

理工学研究科

2017年3月

博士論文

がん細胞特異的傷害法における
がん細胞特異的な E2F 活性の有用性の検討

大谷 清 研究室
67014701 倉吉健太
(生命科学科専攻)

目次

| | ページ |
|---|-----|
| 第 1 章 要旨・序論 | |
| ・ 要旨 | 4 |
| ・ がん | 6 |
| ・ 現在のがん治療法と新たながん治療 | 7 |
| ・ がん抑制経路 RB と E2F | 11 |
| ・ がん細胞特異的な E2F 活性 | 19 |
| ・ E2F によるがん抑制遺伝子の発現制御機構 | 25 |
| ・ 研究目的・研究成果 | 27 |
| 第 2 章 実験材料・方法 | |
| ・ 細胞培養 | 32 |
| ・ プラスミド | 32 |
| ・ 組換えアデノウイルス | 37 |
| ・ レポーターアッセイ | 40 |
| ・ FACS による細胞傷害能の解析 | 41 |
| ・ qRT-PCR | 41 |
| ・ Western blot | 42 |
| ・ 抗体 | 43 |
| 第 3 章 実験結果 | |
| 第 1 節 がん細胞特異的な E2F 活性により活性化される ARF プロローターを用いた傷害法の有用性の検討 | 44 |

- ・ ARF プロモーターは E2F1 プロモーターよりがん細胞で特異的に活性を示す …… 44
- ・ Ad-ARF-TK は Ad-E2F1-TK よりがん細胞を特異的に傷害する …… 49
- ・ 考察 …… 53

第2節 がん細胞特異的な E2F 活性を活用した人工プロモーターを用いた傷害法の有用性の検討 …… 56

- ・ がん細胞特異的な E2F の反応性エレメントを利用することで、がん細胞でのみプロモーター活性を高めることができる …… 57
- ・ ERE73(1+2)_{x3}-ARF、ERE73(3+4)_{x5}-ARF(-13)は ARF, E2F1, hTERT プロモーターよりがん細胞で特異的に活性を示す …… 60
- ・ 人工プロモーターのがん細胞特異的な活性は、がん細胞特異的な E2F 活性に起因する …… 63
- ・ Ad-ERE73s-TK は、がん細胞を特異的に傷害する …… 69
- ・ 考察 …… 72

第3節 PI3K 経路が、がん性変化特異的な E2F 活性に及ぼす影響の解析…76

- ・ 増殖刺激によって活性化された PI3K 経路は、E2F1 過剰発現による *ARF*, *Bim* 遺伝子の発現誘導およびプロモーターの活性化を抑制しない …… 79
- ・ 恒常的活性型 Akt (gagPKB) は E2F1 過剰発現による *ARF*, *Bim* 遺伝子の発現誘導およびプロモーターの活性化を阻害しない …… 81
- ・ 考察 …… 84

| | |
|---|-----|
| 第4節 Cyclin/CDK 複合体が、がん細胞特異的な E2F 活性に及ぼす影響の解析 | 87 |
| ・ CDK インヒビター p21 ^{Cip1} の過剰発現はがん細胞で特異的な E2F の標的であるがん抑制遺伝子の発現をがん細胞でのみ亢進する | 91 |
| ・ p21 ^{Cip1} の過剰発現は、がん細胞に特異的に存在する内在性のがん細胞特異的な E2F 活性を増強する | 94 |
| ・ p21 ^{Cip1} の過剰発現は Ad-ARF-TK のがん細胞特異的傷害作用を増強する | 97 |
| ・ p21 ^{Cip1} の過剰発現は、がん細胞特異的な E2F の増強を介してアポトーシス誘導を行う | 99 |
| ・ 考察 | 103 |
| 第4章 総括 | 106 |
| 第5章 参考文献 | 108 |
| 第6章 研究成果 | 115 |
| 第7章 謝辞 | 117 |

第 1 章 要旨・序論

要旨

外科的治療適応外の進行がんに対する抗がん療法として、抗がん剤が主に利用されている。抗がん剤は増殖中の細胞を優先的に傷害する為、がん細胞だけでなく正常な増殖細胞も傷害し、副作用が生じる問題がある。この副作用があるため、がん細胞を死滅させるレベルでがん治療を行えず、多くの場合、抗がん剤ではがんを根治できない。そこで、がん細胞をより特異的に傷害する方法の開発が試みられている。

その 1 例として、がん細胞で特異的に転写活性を示すプロモーターで自殺遺伝子を発現制御する自殺遺伝子療法が注目されている。このアプローチで副作用を抑えつつ、高い治療効果得るためには、がん細胞で特異的な活性に注目し、それによりがん細胞で特異的に高い活性を示すプロモーターを用いることが重要である。先行研究より、がん抑制遺伝子 ARF、TAp73 を発現誘導する E2F 活性は正常細胞には存在せず、がん細胞に特異的に存在する可能性が示唆されている。そこで本研究では、がん細胞特異的な E2F の転写活性はがん細胞特異的傷害法に有用な活性であるのかを検討した。また、がん細胞特異的な E2F 活性を増強することで、その活性を活用したアプローチを改善できるのかも検討した。

まずは、がん細胞特異的な傷害法におけるがん細胞特異的な E2F 活性の有用性を検討した。その結果、がん細胞特異的な E2F により活性化される ARF プロモーターは、既存のがん細胞特異的なプロモーターである E2F1 プロモーターよりがん細胞で特異的に活性を示した。ARF プロモーターで自殺遺伝子を発現制御すると、E2F1 プロモーターの場合よりがん細胞を特異的に傷害した。また、がん細胞で特異的に活性を示さない ARF コアプロモーターに

TAp73 プロモーター由来の E2F 反応性エレメントを連結した人工プロモーターは、がん細胞特異的なプロモーターである ARF、E2F1、hTERT プロモーターよりがん細胞で特異的に活性を示した。さらに、その人工プロモーターで自殺遺伝子を発現制御すると、がん細胞を特異的に傷害した。これらのことから、がん細胞特異的な E2F の転写活性はがん細胞特異的傷害法に有用な活性であることが示唆された。そこで、がん細胞特異的な E2F 活性を増強し、その活性を活用したがん細胞特異的傷害法の改善策を探索した。その結果、PI3K 経路はがん細胞特異的な E2F 活性に影響を及ぼさなかった。一方、CDK インヒビターである p21^{Cip1} を過剰発現は、がん細胞特異的な E2F 活性を増強し、ARF プロモーターの傷害法を改善した。また、p21^{Cip1} を過剰発現することで、がん細胞特異的な E2F 活性の増強を介してがん細胞を特異的にアポトーシスに誘導することも明らかとなった。

以上のことから、がん細胞特異的な E2F 活性はがん細胞特異的傷害法に有用な活性であることが強く示唆された。

がん

私たちの体は、37兆個もの細胞から構成されている。老化した細胞は死ぬ一方で、細胞増殖によりその細胞を補うことで、細胞の数を一定に保ち、恒常性を維持している。その細胞増殖は厳密に制御されており、細胞は増殖刺激を受けた時に、必要な分だけ増殖する。しかし、細胞外からのストレスやDNA複製の過程で細胞増殖を制御する遺伝子に変異が加わると、細胞は増殖刺激に依存せず、無秩序に増殖することがある。通常、このような異常細胞はアポトーシスが誘導され排除されるが、アポトーシス誘導関連遺伝子に変異が加わると排除されず体内にとどまる。また、遺伝子変異により分裂寿命を規定するテロメア遺伝子の発現が亢進すると、その異常に増殖する細胞は分裂寿命を迎えることなく不死化し、体内に定着する。さらに遺伝子変異が蓄積すると、その細胞は体内のいたる臓器へ浸潤・転移し、体内中で無秩序に増殖する。このように、遺伝子変異の蓄積により、無秩序に増殖、浸潤・転移する細胞をがん細胞と言い、その細胞によって引き起こされる病気をがんという(1,2)。現在、毎年世界で7,600万人もの人々が、がんで死亡しているとされており、最も致死的な病気の1つである。日本においては、毎年35万人もの人々ががんで死亡し、3人に1人が、がんで死亡している。がんを引き起こすがん細胞は正常細胞とは異なり、①増殖刺激非依存的な細胞増殖と、②浸潤・転移を行ことが知られている。この2つの性質があるため、がん細胞は体内の様々な器官に浸潤・転移し、無秩序に増殖する。その結果、がん細胞は多臓器不全を誘導し、私たちに死に至らしめる。がんは2人に1人が罹患しており、罹患率の高い病気でもある。このようにがんは誰もが罹患し致死的な病気であるため、がんを完治する治療法の開発が必要とされている。

現在のがん治療と新たながん治療

がんの治療は局所療法と全身療法の2種類に分類される。局所療法とは、体の一部に存在する局所的ながんを死滅、除去する治療法であり、放射線療法と外科療法がこれに分類される。この局所療法は主に転移していない初期のがんに適用され、高い治療効果を示す。転移を起こしている場合は、局所療法によりすべてのがん細胞を除去することは不可能であるため、がんの完治は期待できない。一方、全身療法とは体全体に散在するがんをまとめて死滅させる治療法であり抗がん剤療法がこれに分類され、転移の有無に関わらず適用される。転移を起こしている際、がん完治を期待できる唯一の治療法は、現在のところ全身療法である抗がん剤療法だけである。抗がん剤療法によりがん細胞を死滅させることができなければ、そのがん患者はがん細胞による多臓器不全でなくなる。したがって、抗がん剤療法はがん患者の生存率を決定する重要な治療法であると考えられている。

がん細胞は増殖能が高く、DNA複製が活発に行われている。そこで、現在、抗がん療法はDNA複製を主な標的とし、DNA複製を阻害することで増殖能の高いがん細胞を優先的に傷害する(図 1-1)。しかし、生体内には造血幹細胞や腸管上皮細胞、毛根細胞などの増殖能が高い正常細胞も存在するため、これらのがん治療法は正常細胞も傷害し、副作用が生じる問題が存在する。特に白血球へ分化能を保持する造血幹細胞の傷害による副作用は重篤で、抗がん剤により造血幹細胞が高レベルで傷害されると、免疫不全状態となり日和見感染などの感染症で死に至る。現在のがん治療法はこのような副作用があるため、がん細胞すべてを死滅させるレベルで治療が行えず、がんを完治することができないことが多い。そこで、副作用を軽減した治療法を開発するために、がん細胞をより特異的に傷害する方法の開発が試みられている。

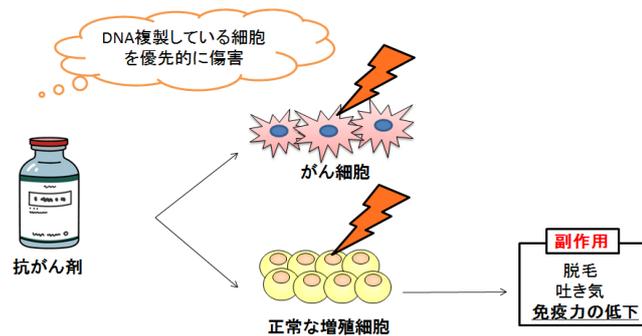


図 1-1. 現在の抗がん療法の問題点

抗がん剤はがん細胞だけでなく、正常細胞まで傷害する。

その一例として、免疫系を活性化し、がん免疫を高めるがん免疫療法が注目されている。このアプローチは、がん細胞が免疫系により認識・排除されることに基づいている。がん免疫療法は、非特異的に免疫系を活性化する非特異的免疫療法とがん細胞特異的な免疫系を活性化する特異的免疫療法の2つに分類される。非特異的免疫療法には、キノコなどの抽出物を投与して免疫を高める BRM 療法 (Biological Response Modifier therapy) やサイトカインにより免疫を高めるサイトカイン療法などがある。特異的免疫療法には、がん細胞が特異的に保持する抗原を用いてがん免疫を高めるペプチド療法がある。しかし、腫瘍を形成するがん細胞は免疫系の監視機構から逃れて生じた細胞であり、免疫系の監視から逃れる能力がある。そのため、これらのアプローチにより免疫を高めようとしても、癌細胞は免疫系により排除されず、このアプローチでは高い治療効果を示さないという問題点が存在する。近年、T 細胞は、PD-1 や CTLA-4 などの T 細胞上の受容体を介して活性が抑制される免疫チェックポイント機構を保持し、厳密にその活性が制御されていることが明らかとなった(3)。さらに、がん細胞はその受容体を介して T 細胞を抑制して免疫系の監視から回避しているが分かってきた(4)。そこで、新たながん免疫療法として PD-1 や CTLA-4 に対する抗

体を用いてがん細胞による T 細胞の抑制を阻害するアプローチ(それぞれ、オプジーボ、ヤーボイ)が注目されている。しかし、このアプローチでは免疫系の過剰亢進が起こり、間質性肺炎、大腸炎、肝機能障害などの重篤な副作用が生じる有害事象が確認されている。

その他のアプローチとして、がん細胞で特異的に転写活性を発揮するプロモーターで自殺遺伝子やウイルス複製に必要な遺伝子を発現制御する自殺遺伝子療法や腫瘍溶解性ウイルス療法が注目されている。自殺遺伝子療法では、がん細胞特異的なプロモーターに **Bax** や活性型 **caspase** など、発現に伴いアポトーシスを誘導する自殺遺伝子を連結し細胞に導入することで、自殺遺伝子のがん細胞で優先的に発現させ、がん細胞を優先的に傷害する (図 1-2) (5-8)。腫瘍溶解性ウイルス療法では、ウイルスゲノム上に存在するウイルス複製に必要な遺伝子 (例えばアデノウイルスの場合 **E1a** や **E1b** 遺伝子) のプロモーターをがん細胞特異的なプロモーターに置換した組換えウイルス用い、がん細胞で特異的にウイルス複製に必要な因子 (**E1a** と **E1b**) を発現させ、がん細胞で特異的にウイルスを複製させて細胞を溶解することにより、がん細胞を特異的に傷害する (図 1-2) (9-11)。この自殺遺伝子療法や腫瘍溶解性ウイルス療法の治療効果と副作用はがん細胞と正常細胞でのプロモーター活性に依存する。がん細胞でのプロモーター活性が高ければ高いほど治療効果が高く、正常細胞でのプロモーター活性が低ければ低いほど副作用が低くなる。従って、これらに利用するプロモーターは正常細胞では活性が低く、がん細胞で特異的に活性が高いプロモーターを用いることが重要である。また、腫瘍は均一ながん細胞の塊ではなく、遺伝子型、表現型が異なる多様ながん細胞の塊であり、一部のがん細胞でしか高い活性を示さないプロモーターを用いたアプローチでは、腫瘍内すべてのがん細胞を死滅させることができない。従って、腫瘍内のすべてのがん細胞を死滅させるため

