

機関番号：34521

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790152

研究課題名 (和文) 導入遺伝子の発現制御による抗癌剤の副作用軽減に関する研究

研究課題名 (英文) Study of side effect reduction of anticancer agents by regulation of exogenous gene expression

研究代表者

木下 淳 (KINOSHITA ATSUSHI)

姫路獨協大学・薬学部・講師

研究者番号：60454766

研究成果の概要 (和文)：遺伝子治療における遺伝子導入後の発現制御を目的として、CMV プロモーター駆動性遺伝子導入細胞へ抗悪性腫瘍薬を負荷した際の導入遺伝子発現量の変化について解析した。CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量は、doxorubicin (Dox) の負荷によって増加した。また、Dox と edaravone の併用によって、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量の増加が抑制された。さらに、Dox によって CMV プロモーター結合能を有する AP-1 のリン酸化経路が活性化されることを見出した。

研究成果の概要 (英文)：

For the purpose of regulation of transgene expression after gene introduction in gene therapy, the levels of CMV-promoter-driven transgene expression was analyzed when transgene introduced cells was exposed by anticancer agents. The levels of CMV-promoter-driven transgene expression were increased by doxorubicin (Dox) exposure. The induction of CMV-promoter-driven transgene expression by Dox was decreased by co-treatment of edaravone. We also found that phosphorylation pathway of AP-1 having CMV-promoter binding ability was activated by Dox.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：医療薬理学、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

ペプチドあるいは蛋白性薬物は、その分子量の大きさが体内への簡便な投与を困難にしていることに加えて、投与後きわめて速やかに分解あるいは排泄を受けるため生物学的半減期がきわめて短く、その薬効の持続化が困難であるというような薬剤学的な諸問題を多く抱えている。これらの解決策として、

遺伝子治療を応用した DDS が提案され、様々な疾患に対しての応用が検討されている。すなわち、遺伝子治療を薬剤学的観点より眺めると、ペプチドあるいは蛋白性薬物の新規薬物送達法としての概念を提示しており、作用持続化や標的部位へのターゲティングなど多くの可能性を秘めている。

しかしながら、これまでの遺伝子治療の課

題の一つとして、導入遺伝子の発現調節が挙げられている。すなわち、現段階では目的遺伝子を局所ならびに全身に送達することは可能であっても遺伝子導入後にその発現量を制御できず、治療の最適化を行うという段階までには至っていないのが現状である。

プラスミドベクターを用いた遺伝子治療の場合、導入遺伝子の発現量は、その上流に存在する種々ウイルスの long terminal repeat (LTR)により制御されており、種々転写因子がその重要な役割を果たしていると考えられている。一方、活性酸素発生系として汎用されているパラコート (PQ)により転写因子である activator protein 1 (AP-1)が誘導されることが報告されている。このことから、生体内で活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) を発生させる抗悪性腫瘍薬である doxorubicin (Dox) によっても AP-1 が同様に誘導されることが推測された。

AP-1 は c-Fos および c-Jun のヘテロダイマーあるいは c-Jun のホモダイマーが形成された後に、各種リン酸化酵素による活性化を受け、TPA response element (TRE) に結合し、下流遺伝子の発現を引き起こす転写制御因子である。真核細胞発現型プラスミドのプロモーターとして汎用されている cytomegalovirus LTR (CMV-LTR ; CMV プロモーター) は、その配列中に TRE を有することから、真核細胞へ導入後の遺伝子発現過程において、AP-1 の関与が強く推測される。

そこで研究代表者は、CMV プロモーター下流にレポーターとして GFP を有するベクターを導入した細胞を樹立し、この細胞に対して PQ および Dox を負荷した際のレポーター遺伝子の発現変化について検討した。その結果、PQ および Dox によって、AP-1 前初期遺伝子およびレポーター遺伝子の発現誘導が起こることが明らかとなった。以上の結果から、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量は、Dox の投与によって調節することが可能であることが示唆された。この現象を応用し、GFP 遺伝子を抗悪性腫瘍薬による副作用を軽減しうる遺伝子に置換すれば、抗悪性腫瘍薬の投与に伴って導入遺伝子が発現し、副作用を軽減するという新規の副作用防止策の構築へとつながるものと考えられた。

2. 研究の目的

研究代表者のこれまでの研究成果により、Dox によって CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量を制御できることが示唆されている。しかしながら、通常癌化学療法においては、多剤併用療法が一般的である。したがって、Dox 以外の抗悪性腫瘍薬が CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量に変動を及ぼすかどうか検討する必要がある。

また、Dox と PQ によって CMV プロモーター

駆動性遺伝子の発現が誘導されることから、両者から従属的に発生する ROS が CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御に深くかかわっていることが推察されるが、抗悪性腫瘍薬負荷による導入遺伝子の発現誘導と ROS との関連性をより詳細に検討するため、フリーラジカルスカベンジャーを共負荷した際の導入遺伝子発現量の変動について解析する。

さらに CMV プロモーターへの関与が考えられる AP-1 の活性化においては、前初期遺伝子の転写誘導のみならず、二量体形成後のリン酸化過程も寄与している。そこで、AP-1 活性化に係る酵素の一つである Jun N-terminal kinase (JNK) 活性が、抗悪性腫瘍薬の負荷により変動するか検討する。

3. 研究の方法

(1) 抗悪性腫瘍薬による CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量の変化

ラット皮膚由来線維芽細胞である FR 細胞に、CMV プロモーターおよびその下流に rsGFP 遺伝子をレポーターとして持つプラスミドベクターである pQBI25 を導入した FR-pQBI25 細胞の monoclonal を選別採取した。この FR-pQBI25 細胞を culture dish に播種、24 時間培養後に培地を置換し、Dox、5-fluorouracil (5-FU)、methotrexate (MTX) および paraquat (PQ) を添加した。この 48 時間後に細胞より全 RNA を抽出し、RT-PCR 法により rsGFP mRNA 発現量を測定した。さらに、蛍光光度法を用いて、rsGFP タンパクの発現量を測定した。

