することが報告された。本研究では TSA が p53 遺伝子導入との組み合わせにより、癌細胞株において p53 遺伝子導入単独と比較して相乗的にアポトーシス誘導を引き起こすかどうかを検討した。

乳癌細胞株 MDA-MB-231 を用い、野生型 p53 を発現する遺伝子組み換え (非増殖性) アデノウイルスベクター (以下 Ad-p53) を細胞株に様々な濃度で遺伝子導入させ、その後様々な濃度の TSA で処理し、対照群と比較した。p53 の発現については Northern-Blotting 法、Western-Blotting 法、pG 13Py-luc に pRL-CMV を併用したデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイで各々 mRNA、蛋白、ルシフェラーゼ活性を測定・確認した。p21、Bcl-2、PIG 3、p53AIP-1、PERP の発現は Northern-Blotting 法により測定、また Bax の発現は Northern-Blotting 法及び pMO3 を用いた Bax レポーターアッセイで確認した。細胞死は MTS assay を用いて測定、アポトーシスはアネキシン V-PI 染色後 FACS にて測定したほか、TUNEL 染色にて鏡検し確認した。また、ミトコンドリア膜電位は CMXRos 染色により FACS を用いて、カスパーゼ 3 活性については CasPACE Assay System Kit (Promega) により測定した。

まず、野生型 p53 および p21 の mRNA 発現、p53 蛋白の発現、p53 レポーター遺伝子アッセイについては Ad-p53 投与群に認められ、TSA の有無による影響は認められなかった。アポトーシス誘導能・細胞死誘導能・カスパーゼ 3 活性能については Ad-p53 単独群は 0 ~ 100 MOI まで低レベルであったが、Ad-p53 + TSA 群は TSA 単独群、Ad-p53 単独群より

相乗的に高レベルであったことが示された。また、カスパーゼ阻害剤である z-VAD は Ad-p53+TSA 群においてカスパーゼ 3 活性とアポトーシス誘導を抑制した。

一方、p53 依存性アポトーシスに関与していると報告される Bax 遺伝子の発現は Ad-p53+TSA 群と Ad-p53 単独群で差を認めず、Bax プロモーター活性においても同様であった。他の p53 依存性アポトーシス関連遺伝子についても mRNA レベルでは差を認めなかった。ミトコンドリア膜電位の測定では TSA は p53 遺伝子導入による膜電位の低下を相乗的に促進するだけでなく、TSA 単独でも膜電位低下を引き起こすことがわかった。TSA はヒストンのアセチル化を進め、転写因子がヌクレオソーム DNA に結合するのを促進するので、Ad-p53 との併用で p53 のプロモーター領域への結合が強まり p53 依存性の下流遺伝子、例えば p21 や Bax の転写活性を高めると仮定すれば Ad-p53 単独群より TSA+Ad-p53 群の方がより効果的に細胞周期の休止やアポトーシスを招くことが予想された。そして本実験の結果 Ad-p53 単独投与の場合では低レベルであったアポトーシス誘導が TSA との組み合わせで相乗的に誘導された。一方、予想に反しアポトーシス誘導能と p21 と Bax の発現レベルは必ずしも相関を示さなかった。これはある種の癌細胞にとって Bax の蛋白発現がアポトーシス誘導に十分ではないことを示唆する。今回の検討で p53 遺伝子発現は TSA の併用によりミトコンドリア膜電位の低下とカスパーゼ 3 の活性化をもたらすことを示した。この結果から TSA が p53 遺伝子導入の際相乗的にアポトーシスを引き起こすメカニズムとして、少なくとも Bax とは関係のないミトコンドリア膜電位の低下とカスパーゼ経路の活性化が関与している可能性が示唆された。また、TSA 単独でも p53 とは独立してミトコンドリア膜電位を低下させるので、本検討からは TSA による直接的な膜電位の低下に一部原因があることがうかがえた。さらに、p53 はミトコンドリアに移動して膜電位を低下させ、その後カスパーゼ 3 を活性化させるという報告もあり、本実験の結果と矛盾しない。しかし、TSA と p53 遺伝子導入が相乗的にアポトーシスを誘導する仕組みを理解するためには今後様々な癌細胞株を用いた検討が必要である。

口頭発表に続き、副査秋田弘俊教授より MDA-MD-231 細胞株の p53 遺伝子のアレル欠損また TSA によるミトコンドリア膜電位低下の機序について、副査近藤哲教授よりミトコンドリア膜電位に着目した経緯またその相乗効果といえる根拠について、最後に主査今村雅寛教授より p53 遺伝子導入と TSA の併用療法の今後の臨床応用の可能性についての質問があった。

いずれの質問に対しても申請者はその主旨をよく理解し、自らの研究内容と文献的考察を混じえて適切に回答した。

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。