にも、がんで普遍的な変異で活性化され、がん細胞で普遍的に高い活性を示すプロモーターを用いることも重要である。

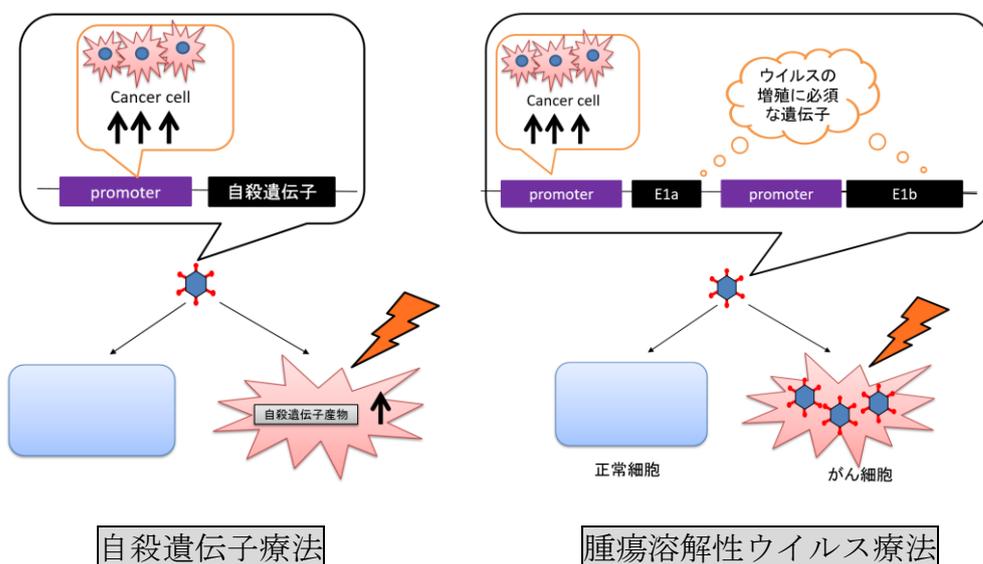


図 1-2. 自殺遺伝子療法と腫瘍溶解性ウイルス療法のがん細胞特異的傷害の作用機序

自殺遺伝子もしくはウイルス複製に必要な因子をがん細胞特異的なプロモーターで発現制御することで、がん細胞を特異的に傷害する。

がん細胞で特異的に活性を示すプロモーターとして、AFP プロモーター(12)、CEA プロモーター(13,14)、PSA プロモーター(11,15-17)がある。しかし、AFP、CEA、PSA は特定の臓器由来の一部のがん細胞でのみで高発現していることから、これらのプロモーターは特定のがんでのみ高い活性を示す (AFP：肝臓癌、CEA：膵臓癌・大腸がん、PSA：前立腺がん)。従って、これらのプロモーターを用いたアプローチでは一部のがん細胞しか傷害できない。その他のがん細胞特異的なプロモーターとして、hTERT プロモーターがある(11,18-22)。hTERT はテロメラーゼの構成因子であり、テロメラーゼ活性は主に hTERT の発現により制御されている。hTERT は正常細胞ではほとんど発現していない一方で、

がん細胞で特異的に高発現している。また、hTERT プロモーターはがん細胞で特異的に高く、がん細胞特異的アプローチに有用なプロモーターである考えられている。しかし、一部のがん細胞では、テロメアの伸長がテロメラーゼ非依存的に起こっており、そのようながん細胞では hTERT の発現を確認できない。そのようながん細胞では、hTERT プロモーターの活性は低いと考えられる。したがって、hTERT プロモーターを用いたアプローチではそのようながん細胞を傷害しにくいと予想される。このような、がん普遍的に高い活性を示さないプロモーターを用いたアプローチでは、1 腫瘍内のすべてのがん細胞をすべて死滅させることはできず、高い治療効果を示さないと予想される。さらに、正常な細胞の中にも、幹細胞など hTERT を発現している細胞があり、それらに対する副作用も考えられる。正常細胞に対する副作用を避けつつ、高いがん治療効果を得るためにも、がん細胞で普遍的にみられる変異に着目し、その変異によって活性化されるプロモーターを用いる必要がある。

がん抑制経路 RB と E2F

がん細胞で普遍的な変異として、代表的ながん抑制経路の一つである RB 経路の異常が注目されている(1,16,23)。RB 経路はがん抑制遺伝子産物 RB の活性制御系のことで、RB とその上流を RB 経路と呼ぶ (図 1-3)。

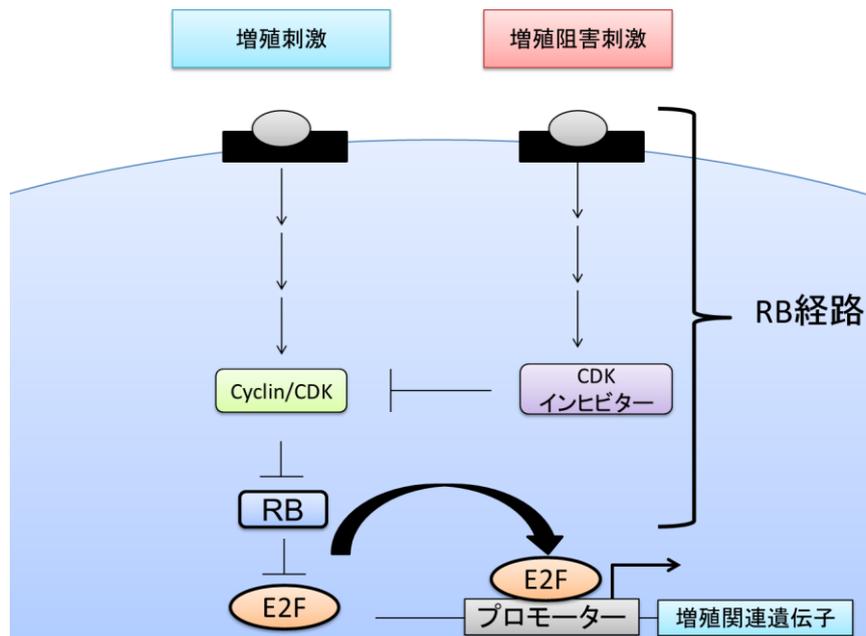


図 1-3. RB 経路

RB 経路は、RB、Cyclin/CDK 複合体、CDK インヒビターおよびその上流から構成される。

RB の上流には、Cyclin /CDK 複合体や CDK インヒビター、その上流の様々なシグナル伝達系などが含まれる。Cyclin /CDK 複合体は RB をリン酸化して、不活性化する。CDK インヒビターは Cyclin /CDK4 複合体の活性を抑制することで、間接的に RB を活性化する。Cyclin /CDK 複合体や CDK インヒビターの上流は、Cyclin や CDK インヒビターの発現や局在を制御することで、間接的に RB の活性を制御する。この RB 経路による RB の活性制御は、細胞増殖制御（細胞周期制御）において、中心的な役割を果たす。細胞が増殖するか否かは、G1 期から S 期へ進行するか否かで制御されている。増殖刺激非存在下では、Cyclin/CDK が活性化されておらず、RB は Cyclin/CDK によりリン酸化されず、活性型であり G1 から S 期への移行が起こらない。細胞に

増殖刺激を加えると Cyclin/CDK が活性化され、RB は Cyclin/CDK によるリン酸化によって不活性化され、細胞は G1 期から S 期へと移行する。さらに、G0 期の細胞で RB を強制的に不活性化すると、G0 期から G1 期、S 期へと移行する(17)一方で、増殖中の細胞で CDK により不活性化されない恒常的活性型の RB を発現すると、G1 期から S 期への移行が阻害され細胞増殖が抑制される(24)。このように、G1 期から S 期への移行は RB 経路の主要因子である RB によって厳密に制御されおり、RB 経路は RB の活性を厳密に制御することで細胞増殖を厳密に制御する。このように RB は細胞周期制御に重要な役割を果たすが、RB は主に転写因子 E2F と結合しその活性を抑制することで、細胞周期進行の制御を行う。

E2F はアデノウイルスの遺伝子産物 E1a による E2 遺伝子の発現誘導を仲介する因子として同定された転写因子で(25)、その後の研究により E2F は細胞増殖に必要な一連の遺伝子群を活性化する細胞増殖に重要な転写因子であることが明らかとなった(26)。E2F の標的遺伝子としては DNA ポリメラーゼ α (27)、MCM5,6 (7)、ORC1 (3)、CDC6 (23)、Cdt1 (28)、Cyclin E (29) など、DNA 複製に関わる連遺伝子が多数存在する。MCM (Minichromosome maintenance)は DNA ヘリカーゼとして働き、DNA 複製を促進する。ORC (origin recognition complex)は DNA 複製開始起点に結合し、CDC6 (cell division cycle 6)、Cdt1(chromatin licensing and DNA replication factor 1)を介して MCM を複製起点にリクルートすることで DNA 複製を促進する。また、CyclinE は CDK (Cyclin Dependent Kinase) と複合体を形成し、MCM をリン酸化することで活性化する。いずれの因子も DNA 複製に必須の因子である。また、DNA 複製に関わるその他の因子の多くは E2F 標的であるとされている。このことから、E2F はこれら DNA 複製に必要な遺伝子群を発現誘導

するため、E2FはS期進行において重要な転写因子であると考えられている。哺乳動物細胞ではE2Fとして8つのファミリーメンバー(E2F1~E2F8)が同定されており、E2F1-5が主に細胞周期進行に関与し、E2F6-8は発生に関与していると考えられている。また、E2F1、2、3のノックアウト細胞は細胞増殖できないことから、特にE2F1-3が細胞増殖に重要であると考えられている(30)。E2F1-5の活性は主に相互作用因子であるDPとRBによって制御されている(図1-4)。DPはE2F1-5とヘテロダイマーを形成して標的プロモーターへの親和性を高めることで、転写活性発揮に貢献する(26)。RBには3つのファミリーメンバー(pRB、p107、p130)が同定されており、pRBはE2F1、2、3a、3bと、p107、p130はE2F4、5と複合体を形成し、E2Fの転写活性を抑制する。このRBによるE2F活性の制御は正常細胞での適切な細胞周期制御において必須であり、RBとE2Fの活性は増殖刺激により厳密に制御されている。

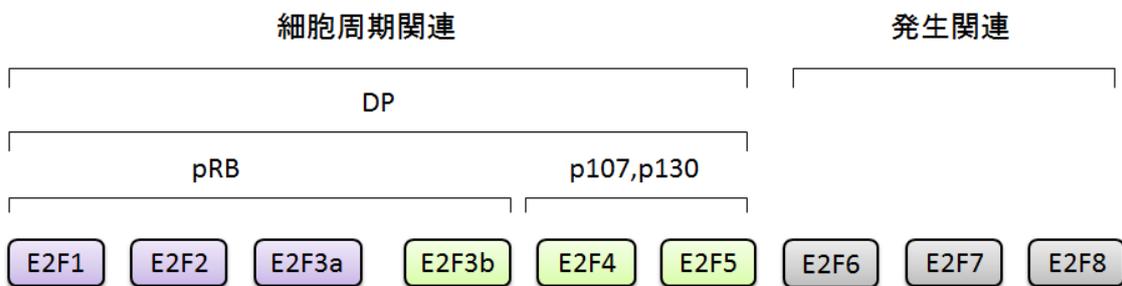


図1-4. E2Fファミリーメンバーの機能とその主要制御因子

E2F1-5は細胞周期進行に貢献し、E2F6-8は発生にかかわると考えられる。E2F1-5の活性は主にDPおよびRBにより制御されている。

増殖刺激非存在下において、Cyclin はほとんど発現していないため、Cyclin/CDK 複合体は活性化されておらず、RB は活性化状態にある。このとき、発現している E2F は主に E2F3b、4、5 であり、増殖関連遺伝子のプロモーター上で、pRB は E2F3b と、p107、p130 は E2F4、5 と複合体を形成することで、E2F 標的の発現を抑制し、G1 期から S 期への進行を抑制する (図 1-5)。RB は E2F の転写活性化領域をマスクすることで、その転写化能を抑制し E2F 標的の発現を抑制する。また、RB は E2F の転写活性を抑制するだけでなく、histone deacetylase (HDAC) や histone methyltransferase (HMT) などのヒストン修飾因子、Brahma などを含むクロマチン再構成複合体をプロモーター上にリクルートすることで、クロマチン構造を変換し、E2F 標的遺伝子の発現を積極的に抑制する。一方、細胞が増殖刺激を受けると、増殖シグナルが細胞内に伝わり、サイクリン D が発現誘導され、サイクリン D/CDK4 複合体が活性化される。するとサイクリン D/CDK4 複合体は p107、p130、pRB をリン酸化により不活性化し、RB は E2F および E2F 標的プロモーターから解離する (図 1-5)。これにより E2F は RB による抑制から解除されると同時にクロマチン構造が変換され、S 期進行に必要な DNA 複製などに関わる遺伝子群が発現誘導される。このとき発現誘導される遺伝子として、Cyclin E や E2F1、2、3a(21,31) も含まれる。E2F1、2、3a は E2F3b、4、5 より標的遺伝子の活性化能が高い。これら E2F は発現に伴い E2F4、5 と置き換わることで、さらに DNA 複製関連遺伝子群の発現を亢進させる (図 1-5)。また、Cyclin E は CDK2 と複合体を形成し pRB のさらなるリン酸化によりさらに不活性化し、E2F による DNA 複製関連遺伝子群の発現誘導をさらに促進する (図 1-5)。この DNA 複製関連遺伝子群の発現促進により、細胞は G1 期から S 期へと移行し、DNA 複製が開始する。S 期へ移行後は、自律的に次の G1 期まで細胞周期

