

氏名	くら たて いたる 倉立 至
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙第213号
学位授与年月日	平成17年 1月 6日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Cell death induction of thymidine kinase gene transfer followed by ganciclovir treatment in oral squamous cell carcinoma cell lines (口腔扁平上皮癌細胞株におけるチミジンキナーゼ遺伝子導入後ガンシクロビル処理による細胞死誘導)
学位論文審査委員	(主査) 井藤久雄 (副査) 佐藤健三 領家 和男

### 学位論文の内容の要旨

口腔扁平上皮癌の治療は従来、手術、放射線療法、化学療法が単独あるいは組み合わせで行われてきた。広範進展例、再発・転移に対してはこれまでの治療ではその効果に限界があり、新たな治療展開が望まれる。

遺伝子治療の中でも薬剤代謝の酵素遺伝子を導入する自殺遺伝子治療は、遺伝子導入された癌細胞の直接的な殺細胞効果と同時に、その周囲の遺伝子導入されていない癌細胞も死ぬ隣接効果があり、これは他の遺伝子導入にない優れた特性のひとつである。ヘルペス単純ウイルス・チミジンキナーゼ(Herpes simplex virus thymidine kinase ;HSV-tk) 遺伝子導入細胞ではプロドラッグであるガンシクロビル(ganciclovir ;GCV)が特異的にリン酸化されて活性化型に変換してDNA合成を阻害することにより細胞死に導くことが示されているが、口腔扁平上皮癌での報告はない。

本研究では、組織学的分化度の異なる3種類のヒト口腔扁平上皮癌細胞株にHSV-tkを導入後、GCVによる処理を行ない、その抗腫瘍効果と細胞死との関連について検討した。

#### 方法

3種類のヒト口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-3、HSC-4、SCCKN)にアデノウイルス・ベクターを用いてHSV-tk 遺伝子を導入した。アデノウイルスの感染効率を種々の重複感染度(multiplicities of infection;MOI)での $\beta$ -gal 遺伝子導入後、X-gal 染色を行い、陽性細胞数を直接カウントして決定した。GCVに対する感受性試験をHSV-tkを遺伝子導入後、MTTアッセイを用いて行い、細胞死を励起する至適条件を決定した。至適条件下での細胞生物学的特性については、DNA断片化をTUNEL法およびDNAラダー形成を継時的に観察した。加えて、細胞周期動態および細胞膜変化をフローサイトメーター

で、アポトーシス関連蛋白である p53、p21、Bax、Bcl-2、カスパーゼ 3 の発現をウエスタンブロットで検討した。また、遺伝子導入 GCV 処理細胞の形態学的変化について電子顕微鏡レベルで観察した。

## 結 果

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株に対するアデノウイルスの 48 時間後における感染効率は、HSC-3、SCCKN は 50 MOI で 100%であったが、HSC-4 では 100 MOI でも約 45%で、細胞株により異なっていた。1.25 MOI の HSV-tk 遺伝子導入 GCV 1  $\mu$ g/ml 処理して 96 時間後の生細胞率は HSC-4 で約 50%、SCCKN で約 35%となった。HSC-3 では前記条件では生細胞率の低下はなかったが、10 MOI の遺伝子導入により生細胞率が約 40%となった。

HSV-tk/GCV 処理により、SCCKN のみ少数の TUNEL シグナル陽性細胞が散見された。すべての細胞株で DNA ラダーは確認できなかった。細胞周期解析において、G1 あるいは G2/M 停止は観察できなかった。アポトーシス関連蛋白の発現において、アポトーシス誘導に促進的な p53、p21、Bax 発現の変化あるいはカスパーゼ 3 の活性化はなかった。逆に、アポトーシス抑制性 Bcl-2 のわずかな発現上昇が HSC-3 および SCCKN において確認された。全ての細胞株においてアネキシン V 陽性/ヨウ化プロピジウム陰性細胞が種々の程度に観察された。

電子顕微鏡レベルでの観察では、HSV-tk/GCV 処理後、全ての細胞株において細胞、細胞内小器官の膨化および膜の破綻があった。アポトーシス小体は観察されず、形態学的にはネクローシスに一致するものと見なされた。

## 考 察

本研究では HSV-tk/GCV 処理によりヒト口腔扁平上皮癌培養細胞株において、高い細胞死誘導を示した。また、アデノウイルスを用いた HSV-tk/GCV 処理には閾値レベルが存在し、最大の細胞死誘導のためには、最適な MOI 数による HSV-tk 遺伝子導入の必要性が示唆された。

HSV-tk/GCV 細胞死誘導は、DNA の損傷によることが報告されており、DNA 修復に重要な役割を演じる p53 の関与が予想されたが、p53 依存性の細胞周期制御あるいはアポトーシス誘導は見いだされなかった。また、処理後に p53 蛋白の発現量に変化はなかった。文献的には野生型 p53 を遺伝子導入し HSV-tk と共発現させても、その関与する割合は細胞死全体からすれば低いことが示されている。HSV-tk/GCV 処理による細胞死誘導が p53 の積極的な関与を受けないことは、p53 遺伝子変異が高頻度である口腔扁平上皮癌における HSV-tk/GCV 処理が有望な治療手段になる可能性が示唆された。

文献的に HSV-tk/GCV 処理による細胞死については、アポトーシスの積極的な関与を示唆するものから、関与があってもその割合はごくわずかであるとするもの、関与を否定するものと、細胞株により様々である。今回の研究では、ヒト口腔扁平上皮癌において、アポトーシス誘導関連蛋白の活性化はみられなかった。細胞株によっては Bcl-2 のわずかな発現を示し、むしろアポトーシスに抵抗性を示すとも考えられた。電子顕微鏡レベルでの観察では、全ての細胞株において、形態学的にはネクローシスを呈していた。ヒト口腔扁平上皮癌においては、アポトーシスとは異なる細胞死メカニズムが重要な役割を演じていると考えられた。

## 結 論

口腔扁平上皮癌培養細胞株は、低い導入効率であってもHSV-tk遺伝子導入後のGCV処理に対し、高い感受性を示し壊死を生じた。また、その誘導細胞死の機序は p53 およびカスパーゼ非依存性の経路が重要視された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究ではヒト口腔扁平上皮癌細胞三株を用い、ヘルペス単純ウイルス・チミジンキナーゼ 遺伝子導入・ガンシクロビル処理後の効果を分子生物学的および形態学的に解析した。口腔扁平上皮癌培養細胞株は低い導入効率であっても遺伝子導入後のガンシクロビル処理に対し高い感受性を示し、組織分化度に関係なくアポトーシスではなく、ネクローシスが惹起された。細胞死誘発の機序は p53 遺伝子およびカスパーゼ非依存性の経路が重要であることを示した。本研究の結果は p53 遺伝子変異の頻度が高いヒト口腔扁平上皮癌に対する新規遺伝子治療の臨床応用に向けて重要な基礎的知見を提示しており、口腔外科学および分子病理学分野で明らかに学術の水準を高めたものと認められる。