



E1B-deleted adenovirus replicates in p53-deficient lungcancer cells due to the absence of apoptosis

原田, 直樹

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2006-01-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2850

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002850>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 6 3 】

氏 名・（本 籍） 原田 直樹 （ 兵庫県 ）
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博ろ第1962号
学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当
学位授与の 日 付 平成18年1月11日

【 学位論文題目 】

E1B-deleted adenovirus replicates in p53-deficient lung
cancer cells due to the absence of apoptosis
(P53 変異型肺癌細胞内でのアポトーシス消失による E1B55 欠損型
アデノウイルスの複製)

審 査 委 員

主 査 教 授 林 祥剛
教 授 横崎 光宏
教 授 前田 盛

悪性腫瘍の中でも原発性肺癌は死亡率が非常に高く、原因の1つにその低い治癒率があげられる。仮に完全に切除出来たと考えられる症例にも、約20%では手術時点ですでに微小転移が成立していると報告されている。中でも肺小細胞癌は診断後の中間生存期間がわずか2ヶ月から4ヶ月と、短期間に不幸な転帰を辿る。腫瘍の増大が極めて速やかなこと、早期に周辺リンパ節への微小転移が成立してしまっていることなどが特徴である。現在、微小転移巣のコントロール法の確立が、肺癌治療に対する現在の課題のひとつである。一方、近年、分子生物学の発展に伴い、外科腫瘍学の領域においてもその応用が進んでいる。遺伝子治療もそのひとつであるが、微小転移巣をターゲットにした全身投与法はまだ確立されていない。

アデノウイルスのE1B55K遺伝子は、p53癌抑制遺伝子と結合することでその機能を不活化させ、結果として細胞内の増殖を可能にさせる働きを持つ。

本研究では、微小転移や散布されたP53異常を有する癌細胞に選択的に作用する新しい遺伝子治療を確立する事を目的とし、E1B55Kを欠失させた変異型アデノウイルスAxE1AdBを用い、肺癌細胞株に対する作用の検討を行った。

【対象と方法】腫瘍細胞に導入するウイルスとしてAd5d1XウイルスからE1B55Kを欠失させたAxE1AdBを使用した。このウイルスはE3領域を除去した5型アデノウイルスAd5d1Xをもとにして、E1B領域の約844base pair(nt2484-3328)を欠失させ、ここにSV40poly Aシグナル配列(約240base pair)を挿入し、さらにnt2025をCからTに点突然変異させ、STOP codon(TGA)となるように作製した(Fig.1)。

AxE1AdBに対する感受性を検討するため、原発性肺癌細胞株4種類を対象とした(p53野生型小細胞肺癌株SBC3、p53に変異のある小細胞肺癌SBC5、p53に変異のある腺癌PC3、及びp53に変異のある扁平上皮癌EBC1)。

ウイルス感染による、細胞障害性の評価のため、それぞれの細胞にAxE1AdBを感染させた後、4日後にCristal Violetによる染色を行いcytopathic effect(CPE)の検討を行った。

各々の細胞においてAxE1AdBと同タイプのアデノウイルスの感染が成立するか確認するため、増殖能力を欠失したうえでlacZを組み込んだものを使用しX-gal Stainingで細胞内のウイルスの取り込みを評価した。

また、MOI2, 20でそれぞれの肺癌細胞株の培養液中にAxE1AdBを加えた後、経時的に培養液を採取して、それぞれの培養液中のウイルス量をreal-time PCR法にて定量し複製されたウイルス量を評価。

AxE1AdBの感染によって生じる宿主細胞内での遺伝子発現の変化をスクリーニングするため、発現したmRNAを、540種類のヒトcDNAをプロットしたcDNA array(cDNA Array System "Cancer": Toyobo Co.)を用いて解析した。スクリーニングによって発現量の変化が認められた遺伝子については、同遺伝子のRT-PCRを行いmRNAの変化を確認した。

AxE1AdBを感染させた細胞をTUNEL染色し、アポトーシス誘導の有無を調べた。顕微鏡下に、連続して存在する100個の細胞を観察し、この中でアポトーシスが確認される細胞数をカウントした。ランダムな5視野においてアポトーシス細胞数をカウントし、その平均値を求めた。

【結果】それぞれの細胞株の培養液中にAxE1AdBを加え、細胞の増殖の様子を評価したところ、野生型p53を持つSBC3ではウイルスを加えた細胞においても増殖に変化は全く認められず、培養プレートが充満するまで細胞増殖は持続した。一方、p53に異常を持つSBC5ではMOI5以上で明らかに細胞増殖が抑制された。また、同様にp53に異常を持つPC3、EBC1細胞においても同様にプレート中に染色される生細胞は増殖する事は無く、細胞の増殖抑制が生じている事が確認された。また、この抗腫瘍効果はウイルス量に依存적であることが示された(Fig.3)。

