

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790654

研究課題名（和文）

p53/miRNA 共発現ベクターによるアポトーシスと RNA 干渉を用いた複合癌治療

研究課題名（英文）

Cancer therapy by vector co-expressing p53 and miRNA with RNA interference

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）：

すべての癌の約半数で p53 の異常が報告されており p53 の導入が有効な癌治療と考えられるが、必ずしも著効するとは限らず更なる工夫が必要である。そこで我々は人工 miRNA による MDM2 発現抑制ベクターを設計し、これを p21 発現抑制 miRNA/p53 発現ベクターと併用することによりアポトーシスが增強されるかを確認した。その結果、この併用が有意にアポトーシスを增強することが判明し、治療への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：

We constructed adenovirus vector which express artificial miRNA targeting MDM2. Infection with this vector and vector which co-express p53 and artificial miRNA targeting p21 enhanced apoptosis more efficiently in cancer cells. This result suggests that adenovirus-mediated transduction of p53 and miRNAs targeting anti-apoptotic p53 target genes is useful for therapy of human cancers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：p53, miRNA, MDM2, 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。

我々のグループではこれまでに、p53 導入に対して抵抗性の癌細胞に対して特定の p63, p73 アイソフォームを導入することで強く腫瘍増殖が抑制され、化学療法剤に対する感受性が改善することを示した。更に、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるFK228を併用することによって、p53 ファミリーの導入による治療効果が増強されることを明らかにしている。

以上のように、我々のグループは p53 ファミリーの選択や薬剤併用によって、その抗腫瘍効果を高めることに成功しているが、更に効果を高めるためには、別の観点からウイルスベクターの改良を進める必要があった。そこで、p53 標的遺伝子の中にアポトーシスに対して阻害的に働くものがあることに着目し、p53 の発現と同時に、そのような標的遺伝子の発現誘導を抑制するようなウイルスベクターを作成することができれば、抗腫瘍効果を高めることができるのではないかと考えた。

我々はこれまでに、p53 の標的遺伝子でアポトーシス阻害的に働くものとして p21 を選択し、p21 の発現を抑制する人工的 miRNA と p53 が共に発現する単一のアデノウイルスベクターを開発した。このベクターを癌細胞に感染させたところ、p53 単独の場合と比較して有意にアポトーシスが引き起こされた。また、マウスに対して癌細胞を接種した腫瘍モデルを用いて、形成した腫瘍に対してこのアデノウイルスベクターを投与したところ、p53 単独の場合と比較して p21 発現抑制 miRNA/p53 共発現ベクターにおいて強い治療効果が認められている。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、p21 発現抑制 miRNA/p53 共発現アデノウイルスベクターを開発することで癌治療効果を増強することに成功した。そこで、p21 以外の p53 標的遺伝子でアポトーシスに阻害的に働くものに対する人工 miRNA ベクターを設計・作成したい。次に、その中で有効に発現が抑制できたものについて、p53 と共発現するアデノウイルスベクターを作成し、消化器癌細胞において p53 単独の場合と比べて細胞死の誘導が増強できるかを明らかにしたい。

3. 研究の方法

p53 の標的遺伝子の中で、p53 をユビキチン化し分解して p53 機能を阻害する MDM2 を標的として選択し、この mRNA 配列を元にして、MDM2 発現を抑制できるような人工 miRNA の配列を設計する。次に、設計した配列に基づいて作成した DNA オリゴおよびネガティブコントロール配列を、miRNA 発現プラスミドベクターにライゲーションにより組み込む。

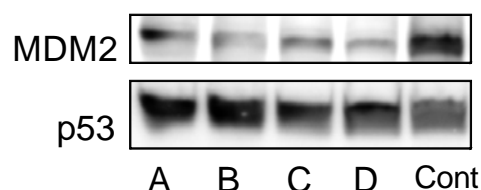
このプラスミドベクターとアデノウイルス骨格を含むシャトルベクターで相同組換えを行い、E1A を持つ 293 細胞にトランスフェクションすることで、アデノウイルス粒子を作成する。凍結融解による細胞破碎によりウイルス粒子を精製した後、希釈して 293 細胞に感染させることによりウイルス濃度を moi として測定する。

作成した MDM2 発現抑制アデノウイルスベクターを消化器癌細胞に感染させ発現抑制効果をウエスタンブロットで確認する。次に、このウイルスと 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アポトーシス誘導を Caspase-3 活性を用いて定量的に測定する。