は移行する。このように正常な細胞では、増殖刺激に応じて RB と E2F 活性を適切に制御することで、増殖刺激に応じた適切な細胞増殖が行われる。

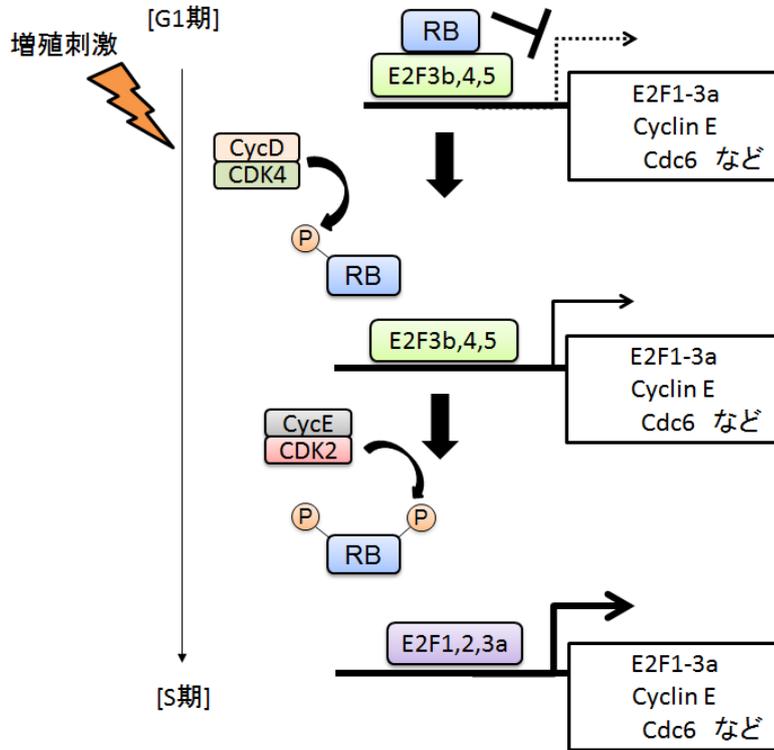


図 1-5. RB および E2F による細胞周期制御機構

増殖刺激による RB の不活性化および E2F1、2、3a の発現誘導により、E2F による DNA 複製関連遺伝子群の発現誘導が促進され、細胞は G1 期から S 期へと移行する

一方、無秩序に増殖するがん細胞は細胞周期制御機構が破綻しており、ほぼすべてのがん細胞において RB の活性を制御する RB 経路に異常があることが分かっている (図 1-6)。

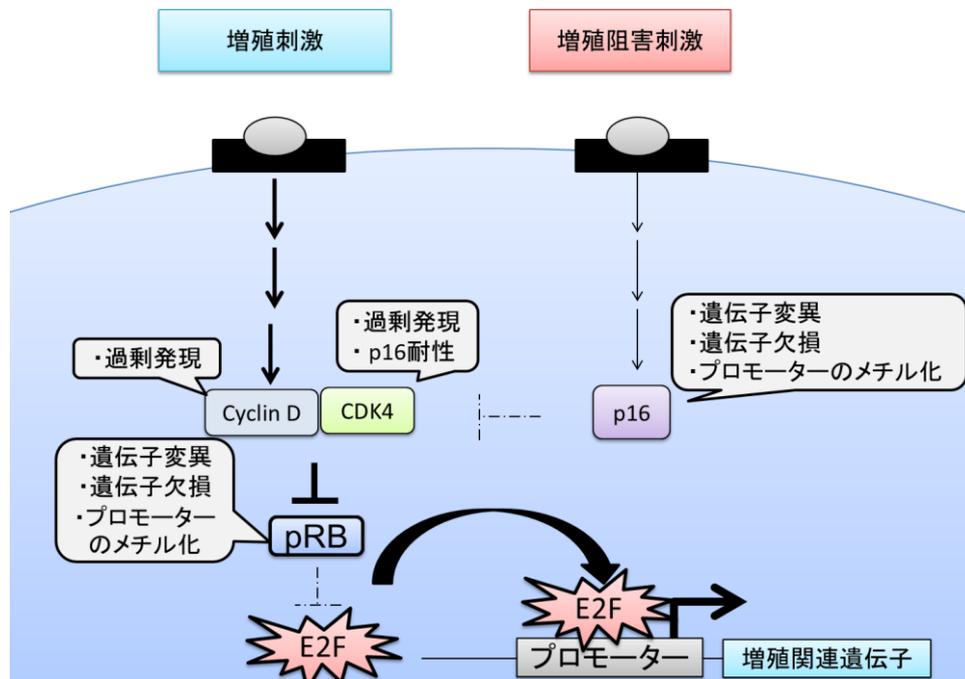


図 1-6. がん細胞で確認される RB 経路の異常

RB 経路の構成因子である CyclinD、CDK4、p16、pRB のいずれかは、がん細胞で発現および活性の異常が確認されている

サイクリン D は遺伝子増幅や上流の増殖シグナル伝達経路の異常による過剰発現(32,33)、CDK4 は遺伝子増幅による過剰発現や CDK インヒビターが作用できなくなる変異(34)、CDK インヒビターp16 は遺伝子変異や遺伝子欠損、エピジェネティックサイレンシングによるプロモーターの不活性化などが報告されている(35)。また、RB 自身も遺伝子変異、遺伝子欠損が確認されている

(36)。RB 経路の異常の結果、がん細胞では RB が恒常的に機能低下状態となり、恒常的に E2F 活性が亢進し、増殖刺激に依存しない無秩序な細胞増殖が起きている。このように、RB 経路の異常はがん細胞で普遍的であり、普遍的に E2F 活性が亢進されていると考えられている。そこで、E2F の標的である E2F1 のプロモーターはがん細胞で普遍的に高い活性を示し、がん細胞特異的傷害法に有用なプロモーターであると考えられた(10)。しかし、正常な増殖細胞においても、増殖刺激によって RB は不活性化され、E2F1 プロモーターは E2F によって活性化される。したがって、E2F1 プロモーターは正常細胞で高い活性を示すため、E2F1 プロモーターを用いたアプローチは正常な増殖細胞も傷害する可能性があるという問題点が存在する (図 1-7)。したがって、よりがん細胞を特異的に傷害するためには、「正常細胞には存在せず」、「がん細胞で特異的に存在する活性」を活用したプロモーターを用いることが重要である。

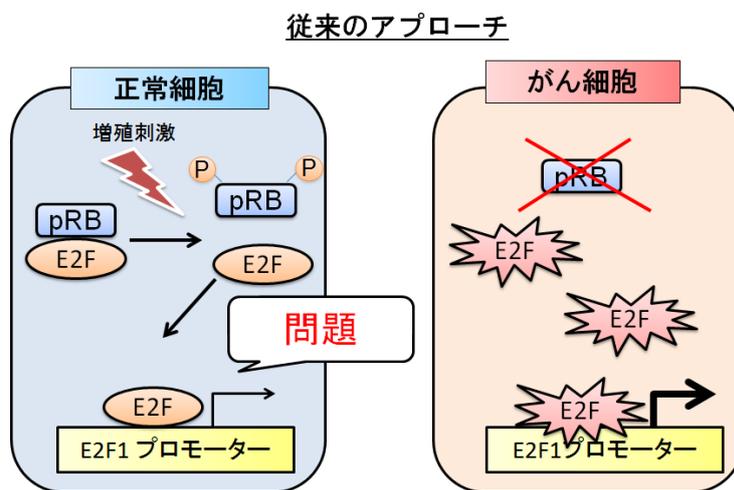


図 1-7. E2F1 プロモーターを用いたアプローチの問題点

E2F1 プロモーターは正常細胞で E2F によって活性化され高い活性を示すため、E2F1 プロモーターを用いたアプローチは正常な増殖細胞も傷害する可能性がある。

がん細胞特異的な E2F 活性

そのような活性の候補として、私たちは E2F によるがん化抑制遺伝子の活性化能に注目した。

前述したように E2F は細胞増殖において重要な役割を果たすが、細胞周期停止やアポトーシス関連遺伝子を発現誘導し、がん化抑制においても重要な役割を果たすことが近年明らかとなった。E2F1 のノックアウトマウスでは腫瘍が形成される(37)。また、E2F1、2、3a の過剰発現は、主要ながん抑制遺伝子である *ARF*、*Bim*、*TAp73* などを発現誘導し、細胞周期停止もしくはアポトーシスを誘導する(12,38,39)。ARF はユビキチンリガーゼである HDM2 を核小体に隔離することで、がん化抑制において主要な役割を果たす p53 のユビキチン化を阻害し、p53 を安定化し、細胞周期停止やアポトーシスを誘導に貢献する(40)。TAp73 は p53 ファミリーに属し、p53 の標的のがん抑制遺伝子を発現誘導し、アポトーシスを誘導する(41)。Bim はがん抑制遺伝子産物 Bax を活性化することで、ミトコンドリアからのシトクローム *c* の放出を促進する(42)。E2F によって誘導されるこれらのがん抑制遺伝子はいずれもアポトーシス誘導に重要であるとされている(42-47)。これらのことから、E2F はこれらのがん抑制遺伝子を発現誘導することで、細胞周期停止、アポトーシスを誘導し、がん化抑制に貢献すると考えられる。このように、E2F は増殖関連遺伝子を活性化し細胞増殖を促進する一方で、それとは正反対の作用をもつがん抑制遺伝子を活性化し、がん化抑制にも貢献する。現在、E2F による増殖関連遺伝子とがん化抑制遺伝子の活性化機構の違いは RB-E2F 分野での重要な課題であり世界中で様々な研究室で探索されているものの、その違いについてはいまだ分かっておらず、E2F による細胞増殖促進とがん化抑制の仕分け機構についてほとんどわかっていない。

私たちは、E2F が細胞増殖を誘導するのか、アポトーシスを誘導するのか否

かは E2F の活性化の仕方に依存することを明らかにした(48-51) (図 1-8)。通常、E2F は増殖刺激により CyclinD/CDK4 が活性化され RB がリン酸化により生理的に不活性化されることで活性化される。このように、E2F は生理的に活性化されると (以後、増殖刺激で活性化された E2F を「生理的に活性化された E2F」と称す)、増殖関連遺伝子のプロモーターに結合し、増殖関連遺伝子を発現誘導し、細胞増殖を促進する (図 1-8)。一方、E2F は増殖刺激だけでなく、アデノウイルスの遺伝子産物 E1a による RB と E2F の会合阻害や pRB のノックダウンなど、CyclinD/CDK4 活性に依存せず、pRB の強制的な不活性化により活性化することができる。このような CyclinD/CDK4 活性非依存的な E2F の活性化は pRB 自身に変異を保持するがん細胞で起きていると予想され、これら pRB の強制的な不活性化はがん化状態を模倣できていると予想される。E2F はこのようながん性変化により活性化されると (以後、RB の強制的な不活性化により活性化された E2F を「がん性変化で活性化された E2F」と称す)、増殖関連遺伝子だけでなく、主要ながん抑制遺伝子である *ARF*、*Bim*、*TAp73* のプロモーターに結合し、これらのがん抑制遺伝子を発現誘導し、アポトーシスを誘導する(48,51,52)。なお、生理的に活性化された E2F はこれらのがん抑制遺伝子のプロモーターに結合せず、これらのがん抑制遺伝子を発現誘導することはない(51,52)。このことから、E2F が細胞増殖を誘導するのかアポトーシスを誘導するのかは、E2F の活性化の仕方に依存し、がん性変化時特異的に E2F はがん抑制遺伝子のプロモーターに結合しがん抑制遺伝子を発現誘導することで、アポトーシスに誘導することが明らかとなった。この機構は、体内からがん化状態にある異常な細胞を排除するために存在すると考えられる。

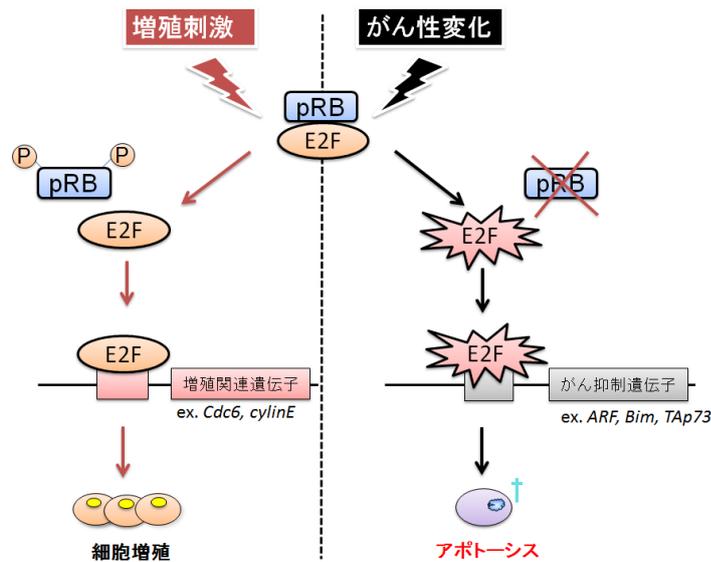


図 1-8. E2F は活性化の仕方に応じて、異なる標的遺伝子を活性化する

E2F はがん性変化時特異的にがん抑制遺伝子を活性化する。

このように、活性化の仕方により E2F は「活性」に違いが生じるが、「生化学的な質」や「結合配列」にも違いが生じることが示唆されている。生理的に活性化された E2F とがん性変化で活性化された E2F では、リン酸化部位が異なり、がん性変化で活性化された E2F の方が低リン酸化型であることが示唆されている。ARF プロモーター内のがん性変化で活性化された E2F の結合配列 (TGAGCCGCCCCGCGCGCGCCTCC) は、増殖関連遺伝子のプロモーター内の生理的な E2F の反応性配列 (TTTCGCGC) とは異なり、T の連続配列がない(48)。このことから、活性化の仕方により生化学的に違いが生じ、その違いが結合標的の違いを生じさせると考えられる。現在のところ、いかにしてそのような生化学的な違いが生じているかはわかっていない。ただ、Cyclin D/CDK4 非依存的に E2F1 を活性化すると、増殖刺激により Cyclin D/CDK4 依存的に E2F1 を活性化した場合とくらべ、低リン酸化型の E2F1 が生じることから、リン酸化の程度の違いは、Cyclin D/CDK4 によるリン酸化修飾の有無による可能性

