

【要約】

Combination of a third generation bisphosphonate and replication-competent adenoviruses produces synergistic cytotoxicity on mesothelioma

(ビスフォスフォネート製剤と増殖性アデノウイルスの併用による
胸膜中皮腫に対する抗腫瘍効果)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：田川 雅敏 教授)

江 媛媛

【目的】

悪性中皮腫は主に石綿暴露後に胸膜に発生する腫瘍で、特徴的な遺伝子異常を有している。それはがん抑制遺伝子である p53 が野生型であり、約 80%の症例で p14^{ARF} および 16^{INK4A} 遺伝子をコードする INK4A/ARF 領域が欠損していることである。したがって、当該腫瘍ではヒトにおける重要な 2 つのがん抑制経路が機能的に失活している。このことが抗がん剤耐性をはじめ、当該疾患が予後不良である一因となっていると推定される。

第三世代のビスフォスフォネート製剤である zoledronic acid(ZOL)は骨粗鬆症等で使用されているが、これまでの研究によって悪性中皮腫に細胞死を誘導することが知られている。一方、増殖性アデノウイルスもがん治療の新しい手法として注目されている。とりわけ、当該ウイルス E1B-55kD 遺伝子を欠損させた (Ad-delE1B55)は、感染細胞の p53 発現レベルを上昇させて悪性中皮腫細胞の細胞死を誘導することが、すでに知られている。そこで本研究では、ZOL と Ad-delE1B55 の併用によって、野生型 p53 遺伝子を有する悪性中皮腫において殺細胞効果が生じるかどうかを検討した。

【方法】

細胞傷害活性は WST 法によって、細胞増殖についてはトリパンブルーを使用した dye exclusion 法によって、また細胞周期は propidium iodide の核染色とセルソータを用いた解析によって実施した。各種蛋白質の発現レベルはウエスタンブロット法によって検討した。また、アデノウイルスの受容体発現、同ウイルスの感染性はセルソータのよって、またウイルス増殖能は tissue culture infection dose 法によって解析した。

【結果・考察】

ヒト悪性中皮腫 5 種類の細胞について、ZOL および Ad-delE1B55 の感受性

を検討すると、両者とも増殖抑制効果を有していた。そこで、両者を併用し CalcuSyn ソフトで検討してみると、抗腫瘍効果は相乗的であった。細胞周期を検討すると、単独使用より両者併用で S 期での細胞周期停止が見られ、また sub-G 分画の細胞も増加していた。一方、この併用効果の機構を検討すると、p53 分子のリン酸化に引き続いて、カスパー 3、8、9 および PARP の cleavage が生じていたが、オードファジー経路の活性化はなかった。また DNA 傷害である H2AX 分子のリン酸化が誘導されていた。したがって、これらの結果はウイルス増殖による DNA 傷害と、p53 経路の活性化によるアポトーシスによって相乗効果が惹起されたと判断された。また、ZOL 投与後のアデノウイルス受容体のなかで、CAR 分子、インテグリン $\alpha\beta 3$ 分子の発現は変わらなかったが、インテグリン $\alpha\beta 5$ 分子発現が上昇し、GFP 発現型アデノウイルスを用いた感染性も ZOL 処理によって増加した細胞があった。また、この感染性が増強した細胞では、ウイルスの増殖が増加していた。

ZOL 処理による p53 分子のリン酸化、Ad-delE1B55 による p53 経路の活性化がおこるが、上記のことから両者の併用によって同経路の活性化がさらに惹起されることが相乗効果の機序と考えられる。一方で、ZOL によって感染効率の上昇が観察されたが、この機構は明確ではない。また、悪性中皮腫では NF2 遺伝子の欠損の例が INK4A/ARF 領域の欠損に次いで高頻度であり、NF2 分子の欠損は低分子 G 蛋白質の活性化に関連している。ZOL は低分子 G 蛋白質の細胞膜移行を阻害して、細胞傷害活性を示すことから、ZOL と Ad-delE1B55 の併用は、p53 経路の活性化のみならず、NF2 分子欠損による異常経路を抑制する可能性があり、両者の併用は遺伝子変異を修正しうる当該疾患の治療戦略の妥当性を示すものである。

【結論】

ZOL と Ad-delE1B55 の併用は、p53 経路の活性化を誘導し相乗的な抗腫瘍効果を示した。この併用は特徴的な遺伝子変異を有している悪性中皮腫の治療に有用であると考えられる。