Ad5d1Xウイルスをもとに組み替えられた増殖能力を持たないアデノウイルスにlacZを組み込み、これをそれぞれの肺癌細胞株の培養液に加え、感染能力の違いを検討した。染色の結果、全ての細胞で早期にMOI2以上でlacZが取り込まれていることが示され、対象とした全ての細胞株で同等に感染が成立していることが確認された(Fig.4)。

つぎに、それぞれの細胞株の培養液中にAxE1AdBを加えた後、培養液中のウイルス量の変化を経時的に測定した。ウイルス量は野生型p53を持つSBC3では増加を認めなかったが、p53に異常を持つSBC5、PC3、EBC1では増加おり、新たにウイルスの複製が行われていることが確認された(Fig.5)。

野生型p53であるSBC3と変異を持つSBC5において、各細胞におけるmRNAの発現レベルをcDNA arrayにより解析した。SBC3ではMOI2以上でBaxの発現が、コントロールと比して3倍〜5倍の上昇が確認された一方、SBC5ではAxE1AdB感染によるBAXの発現の上昇は認められなかった。その他のP53の標的遺伝子であるIGF-BP3、GADD45、p21、CyclinG1等はAxE1AdB感染による発現の有意な変化は有意な発現の変化はいずれの群においても認められな

った。また、SBC3におけるウイルス感染後のBaxの発現の上昇をRT-PCRにより確認した (Fig. 6)。

感染48時間後のTUNEL染色にて、SBC3においてアポトーシスが誘導されている細胞が有意に増加していることが確認された (Fig. 7)。

【考察】 p53はゲノムの安定性に関わる2つの重要な働きをもっている。一つはDNA損傷が生じたときそれが修復されるまでその増殖を止めることであり、もう一つはDNAに修復不能な異常が生じたときにアポトーシスを誘導する働きである。さらに、DNAの修復そのものに関することや分化の誘導にも関与することもわかってきた。そしてp53遺伝子異常の検出は、悪性腫瘍治療における新しい腫瘍マーカー、また予後推定因子としても注目されている。原発性肺癌においても小細胞肺癌の75-85%、非小細胞肺癌の45-50%でp53遺伝子異常があるとされ、本疾患の発病、そして治療におけるp53の役割について注目されている。

今回は、宿主細胞側p53を不活化させるE1B領域内の55kDa蛋白を産生する事が出来ない変異型アデノウイルスであるAxE1AdBを用いて、p53に異常をもった癌細胞に特異的な抗腫瘍効果が得られるかどうかを検討した。その結果、p53が正常に機能している小細胞肺癌では、明らかな細胞変性効果 (cytopathic effect) は認められず細胞は増殖する事が確認された。これは、野生型p53をもつ細胞ではAxE1AdBの感染が起きてもp53依存性にウイルスの増殖を阻止した結果と考えられた。TUNEL染色の結果からも、同ウイルスの感染によりアポトーシス陽性細胞が確認されることより、ウイルス感染細胞ではアポトーシスが誘導され、ウイルスの増殖を阻止しているのではないかと考えられた。一方、p53に変異を持つ肺癌細胞では強い細胞変性効果を認めた。これはAxE1AdBがp53変異のある細胞内で増殖し破壊しながら、次々と感染を繰り返した結果であると考えられた。

p53の標的遺伝子としては、アポトーシスを誘導するIGF-1 inhibitorであるIGF-BP3、Bcl-2 family遺伝子の1つであるBAXやDNA修復標的遺伝子GADD45、また、細胞周期制御遺伝子であるp21、CyclinG1、その他現在約20個以上の遺伝子が同定されている。cDNA ArrayによるmRNA expression profileをp53関連遺伝子群についてクラスタリングしたところ、野生型p53を発現する小細胞肺癌細胞SBC3において、AxE1AdB感染によりBAXの発現が有意に上昇していることが示された。BAXはBcl-2 family遺伝子の1つで、p53の下流にあたる因子であり、p53を経るアポトーシス誘導に重要な役割を果

たしていると考えられている。野生型P53を持つSBC3でのAxE1AdB感染によるBAXの上昇は、p53依存性にBAXを介する経路が主となりアポトーシスが誘導され、アデノウイルスの増殖を抑制していることを示すと考えられる。

今回使用した肺癌細胞株では上記のような結果が得られたが、その一方で、同種のウイルスに対する反応には癌細胞によって大きな格差があり、p53 statusとは必ずしも一致していないことも報告されており、AxE1AdBにおいても抗腫瘍効果のメカニズムに不明な点が多い。アデノウイルスの感染と宿主細胞の反応についても未だに検討の余地があり、今後さらに基礎的な研究が進むことが期待される。

