

平成20年 1月

# 前田昭宏 学位論文審査要旨

主 査 西 連 寺 剛  
副主査 林 眞 一  
同 佐 藤 建 三

## 主論文

Induction of efficient apoptosis and cell-cycle arrest in tumor cells  
by adenovirus-mediated *p53* A4 mutant

(アデノウイルスベクターを用いた*p53* A4変異体導入による癌細胞での効果的なアポトーシス及び細胞周期停止の誘導)

(著者：前田昭宏、中村誠一、磯野正人、尾崎充彦、井藤久雄、佐藤建三)

平成18年3月 Pathology International 56巻 126頁～134頁

# 学 位 論 文 要 旨

## Induction of efficient apoptosis and cell-cycle arrest in tumor cells by adenovirus-mediated *p53* A4 mutant

### (アデノウイルスベクターを用いた*p53* A4変異体導入による癌細胞での効果的なアポトーシス及び細胞周期停止の誘導)

*p53*遺伝子は、様々な癌において50%以上に変異が認められる重要な癌抑制遺伝子である。通常、*p53*タンパク質は潜在型を維持するタンパク質MDM2と結合し不活性型として存在する。この不活性型*p53*タンパク質はユビキチン化され、プロテアソーム系の分解を受けることで、*p53*タンパク質量が制御されている。これまでに、*p53*のC末端領域に変異を導入し、MDM2を介したプロテアソーム系の分解を受けにくく、野生型*p53* (*p53* wt) よりも安定な*p53* A4変異体 (*p53* A4) が作成されている。本研究では、*p53* A4をアデノウイルスベクターを介して各種の癌細胞株に導入し、細胞増殖抑制効果を野生型*p53*と比較検討した。

## 方 法

本研究には、*p53*のC末端領域に存在するの4つのリジンをアラニンに置換した*p53* AA変異体を用いた。組み換えアデノウイルスベクターを用いて、この*p53* A4を癌細胞株に導入し、その効果を検討した。癌細胞には、*p53*遺伝子による抑制に抵抗性があるヒト骨肉種細胞株(MG-63)、ヒト子宮頸癌細胞株(HeLa)、ヒト肝癌細胞株(HepG2)、ヒト胃癌細胞株(KATO III)、及びヒト骨肉種細胞株(Saos-2)を用いた。癌細胞の増殖抑制効果として、アデノウイルス感染後の時間経過的な細胞の生存率、DNAラダーの確認やカスパーゼ活性の測定によるアポトーシスの検出、及びFACS解析により細胞周期停止及び、低濃度のアデノウイルスベクターによる細胞増殖抑制効果について検討した。

## 結 果

MG-63細胞に*p53* A4を導入し、*p53* A4及び*p53* wt導入による、*p53*遺伝子が発現制御する遺伝子についての発現を比較したところ、*p53* A4での強い発現誘導は見られなかった。しかし、*p53* wtを導入した細胞に比べて強い増殖抑制が見られた。この増殖抑制について調べたところ、アポトーシスとG1細胞周期停止が誘導されていることがわかった。アポトーシスの指標の一つであるカスパーゼの活性を経時的に観察したところ、*p53* A4では*p53* wt

に比べて早い時間で上昇が見られた。また、p53 A4は低濃度のウイルス量 (MOI 10) でも強い増殖抑制能が見られた。MG-63以外の4つの癌細胞株においても、同様にp53 A4はp53 wtに比べて強い増殖抑制が見られ、細胞の内在性のp53タンパク質発現に関係なく機能していることが分かった。

## 考 察

これらの結果より、p53 A4はp53 wtに比べて強い癌細胞の増殖抑制効果を示し、アデノウイルスを用いた遺伝子治療において少ないウイルスでの治療効果が期待でき、従来のp53を用いた遺伝子治療よりも安全であることが示唆された。更にp53による遺伝子導入に耐性である癌細胞にも効果を示したことから、幅広い癌に適用できる可能性が期待される。

p53 A4導入により、カスパーゼ活性の上昇が早期に見られたことや、下流の遺伝子を強く誘導しないこと、そしてp53 A4タンパク質がp53 wtと異なり核のみならず、細胞質にも多く局在することから、p53 wtが誘導する経路とは異なった機構によってアポトーシスを誘導することが示唆される。この事実は、p53の誘導するアポトーシス経路における新しい知見の解明に繋がることが予想される。

## 結 論

癌抑制遺伝子p53の変異体であるp53 A4は、p53 wtに比べて少量のウイルスで強い癌の増殖抑制効果(アポトーシスや細胞周期停止)を示す。これにより、従来のアデノウイルスを用いた遺伝子治療よりも安全で効果的な治療法に繋がることが期待される。