

機関番号:11301

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2008~2010

課題番号:20590533

研究課題名(和文) 高活性化ヌクレオチド体による特異的細胞死誘導の分子機構の解明

研究課題名(英文) Clarify the molecular mechanisms of the induction of apoptosis by the highly active nucleosides

研究代表者 佐藤 岳哉(SATO TAKEYA)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号:10312696

研究成果の概要(和文):新規抗ガン遺伝子治療法(チミジル酸キナーゼ(tmpk)とアジドチミジン(AZT)を組み合わせる方法)の効果を検討した。特に高活性化ヌクレオチド体(tmpk遺伝子導入細胞内で産生)が遺伝子導入細胞の周囲にある非遺伝子導入細胞に転送され細胞死を誘導すること(Bystander効果)を検討した。その結果、本法はBystander効果を有し、この効果に細胞間接着装置が必須であることを明らかとした。本法は抗ガン遺伝子治療法として有効であると期待される。

研究成果の概要(英文):Bystander effect was observed in the non-gene modified cells adjacent to the gene modified cells expressing tmpk-variants treated with nontoxic dose of AZT against the normal cells. GJIC formed between these cells are crucial to exhibit the effect. These results suggest that our tmpk/AZT approach is feasible to use for the anti-cancer gene therapy.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:境界医学・応用薬理学

キーワード:遺伝子、癌、生体機能利用、トランスレーショナルリサーチ、薬剤反応性

1. 研究開始当初の背景

過去 20 年以上にわたって、がんは日本人の死亡原因の第 1 位を占め、現在では約 3 人に 1 人ががんで死亡するという状況である。世界的にみても、ごく最近の WHO の報告によると 2000 年のがん罹患患者は一千万人に及び、今後

更に増加することが指摘されており、「がんの克服を目指す研究」が、社会的要請の高い推進課題である。がんに対する研究の振興の結果、得られた知見を取り入れ、科学的基盤の研究に基づく新たな治療法の開発が現在積極的に行われている。その中でがんに対する有効な治療法

としての**自殺遺伝子治療法(細胞運命制御遺伝子治療法)**がある。プロドラッグを代謝する酵素の遺伝子を導入された細胞内において、プロドラッグは活性化体へと変換され、細胞の代謝過程の阻害により、細胞障害性を発揮する。その方法には種々あるが、最も多く検証が行われているのが、ヘルペスウィルス・チミジンキナーゼ(HSV-tk)とガンシクロビル(GCV)を組み合わせた方法である。腫瘍あるいは血液ガンなどに対する有効な治療法としてその効果が臨床において検討されている。しかしながら、HSV-tk の GCV 活性化効率などにまだ問題点も多く、実用化に対してはさらなる検討を要する。申請者は、上記とは異なる方法、すなわち、ヒト由来の酵素チミジル酸キナーゼ (tmpk)を用いた新規遺伝子治療法の開発に従事してきた。tmpk は、チミジン三リン酸の生合成に関与し、また抗 HIV 薬アジドチミジン(AZT)の活性化反応にも関与する。AZT 活性化過程において、tmpk が触媒する AZT-1 リン酸(AZT-MP)から AZT-2 リン酸(AZT-DP)への変換過程が AZT 活性化の律速段階である。野生型 tmpk は、AZT-MP の変換活性が不十分で、従来の細胞あるいは動物を用いる実験系においては、**AZT の活性化体 AZT-3 リン酸 AZT-TP がほとんど蓄積しないため、その細胞毒性について検討することができなかった**。我々の研究グループが AZT-MP を効率よく AZT-DP へと変換することのできる酵素活性を亢進させた変異型 tmpk を見だし、AZT-TP を効率的に産生する変異型 tmpk を分子化学治療法として用いることを試みた。この研究において、モデルとして用いたヒト T 細胞白血病細胞 Jurkat 細胞に変異型 tmpk 遺伝子を導入したものでは、活性亢進型ヒト tmpk により生じた高濃度の AZT-TP は、その細胞毒性が AZT の活性化中間体 AZT-MP よりも顕著であり、その細胞毒性は、ミトコンドリア機能障害を介するカスパーゼ活性化、アポトーシス

誘導による機序であることを示した。従来、AZT の毒性は、細胞内に蓄積するその代謝物のうち、AZT-MP が原因と考えられていた(Tornevik Y, et al. *Biochem. Pharmacol.* 49, 829-837 (1995))が、**今までに AZT-TP の蓄積が、細胞に対し毒性を発揮することについては、全く報告が無く、私たちの研究成果は新規自殺遺伝子治療法の可能性を示唆した(Sato T, et al. *Mol Ther* 15, 962-970 (2007))**。