が示唆されている。また、がん性変化時に E2F によって活性化される ARF プロモーターの E2F1 過剰発現による活性化は Cyclin D/CDK4 の過剰発現により減弱すること、一方で生理的に活性化された E2F により活性化される Cdc6 プロモーターの E2F1 過剰発現による活性化は Cyclin D/CDK4 の過剰発現により増強することから、増殖刺激で活性化される Cyclin D/CDK4 は、がん抑制遺伝子を活性化する E2F をリン酸化することで生理的な E2F に変換しているのかもしれない (図 1-9)。この機構があるため、増殖刺激により生理的に E2F を活性化しても、がん抑制遺伝子を活性化する E2F 活性が生じない可能性が考えられる。

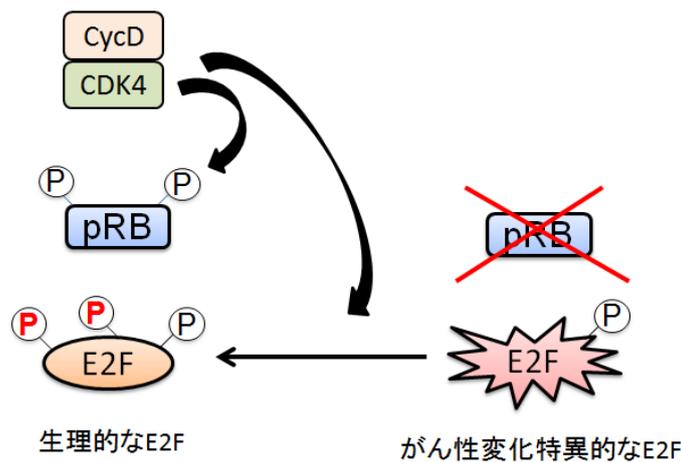


図 1-9. 生理的に活性化された E2F とがん性変化特異的な E2F の発生機構のモデル

がん性変化特異的な E2F は CyclinD/CDK4 によるリン酸化修飾を受けないと生じ、生理的な E2F は CyclinD/CDK4 が、がん性変化特異的な E2F をリン酸化することで生じる

がん抑制遺伝子を活性化する E2F 活性はがん性変化特異的に生じるので、その E2F 活性が、がん細胞に特異的に存在するのかを調べたところ、調べた限り

ARF プロモーターを活性化する E2F 活性は正常な増殖細胞には存在せず、がん細胞のみに存在することが明らかとなった(48)。このことから、ARF プロモーターは、E2F 1 プロモーターとは異なり、がん細胞でのみ E2F による活性化を受けており、真にがん細胞で特異的であり、自殺遺伝子療法、腫瘍溶解性ウイルス療法に有用なプロモーターである可能性が示唆された (図 1-10)。

今回のアプローチ

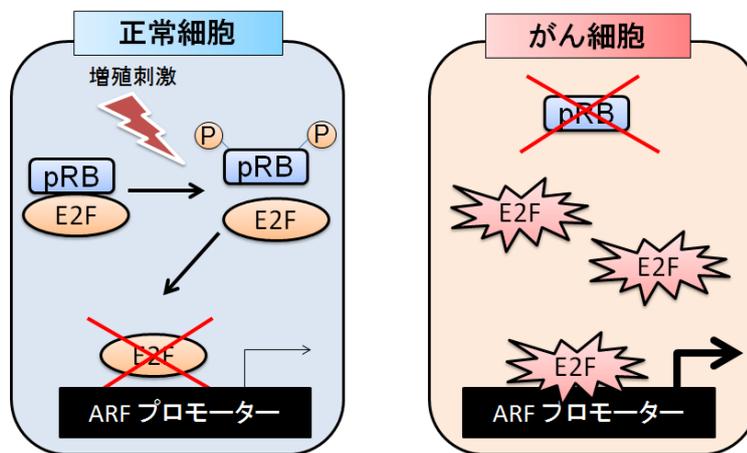


図 1-10. ARF プロモーターは、がん細胞でのみ E2F により活性化される
 ARF プロモーターは正常細胞では E2F による活性化を受けず、がん細胞でのみ E2F による活性化を受ける。

また、ARF の遺伝子座に GFP 遺伝子をノックインしたマウスの研究も、ARF プロモーターの有用性を支持している。このノックインマウスでは、全細胞の ARF プロモーターの活性は GFP の蛍光により定量できるが、このマウスから例え増殖中の組織であっても GFP の蛍光は観察できないことが報告されている(53)。さらに、ARF 遺伝子に GFP をノックインしたことに伴い発がん性が上昇するが、生じたがんで特異的に GFP の蛍光が検出される(53)。このノックインマウスの研究成果からも、ARF プロモーターはがん細胞で特異的に活性を示し、

自殺遺伝子療法、腫瘍溶解性ウイルス療法に有用なプロモーターであることが示唆されている。従って、ARFプロモーターを用いてがん細胞で特異的なE2F活性を活用することで正常な増殖細胞に対する影響を軽減し、既存のがん細胞特異的なプロモーターであるE2F1プロモーターよりがん細胞特異的にアプローチできることが期待される。

また、がん細胞特異的なE2F活性は、その標的プロモーターを用いるだけでなく、がん性変化特異的なE2Fの反応性エレメントを用いることでも活用できる。がん性変化特異的なE2Fの反応性配列として、TAp73プロモーター由来のERE73(1+2)、ERE73(3+4)が同定されており（E2F Responsive Element of TAp73）、それらはがん細胞で特異的にエンハンサーとして働く(51)。したがって、これらのエレメントを正常細胞での活性が低いプロモーターに連結すれば、正常細胞で活性が低く維持しつつ、がん細胞で特異的に高い活性を示すがん細胞特異的なプロモーターを作成できると予想される（図1-11）。

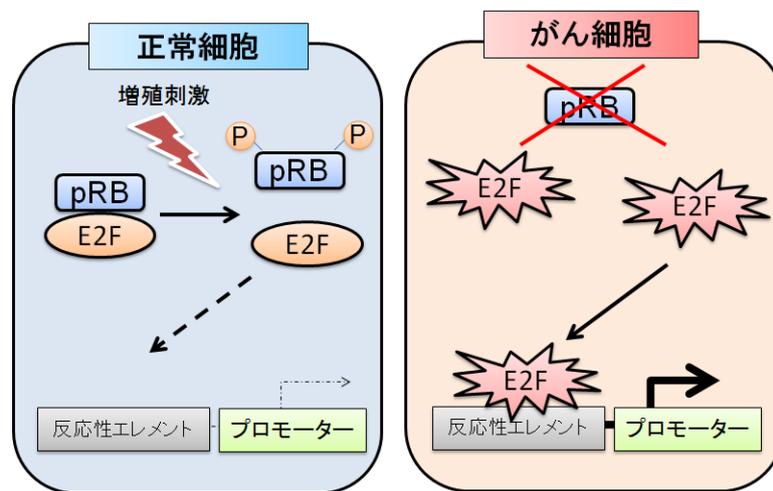


図 1-11. がん細胞特異的な人工プロモーター

がん細胞特異的なE2Fの反応性エレメントはがん細胞でのみエンハンサーとして機能し、それを利用することでがん細胞特異的なプロモーターを作製できる可能性がある。

E2F によるがん抑制遺伝子の発現制御機構

ARF プロモーターなどでがん細胞特異的な E2F 活性を活用した傷害法は、がん細胞特異的な E2F 活性を増強することで改善できると考えられる。しかし、現在のところ、その制御機構の詳細はわかっておらず、その傷害法を改善することができない。その傷害法の改善策を開発するためにも、E2F によるがん抑制遺伝子の発現制御機構を解明することは重要である。

E2F ファミリーメンバーの中でアポトーシス誘導能があるのは E2F1-3a で、特に E2F1 がその活性が高い(54)。したがって、E2F によるがん抑制遺伝子の発現制御機構を解明あたって、E2F1 によるがん抑制遺伝子の発現誘導機構の解明が特に重要であると考えられる。現在までに、E2F と会合し、がん抑制遺伝子を発現誘導する E2F1 活性に影響を及ぼす因子は多数報告されており、E2F1 によるがん抑制遺伝子の発現誘導機構の一部が明らかとなっている (表 1-1)。特に PI3K 経路を介した TopBP1 による E2F1 活性抑制機構は詳細に明らかになっている。PI3K 経路は増殖刺激によって活性化され、アポトーシス誘導を阻害する細胞生存において重要な経路である。PI3K 経路により Akt/PKB が活性化されると、Akt/PKB は TopBP1 をリン酸化し、それに伴い TopBP1 と E2F1 は会合する(55)。この会合により、TopBP1 はクロマチン再構成複合体である Brg1 を E2F1 へリクルートし、E2F1 の活性を抑制する(56)。また、Jab1 はがん抑制遺伝子を発現誘導する E2F1 活性を増強するが、PI3K 経路はその増強を阻害することも報告されている(57)。これらのことから、PI3K 経路はがん抑制遺伝子を発現誘導する E2F1 活性の制御に重要な経路であると考えられている。ただ、表 1-1 にあるこれら因子が、がん抑制遺伝子を発現誘導する E2F1 活性に及ぼす影響は、E2F1 の過剰発現によって調べてられている。また、ヒト以外の細胞で調べられている場合もある。したがって、ヒトのがん細胞に存在する内在

性の E2F1 は表 1-1 のような制御を受けていない可能性がある。したがって、これらの因子に着目して、がん細胞特異的な E2F 活性を活用した傷害法の改善策を開発する際には、これらの因子がヒトのがん細胞に存在する内在性の E2F 活性に及ぼす影響を検討する必要がある。また、表 1-1 には記していないが、薬剤性の CDK インヒビターである Flavopiridol はヒトのがん細胞をアポトーシス誘導し、そのアポトーシス誘導は E2F1 ノックダウンにより減弱することから、CDK はがん細胞に存在するがん抑制遺伝子を発現誘導する E2F1 活性に対して抑制的に働く可能性が示唆されている(58)。

表 1-1. E2F と会合し、E2F1 によるがん抑制遺伝子を発現誘導する活性に影響を及ぼす因子

| | 機能 | E2F1 活性への影響 |
|---------------|-----------------------------|--------------|
| Jab1 | 転写のコファクター | 増強(59) |
| AHR | 転写因子 | 抑制(60) |
| RIP140 | 核受容体のコファクター | 抑制(61) |
| TopBP1 | DNA 損傷のチェックポイント因子、転写のコファクター | 抑制(55,56,62) |
| VHL | E3 ユビキチンリガーゼ基質認識サブユニット | 抑制(63) |
| ARF | HDM2 の核小体への移行、転写のコファクター | 抑制(64) |
| MCPH1 | 転写のコファクター | 増強(65) |
| GABP γ | 転写因子 | 抑制(66) |
| SEN8 | NEDD8 特異的システイン分解酵素 | 増強(67) |
| Sirt1 | ヒストン脱アセチル化酵素 | 抑制(68) |
| KAP-1 | 転写のコファクター | 抑制(69) |

研究目的・研究成果

E2F による *ARF*、*TAp73*、*Bim* などのがん抑制遺伝子の発現誘導はがん細胞に特異的であり、その E2F 活性はがん治療に有用な活性である可能性が示唆された。そこで、本研究ではがん細胞特異的な E2F 活性のがん細胞特異的傷害法における有用性を検討することを目的とする。それを検討するために、①がん細胞特異的な E2F により特異的に活性化される ARF プロモーターのがん細胞特異的傷害法における有用性の検討②がん性変化で活性化された E2F の反応性エレメントを用いた人工プロモーターのがん細胞特異的傷害法における有用性の検討を行った。さらに、これらの傷害法を改善するために、③PI3K 経路が、がん性変化で活性化された E2F 活性へ及ぼす影響と④CDK インヒビターが、がん細胞特異的な E2F 活性へ及ぼす影響を調べた。

① がん細胞特異的な E2F により特異的に活性化される ARF プロモーターのがん細胞特異的傷害法における有用性の検討

ARF プロモーターは、がん細胞特異的な E2F1 プロモーターとは異なり、がん細胞でのみ E2F によって活性化され、がん細胞特異的傷害法により有用なプロモーターであることが示唆された。そこで、ARF プロモーターと E2F1 プロモーターのがん細胞特異的傷害法における有用性を比較した。がん細胞でのプロモーター活性を正常細胞でのプロモーター活性を割った値をがん細胞特異性と指標として、ARF プロモーターと E2F1 プロモーターのがん細胞特異性を比較した結果、がん細胞特異的な E2F に活性化される ARF プロモーターは、E2F1 プロモーターより多くのがん細胞において高いがん細胞特異性を示した。また、ARF プロモーターは、E2F1 プロモーターよりがん性変化に対して高い反応性を示した。これらのことから、ARF プロモーターは、E2F1 プロモ

ーターよりがん細胞で特異的に活性を示すことが示唆された。また、自殺遺伝子である *HSV-TK* を ARF、E2F1 プロモーターで発現制御した組み換えアデノウイルス (Ad-ARF-TK、Ad-E2F1-TK) を作成し、両ウイルスの傷害作用を比較した結果、Ad-ARF-TK は Ad-E2F1-TK よりがん細胞よりがん細胞を特異的に傷害した。このことから、ARF プロモーターは、E2F1 プロモーターよりがん細胞特異的傷害法により有用なプロモーターであることが示唆された。