4. 研究成果

MDM2 発現を抑制するような人工 miRNA を 4 種類 (A, B, C, D) 設計し、それらを発現するアデノウイルスベクターを作成した。このベクターを大腸癌細胞である HCT116 細胞に感染させアドリアマイシン刺激により p53 を活性化させ、24 時間後の MDM2 と p53 の蛋白発現をウエスタンブロットにて確認した (図 1)

【図 1】

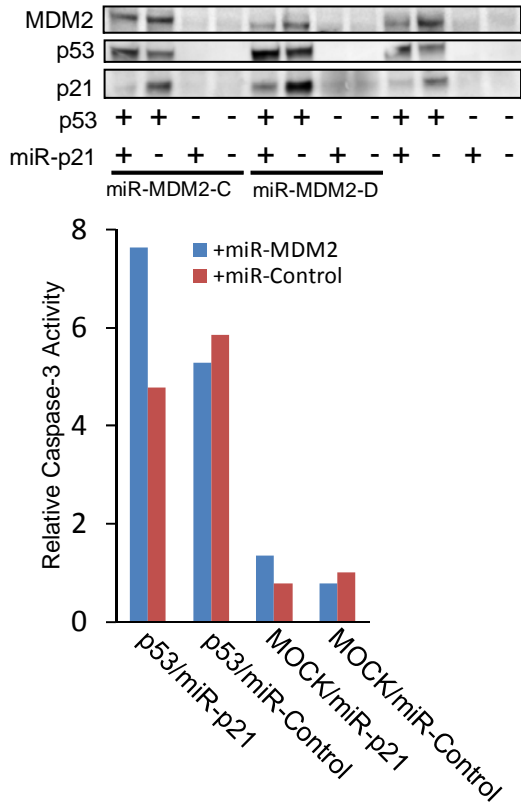


その結果、4 種類すべてのベクターにおいて、コントロール(Cont)と比較して MDM2 蛋白の減少を認め、それに伴い p53 の蛋白量が増加していた。これは、MDM2 の減少による p53 の分解が抑制された結果と考えられた。

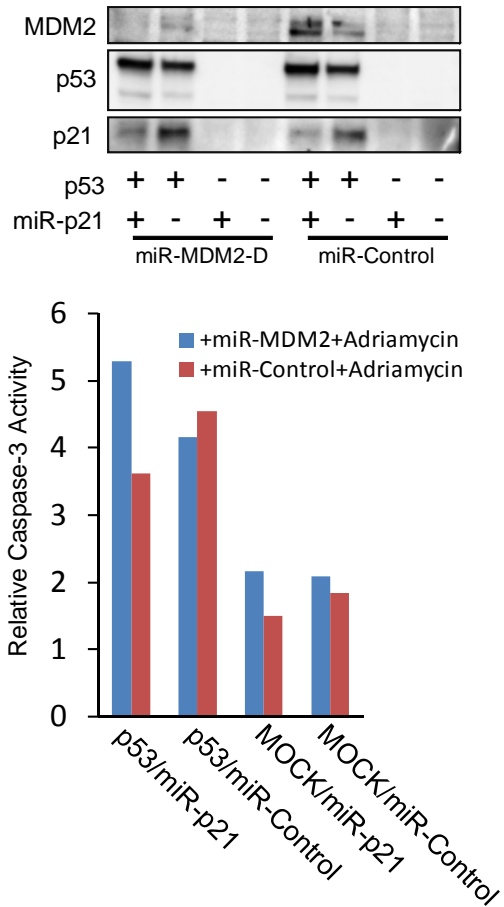
次に大腸癌細胞 DLD1 に対して、p21 発現抑制 miRNA/p53 共発現ベクターと MDM2 発現抑制ベクターのうち C と D を共に感染させ、蛋白発現とアポトーシス誘導を Caspase-3 活性により測定した (図 2)。

その結果、MDM2 発現抑制ベクター D(miR-MDM2-D)では、MDM2 の蛋白発現がコントロール(miR-Control)と比べ抑制され、また p53 の発現も上昇していた。しかし MDM2 発現抑制ベクター C (miR-MDM2-C) では、その効果は弱かった。miR-p21 による p21 発現抑制効果は同様に認められた。また、アポトーシスの指標となる Caspase-3 の活性を見ると、miR-MDM2 の発現により p53 によるアポトーシス誘導が増強していることが示された。