また、細胞種による差異を観察するために、ヒト肝がん由来細胞である HepG2 細胞に CMV プロモーターおよびその下流に EGFP 遺伝子をレポーターとして持つプラスミドベクターである pEGFP を導入した HepG2-pEGFP 細胞の monoclonal を選別採取し、Dox を負荷時における EGFP タンパクの発現量を測定した。

(2) 抗悪性腫瘍薬とフリーラジカルスカベンジャー併用時における CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量の変化

FR-pQBI25 細胞を culture dish に播種し、24 時間培養後に培地を置換し、フリーラジカルスカベンジャーとしての機能を有する N-acetyl cysteine あるいは edaravone (Eda) を添加して 2 時間プレインキュベーションした。その後、Dox、5-FU、MTX および PQ を添加した。この 48 時間後に細胞を回収し、細胞内 rsGFP mRNA 転写量および rsGFP タンパク量を測定した。

(3) 抗悪性腫瘍薬を負荷時における AP-1 リン酸化経路の変化

FR-pQBI25 細胞に、Dox、5-FU を単独ある

いは Eda と共に 30 分負荷した。また、遺伝子導入ヒト皮膚線維芽細胞 (NB1RGB-pEGFP 細胞) に Dox、5-FU を単独あるいは Eda と共に 30 分、6 時間および 24 時間負荷した。その後細胞ライセートを調製し、細胞内 c-Jun、Jun N-terminal kinase (JNK)、p38 MAPK (p38) 量とそのリン酸化タンパク量の変動について、Western blotting 法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 抗悪性腫瘍薬による CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量の変化

FR-pQBI25 細胞への Dox、5-FU および PQ 負荷によって CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量が有意に増加し、MTX では変化しなかった。また、HepG2-pEGFP 細胞への Dox 負荷によって EGFP タンパク量が有意に増加し、その誘導強度は FR-pQBI25 細胞における誘導強度とほぼ一致した。

以上の結果から、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量が特定の抗悪性腫瘍薬によって誘導されること、この誘導現象は細胞種にかかわらず観察されることが明らかとなった。

(2) 抗悪性腫瘍薬とフリーラジカルスカベンジャー併用時における CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量の変化

FR-pQBI25 細胞への Dox および PQ 負荷によって、rsGFP mRNA 転写量および rsGFP タンパク量が強く誘導され、フリーラジカルスカベンジャーの共負荷によってその一部が抑制された。また、FR-pQBI25 細胞への 5-FU 負荷によっても rsGFP mRNA 転写量が誘導されたが、フリーラジカルスカベンジャーの共負荷による誘導効果の抑制は見られなかった。さらに、MTX は、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量に変化をおよぼさなかった。以上の結果から、抗悪性腫瘍薬による CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御機構の一部に、抗悪性腫瘍薬から従属的に発生する活性酸素種が関与していることが示唆された。

(3) 抗悪性腫瘍薬を負荷時における AP-1 リン酸化経路の変化

FR-pQBI25 細胞では、Dox 負荷によって c-Jun 量およびリン酸化 c-Jun 量が増加し、Eda の共負荷によってその増加が抑制された。また、Dox および 5-FU 負荷によってリン酸化 JNK 量およびリン酸化 p38 量が増加し、Dox によるこれらの増加は、Eda の共負荷により一部抑制された。一方、NB1RGB-pEGFP 細胞では、Dox 負荷開始 30 分後および 6 時間後において、リン酸化 c-Jun 量が control と比べて増加し、Eda の共負荷により一部抑制された。また、リン酸化 JNK 量は、Dox および 5-FU 負荷によって増加する傾向が見られた。さらに、

リン酸化 p38 量は、Dox 負荷開始 6 時間後まで時間依存的に増加したが、負荷開始 24 時間後において control よりも低下したことから、p38 のリン酸化経路に何らかのフィードバック機構が存在していることが示唆された。以上の結果から、ROS 発生能を有する抗悪性腫瘍薬による CMV プロモーター制御下の遺伝子発現誘導には、AP-1 リン酸化過程が関与していることが示唆された。

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 2 件)

- ① A. Kinoshita, D. Kobayashi, Y. Saitoh, F. Komada, Effects of anticancer agents and scavengers for CMV-promoter-driven exogenous gene expression in genetically modified cells, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 査読有, Vol. 61, No. 4, 2009, 527-531
- ② A. Kinoshita, D. Kobayashi, Y. Hibino, T. Isago, K. Uchino, K. Yagi, M. Hirai, Y. Saitoh, F. Komada, Regulation of CMV promoter-driven exogenous gene expression with doxorubicin in genetically modified cells, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 査読有, Vol. 60, No. 12, 2008, 1659-1665

[学会発表] (計 3 件)

- ① 木下 淳、CMV プロモーター制御下の遺伝子発現におよぼす抗悪性腫瘍薬の効果と AP-1 リン酸化経路の解析、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28 日、岡山
- ② 木下 淳、抗悪性腫瘍薬による副作用の軽減を目的とした新規遺伝子治療の構築、電気学会 光・量子デバイス研究会、2009 年 5 月 8 日、神戸
- ③ 木下 淳、CMV プロモーター制御下の遺伝子発現におよぼす抗悪性腫瘍薬および scavenger の効果、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26 日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 淳 (KINOSHITA ATSUSHI)
姫路獨協大学・薬学部・講師
研究者番号：60454766