② がん性変化で活性化された E2F の反応性エレメント用いた人工プロモーターのがん細胞特異的傷害法における有用性の検討

がん細胞特異的な E2F によって活性化される ARF プロモーターはがん細胞特異的傷害法に有用であることが示唆されたが、ARF プロモーターのがん細胞特異的な活性ががん細胞特異的な E2F 活性に起因するのかは不明であり、その E2F 活性が、がん細胞特異的傷害法に有用な活性であるのかは不明であった。がん細胞特異的な E2F 活性の有用性を調べるために、がん細胞で特異的に活性を示さない ARF コアプロモーター (ARF(-13)) にごん性変化特異的な E2F に特異的に活性化される TAp73 プロモーターの反応性エレメント (ERE73(1+2) または ERE73(3+4)) を連結しその活性を活用することで、がん細胞で特異的な人工プロモーターを作成できるのかを調べた。作成した人工プロモーターは、既にごん細胞で特異的と報告のある ARF、E2F1、hTERT プロモーターよりも高いがん細胞特異性を示した。また、pRB の発現によりがん細胞特異的な E2F 活性を消失させること、また、がん性変化特異的な E2F の反応性配列に変異を導入することで、人工プロモーターのがん細胞特異的な活性が消失した。これらのことから、人工プロモーターのがん細胞特異的な活性はがん性変化特異的な E2F 活性に起因することが強く示唆された。さらに自殺遺伝子である *HSV-TK* をが

ん細胞特異的な E2F を活用してがん細胞で特異的な人工プロモーターで発現制御した組み換えアデノウイルス (Ad-ERE73s-TK) を作成し、ウイルスの傷害作用を調べた結果、Ad-ERE73s-TK はがん細胞のみで傷害作用を確認できた。このことから、がん細胞特異的な E2F を活用することでがん細胞を特異的に傷害できることが強く示唆された。したがって、がん細胞で特異的な E2F 活性はがん細胞特異的傷害法に有用であることが強く示唆された。

③ PI3K 経路が、がん性変化で活性化された E2F 活性へ及ぼす影響

PI3K 経路は E2F1 過剰発現による一部のがん抑制遺伝子の発現誘導を阻害することが報告された(70)。このがん抑制遺伝子の中には、がん性変化特異的な E2F によって誘導される主要ながん抑制遺伝子 *ARF*、*Bim* などは含まれておらず、PI3K 経路が、がん性変化特異的な E2F 活性へ及ぼす影響は不明であった。PI3K 経路が、がん性変化で活性化された E2F 活性へ及ぼす影響を調べるために、PI3K 経路が E2F1 過剰発現による *ARF*、*Bim* の発現誘導に及ぼす影響を調べた。その結果、増殖刺激より PI3K 経路を活性化させても、E2F1 の過剰発現による *ARF*、*Bim* 遺伝子、*ARF*、*Bim* プロモーターの活性化は減弱しなかった。また、PI3K 経路の主なエフェクターである Akt/PKB の恒常的活性化型を発現し、PI3K 経路の活性化状態を模倣しても、E2F1 の過剰発現による *ARF*、*Bim* 遺伝子およびプロモーターの活性化は減弱しなかった。このことから、PI3K 経路は E2F1 過剰発現による *ARF*、*Bim* 遺伝子の発現誘導を阻害せず、PI3K 経路はがん性変化特異的な E2F 活性を抑制しないことが示唆された。

④ CDK インヒビター p21^{Cip1} が、がん細胞特異的な E2F 活性へ及ぼす影響

薬剤性 CDK インヒビターである Flavopiridol はがん細胞をアポトーシスへ誘導し、そのアポトーシスは E2F1 のノックダウンにより減弱する(58)ことから、CDK はがん細胞で特異的ながん抑制遺伝子を活性化する E2F 活性を抑制することが示唆された。もしこの仮説が正しければ、CDK インヒビターで CDK 活性を抑制することで、がん細胞で特異的な E2F 活性を増強でき、ARF プロモーターを用いた傷害法を改善できると予想される。そこで、CDK インヒビターである p21^{Cip1} の過剰発現により、がん細胞特異的な E2F 活性を増強し、ARF プロモーターの傷害法を改善できるのかを検討した。がん細胞では、p21^{Cip1} はがん細胞特異的な E2F 標的であるがん抑制遺伝子の発現を亢進し、その標的プロモーターを活性化した。一方で、正常細胞では、p21^{Cip1} はがん細胞特異的な E2F 標的であるがん抑制遺伝子の発現を亢進せず、その標的プロモーターを活性化しなかった。このことから、p21^{Cip1} は、がん細胞で特異的に E2F の標的のがん抑制遺伝子を転写レベルで活性化することが示唆された。また、p21^{Cip1} 過剰発現によるそのプロモーターを活性化は、恒常的活性化型 pRB を発現し E2F 活性を抑制することで消失し、さらに E2F 結合配列に変異を加えることでも消失した。したがって、p21^{Cip1} の過剰発現により、がん細胞特異的な E2F 活性が増強することが強く示唆された。さらに、p21^{Cip1} の過剰発現は、Ad-ARF-TK のがん細胞傷害作用を増強した。したがって、p21^{Cip1} の過剰発現によりがん細胞特異的な E2F 活性を増強することができ、ARF プロモーターを用いた傷害法を改善できることが強く示唆された。また、p21^{Cip1} の過剰発現は、細胞傷害性遺伝子を用いなくても、がん細胞特異的な E2F 活性を増強して、がん細胞特異的にアポトーシス誘導することも判明した。このこ

とから、がん細胞特異的な **E2F** 活性の増強はがん細胞特異的傷害法として有望であることも示唆された。

以上の研究成果より、①がん細胞特異的な **E2F** 活性をプロモーターで活用することでがん細胞を特異的に傷害することができ、②がん細胞特異的な **E2F** のアポトーシス誘導能を活用しても、がん細胞を特異的に傷害できることが明らかとなった。これらのことから、がん細胞特異的な **E2F** 活性はがん細胞特異的傷害に多角的に活用しうる有用な活性であることが明らかとなった。

第 2 章 実験材料・方法

1. 細胞培養

ヒト正常線維芽細胞 Human Foreskin Fibroblast (HFF)およびヒトがん細胞株 Saos-2、C-33A、H1299、293A、HeLa、U-2 OS、HLF は、10%牛胎仔血清 fetal calf serum (FCS) 入りの Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)を用い、CO₂ 濃度 5%、温度 37°Cの条件下で培養した。ヒトがん細胞株 5637、DLD-1 は、10% FCS 入りの RPMI1640 を用い、CO₂ 濃度 5%、温度 37°Cでの条件下で培養した。

2. プラスミド

レポータープラスミド

① pE2F1(-728)-Luc

E2F1 プロモーターをもつルシフェラーゼレポータープラスミドである。(以下も同様に) E2F1 プロモーターの-728 から+70 の領域は、*Sac* I と *Hind* III を利用して、pGL2-Basic (Promega)にクローニングされた(31)。その後、*Sac* I と *Hind* III を利用して、pGL3-Basic(Promega)にサブクローニングすることで、pE2F1(-728)-Luc は作製した。

② pARF(-736)-Luc

ARF プロモーターをもつ pARF(-736)-Luc は、ARF プロモーターの-736 から+49 の領域を *Sma* I と *Hind* III を利用して、pGL3-Basic にクローニングすることで作製された(36)。

③ phTERT(-378)-Luc

phTERT(-378)-Luc は hTERT プロモーターの-378 から+51 の領域を *Asp718* と *HindIII* を利用して、pGL3-Basic にサブクローニングすることで phTERT(-378)-Luc は作製した。

④ pARF(-13)-Luc

ARF コアプロモーターをもつ pARF(-13)-Luc は、pARF(-736)-Luc の-736 から-14 の領域を *PstI* と *SmaI* で切断し、平滑末端にして連結することで作成された(51)。

⑤ pERE73(1+2)×3-ARF(-13)-Luc

pERE73(1+2)×3-ARF(-13)-Luc は、*TAp73* 遺伝子の E2F 反応性エレメント ERE73(1+2)の 3 コピーを、*BglII* サイトを利用して pARF(-13)-Luc にサブクローニングすることで作製した。

⑥ pERE73(1+2)mt×3-ARF(-13)-Luc

pERE73(1+2)mt×3-ARF(-13)-Luc は、*TAp73* 遺伝子の E2F 反応性エレメント ERE73(1+2)に変異を加えた ERE73(1+2)mt の 3 コピーを、*BglII* サイトを利用して pARF(-13)-Luc にサブクローニングすることで作製した。

⑦ pERE73(3+4)×5-ARF(-13)-Luc

pERE73(3+4)×5-ARF(-13)-Luc は、*TAp73* 遺伝子の E2F 反応性エレメント ERE73(3+4)の 5 コピーを、*BglII* サイトを利用して pARF(-13)-Luc にサブクローニングすることで作製した。

⑧ pERE73(3+4)mt×5-ARF(-13)-Luc

pERE73(3+4)mt×5-ARF(-13)-Luc は、*TAp73* 遺伝子の E2F 反応性エレメント ERE73(3+4)に変異を加えた ERE73(3+4)mt の 5 コピーを、*Bgl*II サイトを利用して pARF(-13)-Luc にサブクローニングすることで作製した。

⑨ pE2WT×4-ARF(-13)-Luc

pE2WT×4-ARF(-13)-Luc は、*E2* 遺伝子の E2F 反応性エレメント E2 の 4 コピーを、*Bgl*II サイトを利用して pARF(-13)-Luc にサブクローニングすることで作製した。

⑩ pE2MT×4-ARF(-13)-Luc

pE2MT×4-ARF(-13)-Luc は、*E2* 遺伝子の E2F 反応性エレメント E2 に変異を加えた E2MT の 4 コピーを、*Bgl*II サイトを利用して pARF(-13)-Luc に挿入することで作製した。

⑪ pNF-κB-Luc

pNF-κB-Luc は NF-κB 結合配列と HTLV-1 のコアプロモーターを *Mlu* I と *Xho* I サイトを利用して pGL3-Basic に挿入することで作成された。

⑫ pNF-κB mut-Luc

pNF-κB mut-Luc は NF-κB 結合配列に変異を加えた NF-κB mut 配列と HTLV-1 のコアプロモーターを *Mlu* I と *Xho* I サイトを利用して pGL3-Basic に挿入することで作成された。

⑬ インターナルコントロール

インターナルコントロールには、 β -galactosidase を恒常的なプロモーター活性を示す elongation factor-1 (EF1) プロモーターで発現制御する pEF1-LacZ もしくは Renilla Luciferase を恒常的なプロモーター活性を示す CMV プロモーターで発現制御する pRL-CMV を用いた。

発現ベクター

① pCMV-p21^{Cip1}

p21^{Cip1} の発現ベクターは pCMV-p21^{Cip1} を用いた。pCMV-p21^{Cip1} は *Cla* I と *Xba* I を利用して、pCMV4 にクローニングすることで作製した。

② pPSM.7-LP

pRB の発現ベクターは pPSM.7-LP を用いた。PSM.7-LP は CDK によってリン酸化されうる 7 カ所のセリンをアラニンに置換し、CKD による不活化されない恒常的活性型変異体で、野生型の pRB より E2F の抑制能が高い。

pPSM.7-LP は pCMV-NeoBam に *Bam*HI を利用してクローニングすることで作製された(24)。

③ pENTR-E2F1

E2F1 発現ベクターは pENTR-E2F1 を用いた。pENTR-E2F1 は *Hind*III と *Xba* I を利用して、pENTR-CMV にクローニングすることで作製された(51)。

④ pENTR-E2F2

E2F2 発現ベクターは pENTR-E2F2 を用いた。pENTR-E2F2 は *Kpn* I と

EcoRI を利用して、pENTR-CMV にクローニングすることで作製された (51)。

⑤pENTR-E2F3a

E2F3a の発現ベクターは pENTR-E2F3a を用いた。pENTR-E2F3a は *Hind* III と *Xho*I を利用して、pENTR-CMV にクローニングすることで作製された (51)。

⑤ pcDNA3-12S E1a Δ2-11

E1a の発現ベクターは pcDNA3-12S E1a Δ2-11 を用いた。アデノウイルスの遺伝子産物 E1a は RB 以外に cAMP response element binding protein (CBP/p300) と結合する。E1a の RB の不活性化作用をみるために、E1a 発現ベクターとして CBP/p300 結合能を失った変異体 12S E1a Δ2-11 cDNA を pcDNA3 にクローニングすることで作製された(48)。

⑥pENTR-gag-PKB

Akt/PKB の発現ベクターは pENTR-gag-PKB を用いた。pENTR-gag-PKB は *EcoRI* を利用して gag-PKB を、pSG5-gag-PKB (71) から pENTR-CMV にサブクローニングすることで作製された。Akt/PKB は細胞膜への移行に伴い活性化される。pSG5-gag-PKB は、Akt/PKB をコードする配列にレトロウイルス由来の group specific antigen (gag) 配列を結合させた gag-PKB 発現カセットを導入したプラスミドである。gag を連結することで、そのタンパクは細胞膜へ移行する。Akt/PKB に gag 配列を結合することで、gag-PKB は恒常的に細胞膜へと移行し、活性化型となる。

3. 組換えアデノウイルス

組換えアデノウイルスの作製は以下の 5 段階で作製した。

I. ウイルスベクターにターゲット配列を組換えるためのエントリーベクターの作製

① pCMV-HSV-TK

CMV プロモーターの制御下で細胞傷害性遺伝子である単純ヘルペスウイルスのチミジンキナー (HSV-TK) を発現する発現ベクター pCMV-HSV-TK は、*HSV-TK* を含む pTK5 (理研リソースバンク) から Polymerase chain reaction (PCR) を利用して *HSV-TK* をサブクローニングすることにより作製した。

PCR の DNA polymerase は、PrimeSTAR GXL (タカラバイオ) を用いた。プライマーの配列は、

Fw+*Hind*III: 5'- AACAAGCTTCAGATCTTGGTGGCGTGAAACTCC -3'、

Rv+*Xba*I : 5'- GTCTCTAGACAATGGGGTCTCGGTGGGGTATC -3'

(アニーリング温度 : 60.6°C、Product length : 1341 bp) である。PCR 産物を *Hind*III と *Xba*I で切断後、CMV プロモーターをもつ発現ベクター pENTR-CMV にクローニングすることで作製した。

② pARF-HSV-TK

ARF プロモーターの制御下で HSV-TK を発現する発現ベクター pARF-HSV-TK は、*Asp*718 と *Hind*III により CMV プロモーターを除去し、ARF プロモーターの -736 から +49 の領域を *HSV-TK* の上流に挿入して作製した。

③ pE2F1-HSV-TK

E2F1 プロモーターの制御下で HSV-TK を発現する発現ベクター pE2F1-HSV-

TK は、上記と同様に *Not*I と *Hind*IIIにより E2F1 プロモーターの-728 から +70 の領域を *HSV-TK* の上流に挿入して作製した。

③ pERE73(1+2)x3-*HSV-TK*

ERE73(1+2)x3-ARF(-13)の制御下で *HSV-TK* を発現する発現ベクター pERE73(1+2)x3-*HSV-TK* は、*Asp*718 と *Hind*IIIにより CMV プロモーターを除去し、ERE73(1+2)x3-ARF(-13)を *HSV-TK* の上流に挿入して作製した。

④ pERE73(3+4)x5-*HSV-TK*

ERE73(3+4)x5-ARF(-13)の制御下で *HSV-TK* を発現する発現ベクター pERE73(3+4)x5-*HSV-TK* は、*Asp*718 と *Hind*IIIにより CMV プロモーターを除去し、ERE73(3+4)x5-ARF(-13)の領域を *HSV-TK* の上流に挿入して作製した。

⑤ pless-*HSV-TK*

HSV-TK 上流にプロモーターを欠損した pless-*HSV-TK* は、*Asp*718 と *Hind*IIIにより pCMV-*HSV-TK* から CMV プロモーターを除去し、平滑末端にして作製した。

II. ターゲット配列のウイルスベクターへの組換え

作製したエントリーベクター75 ng と組換えアデノウイルスゲノムをもつ pAd/PL-DEST 150 ng とを LR clonase I enzyme buffer 2 μ L と LR clonase I enzyme (Invitrogen) 2 μ L に混和し、25°Cで1時間反応させ、目的の発現カセットを組換えアデノウイルスゲノムに乗せ変えた。反応後、protein K

solution を 0.5 μL 加え、37°C で 10 分間反応させて LR clonase を失活させ、大腸菌 DH5 α を形質転換し、ターゲット配列をアデノウイルスベクターへ組換えたプラスミドを作製した。

III. 組換えアデノウイルスの作製

アデノウイルスベクターを *PacI* で切断して直鎖状にした後、1 μg の直鎖状のアデノウイルスベクターを FuGENE6 Transfection Reagent (Roche) を用いて 293A 細胞 (6 cm dish) に遺伝子導入した。組換えアデノウイルスが細胞を溶解した頃に、培地ごと細胞を回収した。3 回凍結融解し、細胞を破碎した後、遠心し上清を回収し、それを粗精製ウイルスとして大量培養に用いた。

IV. 組換えアデノウイルスの大量培養

293A 細胞 15 cm dish 1 枚当たり 2×10^8 個のウイルスを懸濁した 2 mL の DMEM 中で、37°C、5%CO₂ 条件下で 1 時間培養することで感染させた。感染後、細胞が全て剥離するまで 3~4 日間培養した後、培地ごと細胞を回収し、遠心後、ペレットとなった細胞を 20 mL の homogenization buffer に懸濁した。

V. 組換えアデノウイルスの精製

3 回凍結融解し、細胞を破碎した。その後、ソニケーター (TOMY、超音波発生機、UD-201) を用いて、OUTPUT 3、duty 50 で細胞を破碎した。まず細胞破碎液をそのまま 5 分間、次に 200 μL の 10% sodium deoxycholate (DOC) を加えて 5 分間ソニケーションした。氷上で 30 分間インキュベート後、さらに 15 分間ソニケーターで細胞を破碎した。20 mL のクロロホルムを加えて 1

分間激しく震盪し、遠心した後、上層を回収した。以上の操作を計 2 回行った。P28S ローター用のチューブ (HITACHI) に 1.4 g/mL 塩化セシウム 9 mL の上に 8 mL の 1.2 g/mL 塩化セシウムを重層し、その上にウイルス懸濁液を重層した。25,000 rpm、4°C、2 時間遠心し、不連続密度勾配の間に形成されたウイルスのバンドを回収した。同様の操作をもう 1 回行い、透析チューブにウイルスを移し、1 L の 10%グリセロールを含む PBS で 4°C 一晩透析を行った。透析後、ウイルスの 1/10 倍量の storage buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.0)-1% BSA) と等量のグリセリンを加えて均一に懸濁し、-20°C で保存した。このウイルス溶液の感染力価を、293A 細胞を用いて測定し、必要量のウイルスを実験に用いた。

4. レポーターアッセイ

細胞を撒いてから 24 時間後、FuGENE6 (Roche)、PEI max (Polysciences, Inc.) を用いてプラスミドを細胞に導入した。24 時間培養後、メEDIUMを除去した後、PBS にて細胞を洗浄し、10%FCS 添加 DEMEM にて 24 時間培養した。その後、PBS にて細胞を洗浄し、PBS を 1 mL を添加した後、セルスクレーパーで細胞を掻き取り、回収した。遠心して上清を除去した後、100 μ L の Passive Lysis Buffer (Promega) を加えて凍結融解し、細胞を溶解させた。その後遠心し、その上清 10 μ L を用いて luciferase 活性を測定した。実験はそれぞれ 3 回以上行い、3 回分以上の実験データから平均値および標準偏差を求めた。

5. FACSによる細胞傷害能の解析

培養した細胞を遠心により回収し、遠心後 0.3 mL の PBS にて細胞を懸濁した。その後、0.7 mL の 100% エタノールを加え 1 晩細胞を固定した。固定後、遠心により固定液を除去した後、RNase (50 µg/mL)を含む propidium iodide (50 µg/mL) 1 mL を加え、染色した。室温で 10 分以上染色後、FACSCalibur (Becton Dickinson)で SubG1 期細胞の割合を定量した。実験はそれぞれ 3 回以上行い、平均値および標準偏差を求めた。

6. qRT-PCR

cDNA は、抽出した total RNA 1 µg に対し、First stand cDNA synthesis kit (Roche) を用いて逆転写により作成した。逆転写のプライマーは oligo dT primer を用いた。qPCR は KAPA SYBR qPCR Mix (KAPA Biosystems)を用いて行い、リアルタイム PCR 装置には、DICE (タカラバイオ) を使用した。プライマーは以下のものを使用した。

表 2-1. プライマーの配列一覧

| 遺伝子名 | 配列 | アニーリング温度(°C) |
|--------------------------|--------------------------------------|--------------|
| <i>ARF</i> | Fw: 5'- CCGCCGCGAGTGAGGGTTTT -3' | 62.2 |
| | Rv: 5'- ACGGGTCGGGTGAGAGTG-3' | |
| <i>Bim</i> | Fw: 5'- GCATCATCGCGGTATTCGGTTCG -3' | 60.7 |
| | Rv: 5'- AAAGCGGGGATCTGGTAGCAAAAG -3' | |
| <i>RBBP4</i> | Fw: 5'- TATGCCCCAGAACCCTTGTAT -3' | 54.8 |
| | Rv: 5'- ACTGCCGTATGCCCTGTAAG -3' | |
| <i>RBBP7</i> | Fw: 5'- GCAAGATGGCGAGTAAAGAGAT-3' | 53.4 |
| | Rv: 5'- GCGGCATGTAACGAGCAC-3' | |
| α - <i>tublin</i> | Fw: 5'- CCGGGCAGTGTTTGTAGACT-3' | 67 |
| | Rv: 5'- TTGCCTGTGATGAGTTGCTC-3' | |
| β - <i>tublin</i> | Fw: 5'- GGGGCGCATTCCAACCTTCC -3' | 54.7 |
| | Rv: 5'- AGCTCGGCGCCCTCTGTGTAGT-3' | |
| <i>GAPDH</i> | Fw: 5'- GGAGTCCACTGGCGTCTTCA-3' | 57.9 |
| | Rv: 5'- GAGGGGCCATCCACAGTCTT-3' | |
| <i>18SrRNA</i> | Fw: 5'- AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-3' | 52.9 |
| | Rv: 5'- GATCCGAGGGCCTCACTAAAC-3' | |

7. Western blot

遠心でチューブに回収した細胞に、RIPA buffer (150 mM Sodium chloride、1.0% NP-40、0.5% Sodium deoxycholate、0.1% Sodium deoxysulphate (SDS)、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)) を細胞のペレットの 5 倍量加えて、細胞内のタンパク質を抽出した。このサンプルを用いて SDS-PAGE を行った。マーカーは WIDE-VIEW Prestained Protein Size Marker III (WAKO)を使用した。SDS-PAGE 後、必要な部分のゲルを切り出し、ブロッティング装置 TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (BIO-RAD) を用いて PVDF 膜 (Pall) に転写した。転写後、PVDF メンブレンを 5% skim milk in TBS (Tris-buffered saline) -T (0.1% Tween 20 in TBS) で 30 分ブロッキングした。ブロッキング

後、TBS-T でメンブレンを 2 回すすぎ、4°C、一晚 (O/N) で 1 次抗体を反応させた。抗体の希釈には 0.25% skim milk in TBS-T を使用した。反応後、0.25% skim milk in TBS-T でメンブレンを洗浄し (2 回すすいだ後、1 回 20 分震盪、2 回 5 分震盪)、2 次抗体を室温で 1 時間反応させた。抗体の希釈には 0.25% skim milk in TBS-T を使用した。2 次抗体反応後、0.25% skim milk in TBS-T でメンブレンを再び洗浄し (2 回すすいだ後、1 回 20 分震盪)、さらに TBS-T でメンブレンを洗浄した (1 回 20 分震盪した後、2 回すすぐ)。洗浄後、Immuno Star LD (WAKO) を用いて発光させ、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) で検出した。

8. 抗体

1 次抗体は、抗 p21^{Cip1} (sc-817, Santa Cruz Biotechnology, 1:1000)、抗 pRB (sc-50, Santa Cruz, 1:500)、抗 Akt 抗体 (Cell Signaling, 1:250)、抗 p-Akt 抗体 (Cell Signaling, 1:250)、インターナルコントロールとして抗 β -actin (A1978, SIGMA, 1:2000) を使用した。2 次抗体には抗ラビット IgG-HRP 標識 2 次抗体 (Jackson, 1:5000)、または抗マウス IgG-HRP 標識 2 次抗体 (Jackson, 1:5000) を使用した。

第3章 実験結果

第1節 がん細胞特異的な E2F 活性により活性化される ARF プロモーターを用いた傷害法の有用性の検討

ARF プロモーターは、がん細胞特異的な E2F1 プロモーターとは異なり、がん細胞でのみ E2F によって活性化され、がん細胞特異的傷害法により有用なプロモーターであることが示唆された。そこで、ARF プロモーターと E2F1 プロモーターのがん細胞特異的傷害法における有用性を比較した。

ARF プロモーターは E2F1 プロモーターよりがん細胞で特異的に活性を示す

ARF プロモーターが、がん細胞特異的アプローチにおいて有用なプロモーターであるかを調べるために、ARF プロモーターが既にかん細胞特異的に活性を示すと報告されている E2F1 プロモーターよりがん細胞特異的に活性を示すかをレポーターアッセイで調べた。

まず、ヒト正常線維芽細胞 HFF およびヒトがん細胞株 C-33A における ARF プロモーターと E2F1 プロモーターの活性を調べた。その結果、ヒト正常線維芽細胞 HFF では ARF プロモーターは E2F1 プロモーターより非常に低いプロモーター活性を示した。一方で、ヒトがん細胞株 C-33A では同程度の活性を示した (図 3-1-1)。

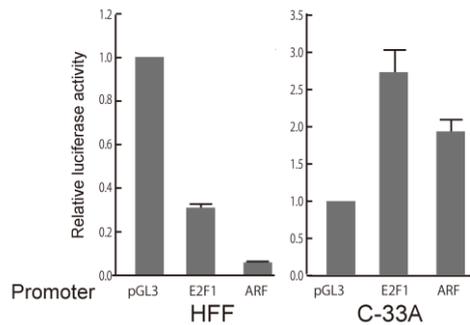


図 3-1-1. HFF と C-33A での E2F1、ARF プロモーターの活性の比較

ヒト正常線維芽細胞 HFF およびがん細胞株 C-33A で E2F1、ARF プロモーターの活性をレポーターアッセイで調べた。インターナルコントロールには、Renilla Luciferase を恒常的なプロモーター活性を示す pRL-CMV を用いた。

そこで、次に ARF プロモーターが E2F1 プロモーターよりがん細胞特異的に活性を示すか否かを、がん細胞株でのプロモーター活性の値を正常細胞でのプロモーター活性の値で割った値（がん細胞特異性、Cancer specificity）を指標に判定した。

$$\text{がん細胞特異性} = \frac{\text{がん細胞でのプロモーター活性}}{\text{正常細胞でのプロモーター活性}}$$

その結果、C-33A では ARF プロモーターは E2F1 プロモーターより高いがん細胞特異性を示した（図 3-1-2）。このことから、ARF プロモーターは E2F1 プロモーターよりがん細胞で特異的に活性を示すことが示唆された。そこで、細胞種特異性を否定するために、さらに 7 種類のがん細胞でプロモーター活性を調べ、がん細胞特異性を計算した。その結果、E2F1 プロモーターが ARF プロモーターより高いがん細胞特異性を示すがん細胞株の数が 1 種類である一方で、ARF プロモーターが E2F1 プロモーターより高いがん細胞特異性を示すがん細胞株

胞株の数が5種類であることが分かった (図 3-1-2)。

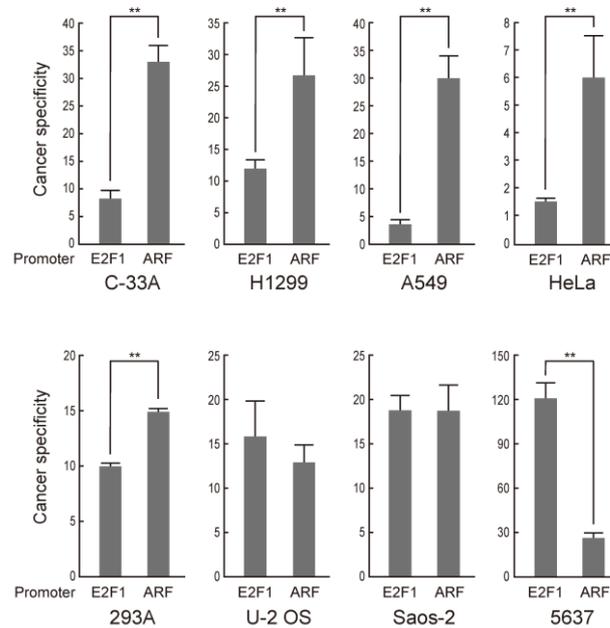


図 3-1-2. ARF プロモーターは E2F1 プロモーターより多くのがん細胞においてがん細胞特異性が高い

正常細胞として HFF を用いて、がん細胞特異性を求めた。がん細胞株は、C-33A、293A、HeLa、Saos-2、5637、U-2 OS、H1299 を用いた。

** : P<0.01

さらに、細胞種特異性を否定するために、ヒト正常線維芽細胞 WI-38 でもプロモーター活性を調べ、がん細胞特異性を比較した。その結果、HFF の場合と同様な結果が得られた (図 3-1-3)。これらのことから、ARF プロモーターは、E2F1 プロモーターより高いがん細胞特異性を示すがん細胞株の数がより多く、ARF プロモーターは E2F1 プロモーターよりがん細胞で特異的に活性を示すことが強く示唆された。

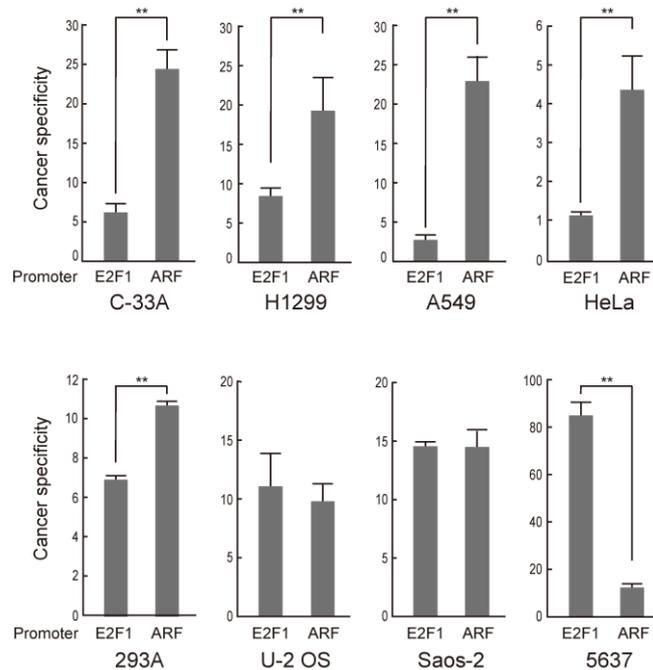


図 3-1-3. ARF プロモーターは E2F1 プロモーターより多くのがん細胞においてがん細胞特異性が高い

正常細胞として WI-38 を用いて、がん細胞特異性を求めた。がん細胞株は、C-33A、293A、HeLa、Saos-2、5637、U-2 OS、H1299、MCF-7 を用いた。

** : P<0.01

ARF プロモーターが E2F1 プロモーターよりもがん細胞で特異的に活性を示すのかをさらに調べるために、ARF プロモーターが E2F1 プロモーターよりもがん性変化に対し高い反応性を示すのかを調べた。がん細胞では RB の恒常的な機能低下に伴い、E2F 活性が亢進している。そこで、今回がん性変化として、RB を強制的に不活性化する E1a の発現と E2F1 の過剰発現を用いた。その結果、ARF プロモーターは E2F1 プロモーターよりも E1a、E2F1 に対して高い反応性を示した (図 3-1-4)。以上の結果より、ARF プロモーターは、E2F1 プロモーターよりもがん細胞で特異的であり、がん細胞特異的アプローチに有用な

プロモーターである可能性が強く示唆された。

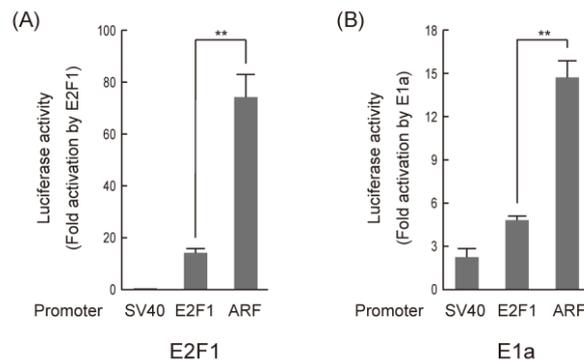


図 3-1-4. ARF プロモーターは E2F1 プロモーターよりもがん性変化に対して高い反応性を示す

(A) ARF、E2F1 プロモーターの E2F1 の過剰発現に対する反応性を比較した。E2F1 の発現ベクターは pENTR-E2F1 (80 ng) を用いた。インターナルコントロールには、Renilla Luciferase を恒常的なプロモーター活性を示す pRL-CMV を用いた。

(B) ARF、E2F1 プロモーターの E1a の発現に対する反応性を比較した。E1a の発現ベクターは pcDNA3 12S E1a Δ2-11 (10 ng) を用いた。インターナルコントロールには、Renilla Luciferase を恒常的なプロモーター活性を示す pRL-CMV を用いた。

** : P<0.01

Ad-ARF-TKはAd-E2F1-TKよりがん細胞を特異的に傷害する

レポーターアッセイの結果から、ARFプロモーターはE2F1プロモーターよりがん細胞特異的アプローチに有用なプロモーターである可能性が示唆された。そこで、実際にARFプロモーターを利用したアプローチがE2F1プロモーターを利用したアプローチよりがん細胞を特異的に傷害できるかどうかを調べた。それを検討するために、細胞傷害性遺伝子として *HSV-TK* (*Herpes simplex virus-thymidine kinase*) をARFプロモーターおよびE2F1プロモーターで発現制御した組換えアデノウイルス (Ad-ARF-TK および Ad-E2F1-TK) を作製し(図 3-1-5)、正常細胞とがん細胞に対する傷害作用をウイルス間で比較した。*HSV-TK* は不活性型のガンシクロビルを活性型に代謝することで細胞傷害活性を示す(図 3-1-5)。そのため、これらの組換えアデノウイルスは細胞に感染させた後、ガンシクロビル存在下で培養を行った。ウイルスの細胞傷害作用は、アポトーシス細胞の指標であるSubG1期細胞の割合を基に判定した。

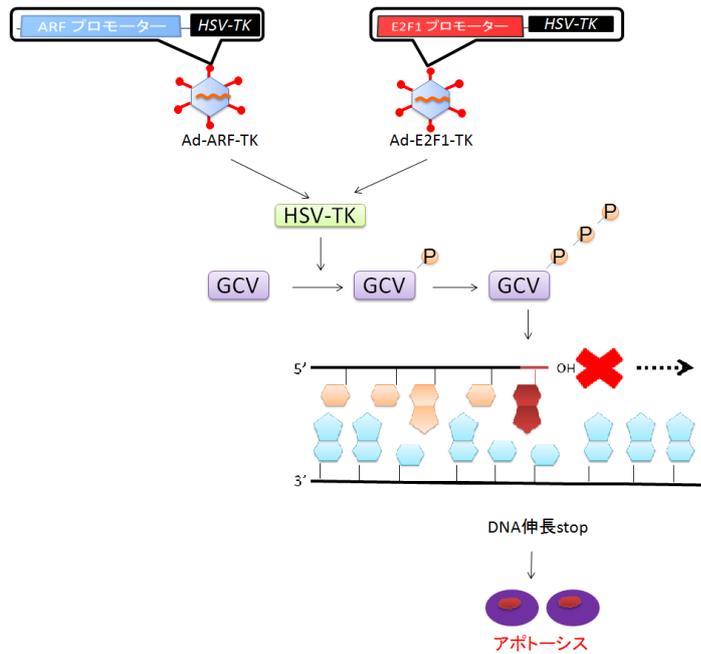


図 3-1-5. HSV-TK と GCV による細胞傷害機構

Ad-ARF-TK と Ad-E2F1-TK は、細胞傷害性遺伝子 *HSV-TK* を ARF プロモーターもしくは E2F1 プロモーターで発現制御した組換えアデノウイルスである。*HSV-TK* はウラシルのアナログ分子であるガンシクロビル (GCV) をリン酸化する。リン酸化された GCV は、生体内でさらにリン酸化され、DNA 複製時に DNA 鎖に取り込まれる。リン酸化された GCV が DNA 鎖に取り込まれると、以後 DNA 鎖伸長が起こらなくなり、アポトーシスが誘導される。

まず、Ad-ARF-TK と Ad-E2F1-TK の正常細胞 HFF に対する細胞傷害作用を調べた。それぞれのウイルスの感染力価 (multiplicity of infection: MOI) を振って感染させた結果、同じ MOI では Ad-ARF-TK を感染させたサンプルは Ad-E2F1-TK を感染させたサンプルより低い SubG1 期細胞の割合を示した (図 3-1-6)。このことから、Ad-ARF-TK は Ad-E2F1-TK より正常細胞に対する傷害作用が低いことが示唆された。次に、Ad-ARF-TK と Ad-E2F1-TK のがん細胞株に対する細胞傷害作用を調べた。がん細胞株では両プロモーターは正常細胞

より強いプロモーター活性を示すため、より低い MOI で感染力価を振って感染させた。その結果、7 種類のがん細胞株で Ad-ARF-TK を感染させたサンプルは Ad-E2F1-TK を感染させたサンプルと同程度もしくはそれ以上の SubG1 期細胞の割合を示した (図 3-1-6)。このことから、これらのがん細胞株において、Ad-ARF-TK は Ad-E2F1-TK と同程度、もしくはそれ以上の細胞傷害作用があることが示唆された。以上の結果より、Ad-ARF-TK は Ad-E2F1-TK よりがん細胞を特異的に傷害できる可能性が示唆された。

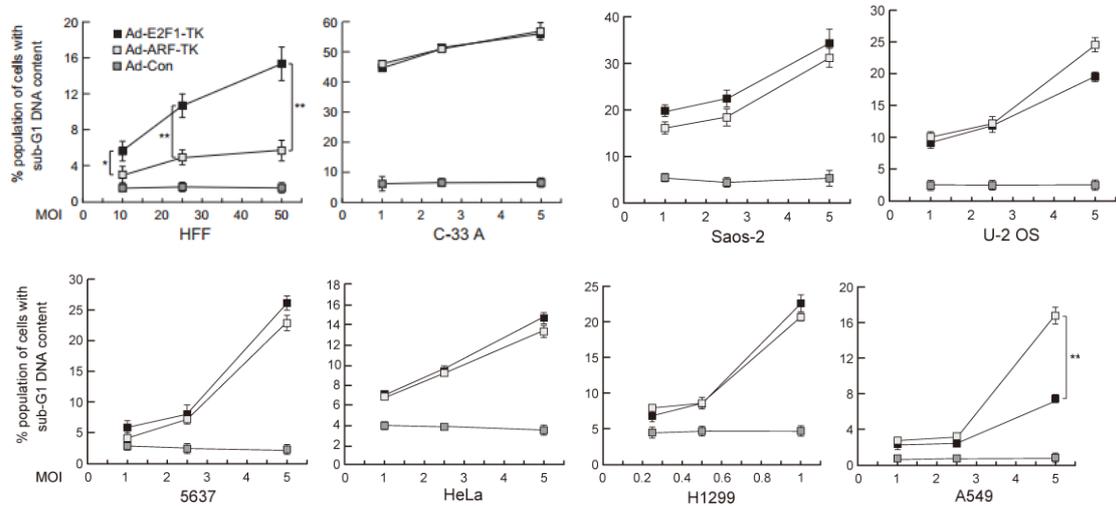


図 3-1-6. Ad-ARF-TK は Ad-E2F1-TK よりがん細胞を特異的に傷害する

正常細胞 HFF は、ウイルスを MOI 10, 20, 50 で感染させた。がん細胞株 Saos-2、U-2 OS、5637、HeLa、H1299、A549 は MOI 1, 2.5, 5 で、がん細胞株 H1299 は MOI 0.25, 0.5, 1 で感染させた。その後、ガンシクロビル (GCV) 濃度 50 μ M の 10%FCS 入り DMEM もしくは RPMI にて 5 日間培養し、細胞を回収した。

* : $0.01 \leq p < 0.05$

** : $P < 0.01$

【考察】

自殺遺伝子療法、腫瘍溶解性ウイルス療法に利用するプロモーターは正常細胞では活性が低く、がん細胞で特異的に活性の高いプロモーターを用いることが重要である。現在、がん細胞で特異的に転写活性を示すプロモーターとして、E2F によって活性化される E2F1 プロモーターが注目されている。これは、がん細胞では RB 経路の異常により、E2F 活性が亢進していることによる。しかし、正常な増殖細胞において、増殖刺激によって pRB は不活性化され、E2F1 プロモーターは E2F によって活性化され、高い活性を示す(31)。従って、E2F1 プロモーターを用いたアプローチでは、正常な増殖細胞まで傷害する可能性がある。一方、ARF プロモーターは正常細胞では E2F によって活性化されず、がん細胞でのみ E2F によって活性化される(48)。従って、ARF プロモーターはがん細胞でのみ E2F により活性化される真にがん細胞特異的なプロモーターであり、がん細胞特異的なアプローチに有用なプロモーターであることが示唆された。