【図 2】



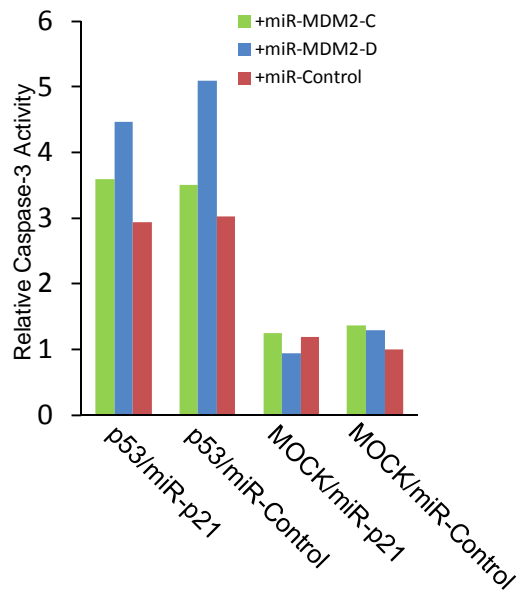
【図 3】



そこで、我々は miR-MDM2-D を用いて、肝癌細胞 Hep3B における蛋白発現と Caspase-3 活性を測定した (図 3)。その結果、Hep3B 細胞においても miR-MDM2 による蛋白発現抑制が認められた。また MDM2 発現抑制により、p53 単独発現ベクター (p53/miR-Control) との組み合わせでは Caspase-3 活性に変化がなかったが、p21 発現抑制を伴った場合 (p53/miR-p21) では、その活性の増強効果が認められた。

更に p53 導入によるアポトーシスに対して抵抗性である大腸癌細胞 SW480 において、アドリアマイシンを併用時のアポトーシス増強効果を同様に確認した。(図 4)

【図 4】



その結果、Hep3B 細胞と同様に、miR-MDM2 による MDM2 蛋白の発現抑制は、p53 単独発現 (p53/miR-Control) においては Caspase-3 活性に変化を引き起こさなかったのに対し、p21 発現抑制を伴った場合 (p53/miR-p21) には、その活性を増強した。

以上の結果から p53 導入による癌治療に際し、人工 miRNA による p21 の発現抑制に加えて MDM2 の発現抑制も併用することにより、治療効果を増強できると考えられる。

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 3 件)

1. Kashima L, Idogawa M, Mita H, Shitashige M, Yamada T, Ogi K, Suzuki H, Toyota M, Ariga H, Sasaki Y,

Tokino T.
CHFR regulates the mitotic checkpoint by targeting PARP-1 for ubiquitination and degradation.

Journal of Biological Chemistry 2012 in press 査読あり

DOI: 10.1074/jbc.M111.321828

2. Sasaki Y, Negishi H, Idogawa M, Yokota I, Koyama R, Kusano M, Suzuki H, Fujita M, Maruyama R, Toyota M, Saito T, Tokino T.

p53 negatively regulates the hepatoma growth factor HDGF.

Cancer Research 71(22):7038-47. 2011 査読あり

DOI:

10.1158/0008-5472.CAN-11-1053

3. Identification and characterization of early growth response 2, a zinc-finger transcription factor, as a p53-regulated proapoptotic gene.

Yokota I, Sasaki Y, Kashima L, Idogawa M, Tokino T.

International Journal of Oncology 2010 37(6):1407-16. 査読あり

DOI: 10.3892/ijo_00000792

[学会発表] (計4件)

1. Idogawa M, Sasaki Y, Kashima L, Shinomura Y, Imai K, Tokino T.
Apoptosis induction in cancer cells by the simultaneous transduction of p53 and artificial miRNAs based on the screening of genome-wide shRNA library.
American Association of Cancer Research (AACR) annual meeting. 2011/4/6, Orlando, FL.
2. 井戸川 雅史, 佐々木 泰史, 鹿島 理沙, 篠村 恭久, 今井 浩三, 時野 隆至
ゲノム網羅的 shRNA ライブラリースクリーニングに基づく人工 miRNA/p53 共発現による癌治療
第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3 日, 横浜.
3. Idogawa M, Sasaki Y, Kashima L, Shinomura Y, Imai K, Tokino T.
Single adenovirus-mediated simultaneous expression of p53 and the artificial microRNAs targeting anti-apoptotic p53 target genes.
American Association of Cancer Research (AACR) annual meeting. 2010/4/18, Washington D.C.
4. 井戸川 雅史, 佐々木 泰史, 鹿島 理沙,

篠村 恭久, 今井 浩三, 時野 隆至
p53 とアポトーシス阻害的標的に対する miRNA の単一アデノウイルス発現による癌治療

第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 23 日, 大阪.

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