

低酸素下で発現するリン酸化酵素を標的とする膀胱癌治療法

小林 正伸 [北海道大学大学遺伝子病制御研究所/助教授]

近藤 健 [北海道大学医学研究科/助手]

進藤 正信 [北海道大学歯学研究科/助教授]

忍 典昭 [オンコレックス株式会社/研究員]

背景・目的

申請者らは、癌組織での酸素分圧が正常組織の約5分の1程度であるために、低酸素環境に適応するためのHIF-1を中心とした応答機構が臨床癌の形成には必須であるとの仮説をたてた。この仮説に基づいて、低酸素環境下で新たに発現する遺伝子や発現亢進する遺伝子をDNAマイクロアレイという手法を用いて網羅的に検索した。その結果、アドレノメジュリンという血管新生因子やPim-1というセリン・スレオニンカイネースの発現が亢進することを見出した。本研究では、Pim-1というセリン・スレオニンカイネースの役割について検討した。

内容・方法

(1) ベクターの最適化

(A) 細胞内移行シグナルの最適化

タンパク質に8から11個のアルギニンを付加すると細胞内に入ることが知られている。細胞内に最も移行しやすい分子種を特定するために、アルギニン数を変えたりコンビナントdominant-negative変異体(4種類)をそれぞれ作製し、各癌細胞株の培養上清に添加、細胞内に取り込まれたdominant-negative変異体タンパク質の量をウエスタンブロッティングで比較する。

(B) プロモーターの最適化

(A)で選択した最適な細胞内移行シグナルのついたdominant-negative変異体ベクターのプロモーター領域を改良したベクター(CAGプロモーターの導入)を作成し、癌を接種したSCIDマウスに筋肉内投与し、その効果を比較する。

結果・成果

各癌種に対するdnPim1ベクターの最適化

Pim1は癌細胞の低酸素・低栄養に対する適応において重要な役割を果たしていることを示唆する知見を先に我々は得ている。それ故、Pim1の本作用をdnPim1の発現により阻止すれば、癌の増殖を抑制することが期待される。我々は、dnPim1による抗癌作用を発現するべく遺伝子治療の方法

論を採用し、新規の癌治療法の確立を目指している。本治療法の実用化にはdnPim1の抗癌作用を極大化するための遺伝子治療の最適化を行うことが求められる。このためにまず、我々はベクターの最適化を検討した。検討項目として、①dnPim1の細胞内移行の効率化のための細胞内移行シグナルの最適化、②dnPim1の細胞内発現の増強のためのプロモーターの最適化、③生体内発現効率化のためのセンダイウイルスベクターの使用、を取り上げた。

細胞内移行シグナルの最適化

細胞内移行の効率が最も高い分子種を特定するために、アルギニン数を変えたりコンビナントdominant negative変異体をそれぞれ作製し(8R、9R、10R、11R:dnPim1)、各癌細胞株の培養上清に24時間添加した(100nM)。培養上清中のdominant negative変異体(dnPim1)の量を抗Pim1抗体を用いたウエスタンブロッティングで比較した(図1、0hr:添加直後、24hrs:添加後24時間)。この結果、アルギニンが付加されていないdnPim1はタンパク量に変化は認められなかったが、4種類のアルギニン付加タンパク質で24時間後にタンパク量が減少していた。これはアルギニンの付加により細胞内に移行したためと推測された。この実験からは、アルギニンの数による差はほとんど見られず、ほぼ同等の取り込み率であると結論付けられた。またこれはHeLa(ヒト子宮頸癌細胞株)、PCI-43(ヒト膀胱癌細胞株)、293(ヒト胎児腎細胞/株)で同じであった。以上の結果並びに血中でのエキソペプチダーゼによる配列末端の分解を考慮し、アルギニン数は11細胞内取り込み後の11RTdnPim1の局在性および様態11R-dnPim1の細胞内への取り込みを免疫組織学的に検討した。11RTdnPim1にFJagタグを付加したりコンビナント11R:dnPim1-Flagを大腸菌で作製し、HeLa細胞に添加した(10nM、20時間)。抗Flag抗体を用いて免疫染色を行ったところ、11R依存的に細胞内に取り込まれていることが確認された(図2)。細胞内局在は一定せず、細胞質および核に分散していた。また、均一ではなく、粒子状に存在することから、細胞内で凝集体を形成する可能性も示唆された。

今後の展望

ベクターの最適化を目指してセンダイウイルスベクターの使用、プラスミドベクターに関してプロモーターの検討を行った結果、CMVに比較してCAGプロモーターが有意に発現量の増加させることを見出した。しかしながら、筋肉内投与にて筋肉内での発現を確認できるものの、血液中や腫瘍組織中での存在を確認することができなかった。また、センダイウイルスベクターでも同様の結果であった。確立したエライザシステムの感度の低さも一因と思われ、今後pharmacokineticsの検討などに必要な感度の良いシステムの確立が必要と思われる。