2. 研究の目的

悪性腫瘍に対する**自殺遺伝子治療法**の適用において、**治療遺伝子は注射等の方法により、腫瘍組織へ直接導入**されるが、腫瘍組織全体に遺伝子導入を行うことは現実的に不可能である。**自殺遺伝子治療法**は、活性を持たないプロドラッグを用いるため、非遺伝子導入細胞では、その活性化体を生じないために、細胞死誘導効果は発揮されない。一方、遺伝子導入細胞においては、細胞内に入ったプロドラッグが活性化体へ変換・蓄積し、細胞死が誘導される。しかしながら、遺伝子導入細胞と隣接する非遺伝子導入細胞(Bystander または adjacent(隣接)細胞)において(1)両者間に細胞間接着装置(Gap Junction: GJ)を介した細胞間の連絡がある場合、あるいは(2)遺伝子導入細胞から薬物代謝酵素あるいは活性化代謝物が細胞外へ放出され、それを隣接細胞が取り込んだ場合に、隣接細胞においても活性化代謝物が蓄積し、細胞毒性を発揮するいわゆる“Bystander 効果”があることが知られている。一方、私たちの tmpk/AZT による**自殺遺伝子治療法**において、抗腫瘍治療法への応用もその視野に入っているが、Bystander 効果に関する詳細な検討は、未だ行われていない(予備検討の結果は、(1)を支持している)。そこで、**抗腫瘍治療法として、AZT-TP の細胞毒性を利用する tmpk/AZT の応用について自ら開発した本手法を用い、本申**

請においては、tmpk/AZT による分子化学療法における Bystander 効果の有無とその特異性について検証する。

3. 研究の方法

Bystander 効果の検討とその分子機構の解析

Tmpk 遺伝子あるいは緑色蛍光タンパク質遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターで実験に用いる細胞(ヒト前立腺がん由来 PC-3 細胞)に遺伝子導入する。EGFP 遺伝子導入した PC-3 細胞を隣接細胞として、tmpk 遺伝子導入した PC-3 細胞と適切な AZT 濃度存在下で共培養することで、得られる Bystander 効果が生じるのかどうかについて検討を行う。Bystander 効果が得られた場合、この効果が細胞間接着装置 (Gap Junction) を介して活性化代謝物が直接隣接細胞にトランスファーされるのか、それとも遺伝子導入細胞から一度細胞外に放出されて隣接細胞が取り込むのかについて、数種の実験系を用いて検討を行う。

4. 研究成果

遺伝子導入細胞内で発現した Tmpk により生ずる AZT 活性化体 AZT-3 リン酸は、がん細胞のモデル系として用いた PC-3 細胞培養系においてその細胞間に形成される細胞間接着装置を介して周辺の非遺伝子導入細胞へと輸送され、遺伝子導入細胞とともに非遺伝子導入細胞もアポトーシスが誘導される Bystander 効果が観察されることが明らかとなった。この結果は、本法が固形ガンに対する遺伝子治療法として有効であることを示唆するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- 1) Sato T, Ramsubir S, Higuchi K, Yanagisawa T, Medin JA. Vascular endothelial growth factor broadens lentivector distribution in the heart after neonatal injection. *J Cardiol* 54(2), 245-254 (2009). 査読あり
- 2) Higuchi K, Ayach B, Sato T, Chen M, Devine SP, Rasaiah VI, Dawood F, Yanagisawa T, Tei C, Takenaka T, Liu PP, Medin JA. Direct injection of kit ligand-2 lentivirus improves cardiac repair and rescues mice post-myocardial infarction. *Mol Ther*. 17(2), 262-268 (2009). 査読あり
- 3) Maeda K, Haraguchi M, Kuramasu A, Sato T, Ariake K, Sakagami H, Kondo H, Yanai K, Fukunaga K, Yanagisawa T, Sukegawa J. CLIC4 interacts with histamine H3 receptor and enhances the receptor cell surface expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 369(2): 603-608. (2008). 査読あり
- 4) Takemoto J, Masumiya H, Nunoki K, Sato T, Nakagawa H, Ikeda Y, Arai Y, Yanagisawa T. Potentiation of potassium currents by beta-adrenoceptor agonists in human urinary bladder smooth muscle cells: a possible electrical mechanism of relaxation. *Pharmacology*. 81(3): 251-258 (2008). 査読あり

[学会発表] (計 15 件)

- 1) 佐藤岳哉: 抗ガン治療法としての Tmpk/AZT 系における Bystander 効果発現の分子機構、第 61 回日本薬理学会北部会、2010 September 10、札幌
- 2) Takeya Sato: Mechanism of the

tmpk/AZT-system bystander effect; cell fate control gene therapy for anti-cancer treatment. 第 13 回アメリカ遺伝子細胞治療学会ジウム、2010 May19-22、ワシントン DC アメリカ

- 3) 佐藤岳哉: 新生マウスに対する VEGF 前投与は遺伝子治療効果を改善する。第 83 回日本薬理学会年会、2010 March 16-18、横浜
- 4) 佐藤岳哉: 新規遺伝子治療法 tmpk/AZT 系の抗ガン治療法としての有効性の検証 (In vivo Bystander 効果の確認)、第 60 回日本薬理学会北部会、2009 September 26、富山
- 5) Takeya Sato: Gap junction-mediated bystander killing highlights the utility of the TmpkF105Y/AZT system for cancer suicide gene therapy. 第 15 回日本遺伝子治療学会年会、2009 July 9~11、大阪

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 岳哉 (SATO TAKEYA)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号:10312696

(2)研究分担者

柳澤 輝行 (YANAGISAWA TERUYUKI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号:90133941

助川 淳 (SUKEGAWA JUN)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号:30187687

(3)連携研究者

()

研究者番号: