

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008 年度～2009 年度
 課題番号：20790501
 研究課題名（和文）miRNA による遺伝子発現抑制能を付加した p53 アデノウイルスによる癌治療の開発
 研究課題名（英文）Cancer therapy by the adenovirus expressing p53 and miRNA

研究代表者
 井戸川 雅史（IDOGAWA MASASHI）
 札幌医科大学・医学部・助教
 研究者番号：00404749

研究成果の概要（和文）：

p53 の異常は癌の約半数に認められるが、p53 導入のみではアポトーシスが誘導されない癌も多くある。そこで、アポトーシス阻害的標的遺伝子である p21 の発現を抑制する人工 miRNA と p53 を共発現する単一アデノウイルスベクターを作成した。このウイルスを癌細胞に感染させると、p53 単独の場合と比較して高い治療効果が認められた。以上の結果から、このベクターを用いることにより治療抵抗性の改善が期待される。

研究成果の概要（英文）：

We examined the therapeutic effectiveness of adenovirus (Ad-p53/miR-p21) that encoded co-cistronic p53 and artificial microRNAs (miRNAs) that targeted p21. Tumor volume was significantly decreased following the direct injection of Ad-p53/miR-p21 into the tumor, as compared to the injection of Ad-p53/miR-control. Our results suggest that adenovirus-mediated transduction of p53 and p21-specific miRNAs may be useful for gene therapy of human cancers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
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：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：遺伝子治療, p53, miRNA, p21, アデノウイルスベクター, 癌, アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

p53 は、細胞が障害を受けた際にアポトーシスにより細胞死を誘導する重要な因子であり、数多くの研究がなされている。p53 の欠失や変異はヒトに生ずるすべての癌の約半数に認められ、発癌を引き起こすのみならず化学療法や放射線治療に対する抵抗性にも関与することが報告されている。このため、これまでウイルスベクターを用いて癌に p53 を発現させる遺伝子治療が試みられてきた。ヒトの癌に対する治療としては、

1996 年にアメリカの M. D. アンダーソン癌センターのグループが肺非小細胞癌に対して p53 発現ウイルスを用いた治療を初めて行った。日本国内でも岡山大学が 1998 年に同様の治療を行っている。その後、国内外で臨床治験が開始され、アメリカでは頭頸部癌に対して第三相まで進化した。しかし p53 の導入のみでは細胞死が誘導されない治療抵抗性の癌も多くあることが報告されており、さらなる工夫が必要と考えられる。

2. 研究の目的

様々な癌において高頻度に p53 の異常が報告されており p53 の導入による遺伝子治療が有効であると考えられるが、必ずしも著効するとは限らず更なる工夫が必要である。p53 により発現誘導される標的遺伝子の中に、そのアポトーシス効果に対して阻害的に働くものがあることが知られている。そこで、そのようなアポトーシス阻害的な標的を特異的にノックダウンする人工 miRNA を設計し、p53 発現ウイルスベクターと同一のベクター内で発現させることで、p53 が発現した際のアポトーシス阻害的な標的の誘導を抑制し、細胞死の誘導を増強したい。これにより p53 による遺伝子治療効果の増強、耐性の解除が期待される。

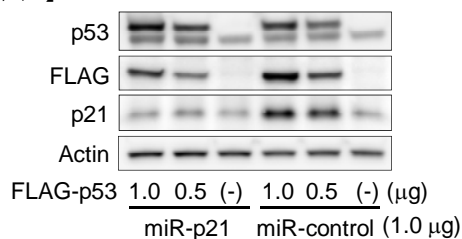
3. 研究の方法

まず、p53 のアポトーシス阻害的な標的遺伝子の発現を抑制する人工 miRNA 発現プラスミドベクターを作成する。次に p53 の翻訳領域をそのベクターに組み込むことで発現ベクターと抑制ベクターを統合する。このベクターでの p53 の発現および標的遺伝子の発現抑制を確認した後、シャトルベクターとの相同組換えを介して、アデノウイルスベクターを作成する。標的遺伝子の発現を抑制する miRNA 配列を持つ p53/miRNA 共発現アデノウイルスベクターを消化器癌細胞に感染させ、p53 単独の場合と比べ細胞死が増強されるかどうかを確認する。増強が認められた場合には、消化器癌細胞を移植したヌードマウスに対してアデノウイルスベクターを投与し、*in vivo* での腫瘍縮小効果について検討する。

4. 研究成果

p21 を特異的に発現抑制する人工 miRNA を設計し、発現プラスミドベクターに組み込んだ。このベクターを p53 発現ベクターと共に HEK293 細胞にトランスフェクションしたところ、p53 が強発現しているにもかかわらず p21 の蛋白発現誘導の抑制が認められた。(図1)

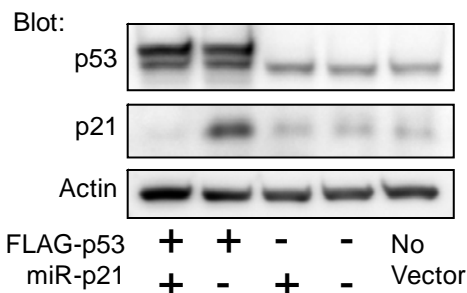
【図1】



次に、p53 発現ベクターと p21 抑制 miRNA 発現ベクターをひとつにハイブリッドしたベクターを作成した。この単一ベクターを HEK293 細胞や大腸癌細胞にトランスフェクションしたところ、p53 は強発現する一方、p21 の発現誘導は抑制された。(図2)

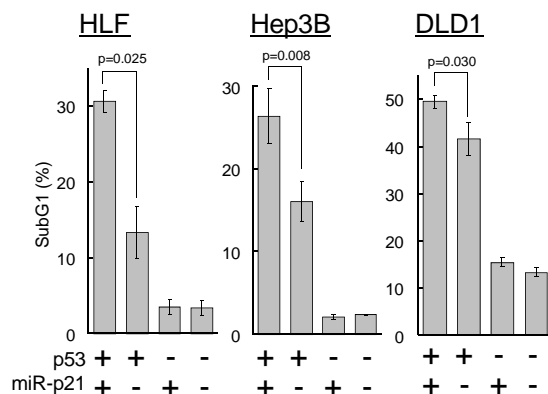
【図2】

HEK293



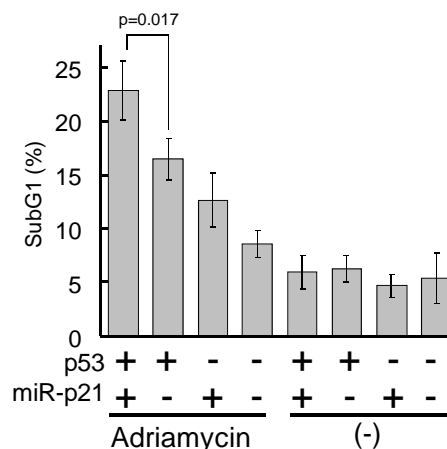
更に、このプラスミドベクターを元にアデノウイルスベクターを作成した。p53 と p21 抑制 miRNA の共発現アデノウイルスベクターを大腸癌細胞 DLD1 および肝癌細胞 HLF、Hep3B に感染させ、フローサイトメリーにて DNA 量を測定したところ、p53 単独発現のベクターと比較して有意にアポトーシスを示す subG1 の増加を認めた。(図3)

【図3】



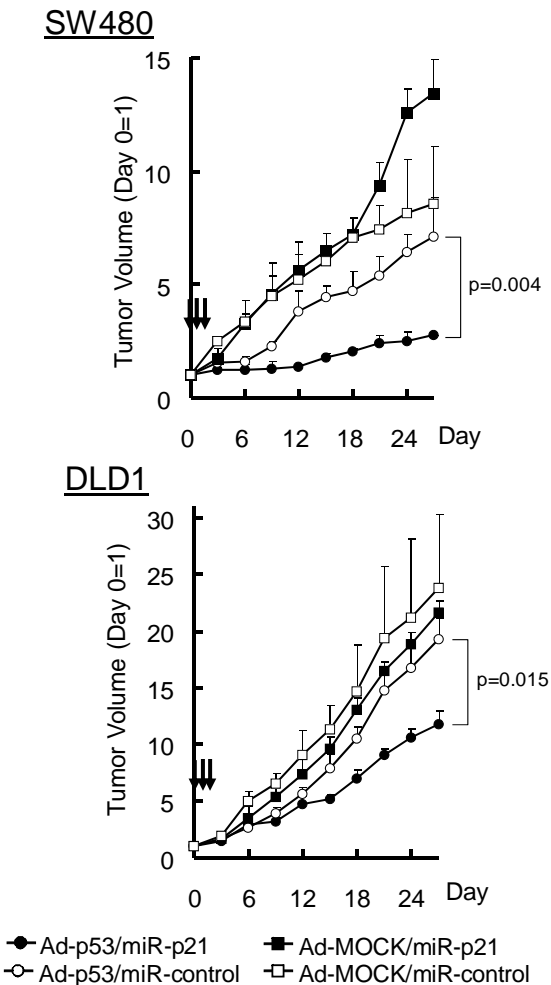
また、大腸癌細胞 SW480 では、アドリアマイシンを併用することにより、p53 単独と比較して p53/p21 抑制 miRNA 共発現ベクターで強くアポトーシスが誘導された。(図4)

【図4】



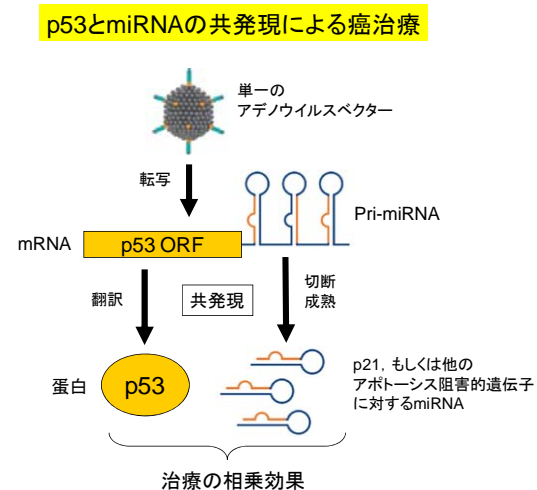
ヌードマウスに対して、大腸癌細胞DLD1およびSW480を皮下に接種し腫瘍を形成させた。腫瘍の大きさが決められたサイズに達したところで、高濃度に濃縮したアデノウイルスベクターを腫瘍に対して1日1回、3日間注入し、その腫瘍サイズの変化を経時的に測定したところ、p53単独と比較して、p21抑制miRNA/p53共発現ベクターで有意に腫瘍増殖の抑制効果を認めた。また、DLD1細胞においてp21抑制miRNAのみの投与は、腫瘍の増大を招いたことから、p53との共発現が必須であると考えられた。(図5)

【図5】



本研究で我々はp21抑制miRNA/p53共発現ベクターを用いることで、有効な治療効果を得ることに成功した。miRNA発現ベクターは、他のmiRNAをタンデムに接続することで複数の標的遺伝子の発現を抑制することが可能である。このため、他のアポトーシス阻害的な遺伝子に対するmiRNAを設計し、複数を組み合わせることで相乗効果を得ることができる。これにより、更なる治療効果の増強、治療耐性の解除が期待される。(図6)

【図6】



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5件)

1. A single recombinant adenovirus expressing p53 and p21-targeting artificial microRNAs efficiently induces apoptosis in human cancer cells.
Idogawa M, Sasaki Y, Suzuki H, Mita H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T.
Clinical Cancer Research 2009 15(11):3725-32. 査読有
2. CHFR, a potential tumor suppressor, downregulates interleukin-8 through the inhibition of NF-kappaB.
Kashima L, Toyota M, Mita H, Suzuki H, Idogawa M, Ogi K, Sasaki Y, Tokino T. 査読有
Oncogene 2009 28(29):2643-53.
3. p53 family members regulate the expression of the apolipoprotein D gene.
Sasaki Y, Negishi H, Koyama R, Anbo N, Ohori K, Idogawa M, Mita H, Toyota M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T.
Journal of Biological Chemistry 2009 284(2):872-83. 査読有
4. A novel method, digital genome scanning detects KRAS gene amplification in gastric cancers: involvement of overexpressed wild-type KRAS in downstream signaling and cancer cell growth.
Mita H, Toyota M, Aoki F, Akashi H, Maruyama R, Sasaki Y, Suzuki H, Idogawa M, Kahima R, Yanagihara K, Fujita M, Hosokawa M, Kusano M, Sabau SV, Tatsumi H, Imai K,

- Shinomura Y, Tokino T.
BMC Cancer 2009 9:198. 査読有
5. Histone deacetylase inhibitor FK228 enhances adenovirus-mediated p53 family gene therapy in cancer models. Sasaki Y, Negishi H, **Idogawa M**, Suzuki H, Mita H, Toyota M, Shinomura Y, Imai K, Tokino T. **Molecular Cancer Therapeutics** 2008 7(4):779-87. 査読有

〔学会発表〕（計 6 件）

1. 井戸川 雅史, 佐々木 泰史, 篠村 恭久, 今井 浩三, 時野 隆至
アデノウイルスを用いた p53 蛋白と p21 発現抑制人工 miRNA の共発現による癌治療効果の改善
第 68 回日本癌学会学術総会
2009 年 10 月 3 日, 横浜.
2. 井戸川 雅史, 佐々木 泰史, 篠村 恭久, 今井 浩三, 時野 隆至
miRNA による p21 発現誘導抑制能を付加した p53 発現ベクターによる癌治療効果の増強 第 25 回日本 DDS 学会
2009 年 7 月 3 日, 東京.
3. **Idogawa M**, Sasaki Y, Imai K, Shinomura Y, Tokino T.
A single recombinant adenovirus expressing p53 and p21-targeting artificial microRNAs efficiently induces apoptosis in human cancer cells.
American Association of Cancer Research (AACR) annual meeting. 21/Apr/2009, Denver.
4. 井戸川雅史, 佐々木泰史, 今井浩三, 篠村恭久, 時野隆至
miRNA による p21 誘導抑制能をもつ p53 発現アデノウイルスベクターによる抗腫瘍効果の増強
第 67 回日本癌学会学術総会.
2008 年 10 月 28 日. 名古屋.
5. **Idogawa M**, Sasaki Y, Imai K, Shinomura Y, Tokino T.
p53 expression with p21 suppression by single vector enhances antitumor effect.
The 36th Congress of the International Society of Oncology & BioMarkers (ISOBM). 8/Oct/2008, Tokyo.
6. **Idogawa M**, Sasaki Y, Imai K, Shinomura Y, Tokino T.
Enhancement of antitumor effect by adenovirus-mediated p53 expression with p21 suppression by miRNA.
American Association of Cancer Research (AACR) annual meeting. 13/Apr/2008, San Diego.

〔図書〕（計 1 件）

井戸川雅史, 時野隆至, 篠村恭久, 今井浩三.
消化器系疾患の遺伝子学—消化器癌における miRNA 異常—
最新医学 第 63 卷 9 月増刊号 1849-1859, 2008.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：APOPTOSIS INDUCER

発明者： **Idogawa M**, Sasaki Y, Tokino T

権利者：同上

種類：PCT

番号：PCT/JP2009/001701

出願年月日：2009 年 4 月 13 日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1)研究代表者

井戸川 雅史 (IDOGAWA MASASHI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号:00404749