E1B55K欠失アデノウイルスAxE1AdBは、変異型p53を持つ肺癌細胞株に特異的に抗腫瘍効果を示した。これは、宿主細胞において、野生型p53を発現する細胞でみられるBAXを介した感染細胞のアポトーシス誘導が欠如しているためと考えられた。本ウイルスのp53変異細胞に特異的な細胞障害性をターゲティング治療に応用することにより、原発性肺癌に対する外科切除術前後の潜在的微小転移巣を想定した補助療法として確立されることが期待される。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第1966号	氏名	原田 直樹
論文題目 Title of Dissertation	E1B-deleted adenovirus replicates in p53-deficient lung cancer cells due to the absence of apoptosis P53 変異型肺癌細胞内でのアポトーシス消失による E1B55 欠損型アデノウイルスの複製		
審査委員 Examiner	主査 林 祥剛 Chief Examiner 副査 杉山 光彦 Vice-examiner 副査 前田 登 Vice-examiner		
審査終了日	平成 17 年 12 月 26 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

悪性腫瘍の中でも原発性肺癌は死亡率が非常に高く、原因の1つにその低い治癒率があげられる。微小転移や散布されたP53異常を有する癌細胞に選択的に作用する新しい遺伝子治療を確立する事を目的とし、E1B55Kを欠失させた変異型アデノウイルスAxE1AdBを用い、肺癌細胞株に対する作用の検討が行われた。

本研究において、肺癌培養細胞株の培養液中にAxE1AdBを加えられたところ、野生型p53を持つ培養細胞SBC3において増殖に変化は全く認められず、培養プレートが充満するまで細胞増殖は持続した。p53に異常を持つSBC5では明らかに細胞増殖が抑制された。また、同様にp53に異常を持つPC3、EBC1細胞においても増殖抑制が生じている事が確認された。また、それぞれの細胞株の培養液中にAxE1AdBを加えた後、培養液中のウイルス量の変化を経時的に測定した。ウイルス量は野生型p53を持つSBC3では増加を認めなかったが、p53に異常を持つSBC5、PC3、EBC1では増加していることが確認された。

各細胞におけるmRNAの発現レベルをcDNA arrayにより解析では、SBC3ではBaxの発現が、コントロールと比して3倍～5倍の上昇が確認された一方、SBC5ではAxE1AdB感染によるBAXの発現の上昇は認められなかった。その他のP53の標的遺伝子であるIGF-BP3、GADD45、p21、CyclinG1等はAxE1AdB感染による発現の有意な変化は有意な発現の変化はいずれの群においても認められなかった。

感染48時間後のTUNEL染色にて、SBC3においてアポトーシスが誘導されている細胞が有意に増加していることが確認された。

p53はゲノムの安定性に関わる2つの重要な働きをもっている。一つはDNA損傷が生じたときそれが修復されるまでその増殖を止めることであり、もう一つはDNAに修復不能な異常が生じたときにアポトーシスを誘導する働きである。さらに、DNAの修復そのものに係ることや分化の誘導にも関与することもわかってきた。そしてp53遺伝子異常の検出は、悪性腫瘍治療における新しい腫瘍マーカー、また予後推定因子としても注目されている。原発性肺癌においても小細胞肺癌の75～85%、非小細胞肺癌の45～50%でp53遺伝子異常があるとされ、本疾患の発病、そして治療におけるp53の役割について注目されている。本研究では、宿主細胞側p53を不活化させるE1B領域内の55kDa蛋白を産生する事が出来ない変異型アデノウイルスであるAxE1AdBを用いて、p53に異常をもった癌細胞に特異的な抗腫瘍効果が得られるかどうかを検討された。その結果、p53が正常に機能している小細胞肺癌では、明らかな細胞変性効果は認められず細胞は増殖する事

が確認された。これは、野生型p53をもつ細胞ではAxE1AdBの感染が起きてもp53依存性にウイルスの増殖を阻止した結果と考えられた。Tunel染色により、同ウイルスの感染によるアポトーシス陽性細胞が確認されることより、ウイルス感染細胞ではアポトーシスが誘導され、ウイルスの増殖を阻止しているのではないかと考えられた。一方、p53に変異を持つ肺癌細胞では強い細胞変性効果を認めた。これはAxE1AdBがp53変異のある細胞内で増殖し破壊しながら、次々と感染を繰り返した結果であると考えられた。p53の標的遺伝子としては、アポトーシスを誘導するIGF-1 inhibitorであるIGF-BP3、Bcl-2 family遺伝子の1つであるBAXやDNA修復標的遺伝子GADD45、また、細胞周期制御遺伝子であるp21、CyclinG1、その他現在約20個以上の遺伝子が同定されている。野生型P53を持つSBC3でのAxE1AdB感染によるBAXの上昇は、p53依存性にBAXを介する経路が主となりアポトーシスが誘導され、アデノウイルスの増殖を抑制していることが明らかにされた。本研究は、アデノウイルスが本来もつ宿主細胞に対するp53不活性化機能を人為的に欠失させたアデノウイルスを作成し、p53変異を有する肺癌細胞株に対する特異的な抗腫瘍効果を研究したものである。従来ほとんど行われなかった、この欠失アデノウイルスのp53変異癌細胞に対する特異的な細胞障害の機序がBAXを介したアポトーシス誘導の欠如であることを明らかにするという重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。