ARF プロモーターと E2F1 プロモーターのがん細胞特異性を比較した結果、がん細胞でのみ E2F によって活性化される ARF プロモーターは、E2F1 プロモーターより多くのがん細胞においてがん細胞特異性が高く、がん細胞で特異的に活性を示すことが示唆された。このことから、がん細胞特異的な E2F 活性を利用したがん細胞特異的なアプローチは有用である可能性が示唆された。

ただし、がん細胞株 5637 では、例外的に ARF プロモーターは E2F1 プロモーターより低いがん細胞特異性を示した(図 3-1-2、3-1-3)。また、がん細胞株 5637 では E2F1 プロモーターは、ほかのがん細胞よりも非常に高いがん細胞特異性を示した。これらの原因として、5637 では E2F による E2F1 プロモーターの活性化能が高いことが考えられる。5637 では E2F3 が遺伝子増幅により過剰

発現しているが分かっている(72)。E2F3は、増殖関連遺伝子の活性化能が高い一方で、アポトーシス関連遺伝子の活性化能が低い。従って、E2F3の過剰発現により、5637では増殖関連プロモーターであるE2F1プロモーターが例外的に非常に高い活性を示したと考えられる。一方、5637細胞におけるARFプロモーターのがん細胞特異性は、他のがん細胞株と同等かそれ以上ある(図3-1-2、3-1-3)。従って、5637細胞において例外的にE2F1プロモーターがARFプロモーターよりも高いがん細胞特異性を示したことは、ARFプロモーターのがん細胞特異的アプローチにおける有用性を否定するものではないと考えられる。

ARFプロモーターがE2F1プロモーターよりもがん細胞で特異的に高い活性を示すのかをさらに調べるために、ARFプロモーターとE2F1プロモーターのがん性変化に対する反応性を比較した。がん性変化として、E2F1の過剰発現やE1aの発現を用いた。がん細胞ではE2F1が過剰発現しており、ラット線維芽細胞でE2F1を過剰発現すると、足場非依存性を獲得し、腫瘍性のトランスフォーメーションを起こす(73)。また、G0期の細胞でE2F1を過剰発現することで、増殖刺激非依存的にS期へ移行することも知られており(74)、E2F1の過剰発現によりがん化状態を模倣できると予想される。がん細胞ではpRBが機能低下しており、E1aの発現によりRBとE2Fとの会合を阻害でき、RBの機能低下を模倣できる。また、G0期の細胞でE1aを発現することで、増殖刺激非依存的にS期へ移行することも知られており、E1aの発現もがん化状態を模倣できると予想される。ARFプロモーターとE2F1プロモーターのE2F1の過剰発現やE1aの発現に対する反応性を比較したところ、ARFプロモーターはE2F1プロモーターよりも高い反応性を示した(図3-1-4)。この結果からも、ARFプロモーターがE2F1プロモーターよりもがん細胞で特異的に高い活性を示すことが示唆された。これらの結果より、ARFプロモーターの方がE2F1プロモーターよ

りも普遍的にがん細胞で高い活性を示すがん細胞特異的アプローチに有用なプロモーターであることが強く示唆された。

ARF プロモーターの有用性を調べるために、ARF プロモーターを利用した細胞傷害性組換えアデノウイルスが E2F1 プロモーターを用いたものよりがん細胞特異的に傷害できるか否かを調べた。正常細胞 HFF に対する傷害作用を調べた結果、Ad-ARF-TK は Ad-E2F1-TK より低い傷害作用を示した (図 3-1-6)。従って、ARF プロモーターを用いることで、正常細胞に対する影響を軽減できることが示唆された。一方、がん細胞株 (Saos-2、U-2 OS、5637、HeLa、H1299、A549) に対する傷害作用を調べた結果、Saos-2、U-2 OS、5637、HeLa、H1299 に対しては Ad-ARF-TK は Ad-E2F1-TK と同程度、A549 に対してはそれ以上の傷害作用を示した (図 3-1-6)。このことから、Ad-ARF-TK は Ad-E2F1-TK より正常細胞に対する影響が少なく、よりがん細胞を特異的に傷害できることが強く示唆された。したがって、ARF プロモーターを用いてがん細胞に特異的な E2F 活性を活用することで、正常な増殖細胞に対する影響を軽減し、よりがん細胞特異的にアプローチできることが期待された。

第2節 がん細胞特異的な E2F 活性を活用した人工プロモーターを用いた傷害法の有用性の検討

ARFプロモーターは、E2F1プロモーターよりがん細胞で特異的に活性を示し、がん細胞特異的傷害法に有用なプロモーターであることがわかった（図 3-1-2、3-1-3）。しかし、ARFプロモーターのがん細胞特異的な活性が、がん細胞特異的な E2F 活性に起因するのかは不明であり、がん細胞特異的な E2F 活性が、がん細胞特異的傷害法に有用な活性であるのかは不明である。

そこで、がん細胞特異的な E2F 活性が、がん細胞特異的傷害法に有用な活性であるのかを調べるために、その反応性エレメントを利用してがん細胞特異的な E2F を活用することで、既存のがん細胞特異的プロモーターと同程度もしくはそれ以上がん細胞特異的なプロモーターを作成できないかを検討した（図 3-2-1）。ARFプロモーターの E2F 反応性エレメントを含む上流の制御領域を欠失した ARF コアプロモーター（ARF (-13)）は、E2F に対してほとんど反応性を示さず、がん細胞で特異的に活性を示さない。また、がん抑制遺伝子 *TAp73* のプロモーターは、がん性変化によって誘導された E2F 活性に特異的に反応し、その E2F 反応性エレメントとして ERE73(1+2)と ERE73(3+4)が同定されている（E2F Responsive Element of TAp73）。TAp73プロモーターを活性化する E2F 活性はがん細胞株のみに存在するため、これらの反応性エレメントはがん細胞でのみエンハンサーとして機能する。これらのことから、ARF(-13)の上流に ERE73(1+2)と ERE73(3+4)を複数コピー連結することで、がん細胞特異的な E2F 活性に対して特異的で、高い反応性を示すがん細胞で特異的な人工プロモーターを作製できると予想された。

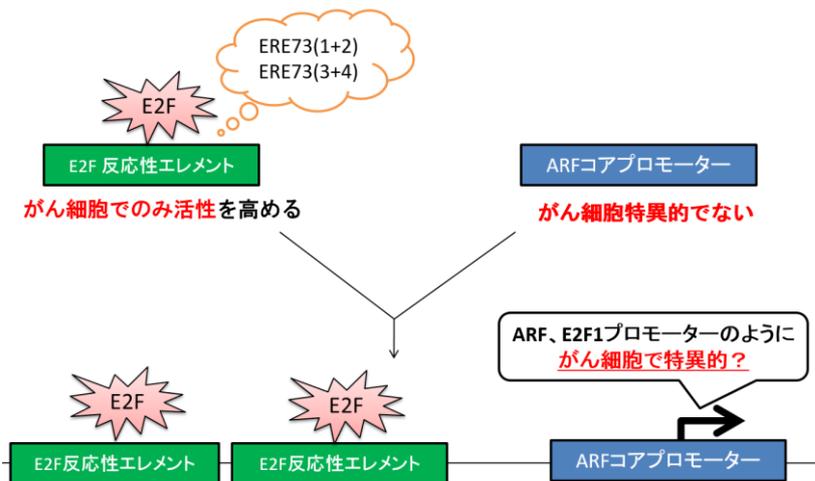


図 3-2-1. がん細胞特異的な E2F 活性を活用した人工プロモーター

ERE73(1+2)および ERE73(3+4)を用いてがん細胞特異的な E2F 活性を活用することで、非常にごん細胞で特異的な人工プロモーターを作製できる可能性がある。

がん細胞特異的な E2F の反応性エレメントを利用することで、がん細胞でのみプロモーター活性を高めることができる

まず ARF コアプロモーター(ARF(-13))の上流にごん細胞特異的な E2F 活性に反応するエレメントである ERE73(1+2)または ERE73(3+4)をそれぞれ複数コピー連結した人工プロモーター (ERE73(1+2)x3-ARF(-13)および ERE73(3+4)x5-ARF(-13)) を作製した (図 3-2-1)。また、コントロールとして、正常細胞とがん細胞に存在する E2F の両方に反応性を示す E2 プロモーター由来の E2F 反応性エレメント E2WT を ARF コアプロモーター(ARF(-13))にタンデム連結した E2WTx4-ARF(-13)も作製した。細胞は正常細胞 HFF とがん細胞株 5637、Saos-2、DLD-1、HLF を用いた。

正常細胞 HFF で人工プロモーター、E2WTx4-ARF(-13)および ARF(-13)の活性を調べた結果、正常細胞に存在する生理的な E2F に対して反応性を示す

E2WTx4-ARF(-13)は ARF(-13)よりも高い活性を示す一方で、2つの人工プロモーターの活性は ARF(-13)と同程度であった (図 3-2-2)。また、がん細胞株でプロモーター活性を調べた結果、がん細胞株 5637、Saos-2、DLD-1、HLF すべてにおいて、人工プロモーター、E2WTx4-ARF(-13)は共に ARF(-13)より高い活性を示した (図 3-2-2)。これらのことから、E2WT はがん細胞だけでなく正常細胞においてもエンハンサーとして働くのに対して、がん細胞特異的な E2F の反応性エレメント ERE73(1+2)および ERE73(3+4)はがん細胞でのみエンハンサーとして機能することが示唆された。

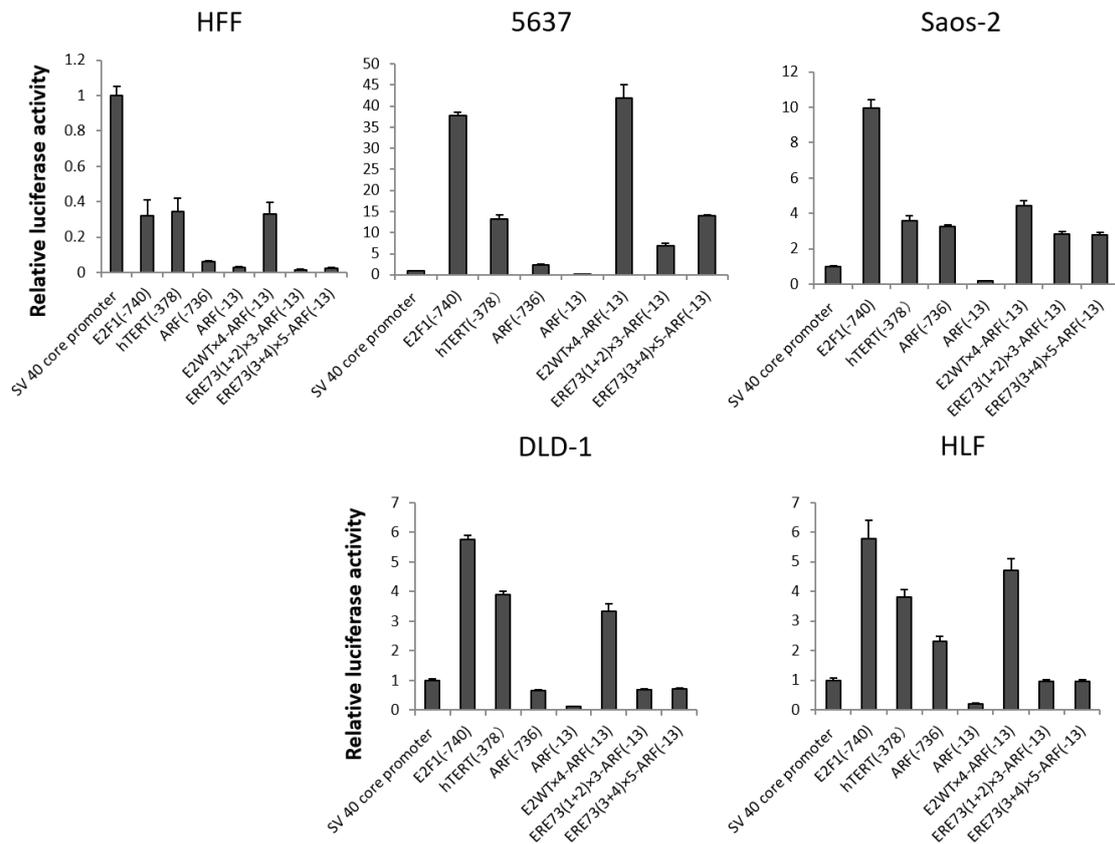


図 3-2-2. がん細胞特異的な E2F の反応性エレメントはがん細胞でのみプロモーター活性を高めることができる

正常細胞 HFF とがん細胞株 5637、Saos-2、DLD-1、HLF で SV40 core、E2F1、hTERT、ARF(-13)、E2WT × 4-ARF(-13)、ERE73(1+2) × 3-ARF(-13)、

ERE73(3+4)×3-ARF(-13)のプロモーター活性をレポーターアッセイで調べた。インターナルコントロールには、Renilla Luciferase が恒常的なプロモーター活性を示す CMV プロモーターで制御される pRL-CMV を用いた。

また、人工プロモーターと E2WTx4-ARF(-13)間のがん細胞特異性を比較すると、いずれのがん細胞株でも人工プロモーターの方がはるかに高いがん細胞特異性を示した (図 3-2-3)。これらのことから、がん細胞特異的な E2F の反応性エレメントはがん細胞でのみプロモーター活性を高めることができ、プロモーターのがん細胞特異性を上げるのに有用であることが強く示唆された。

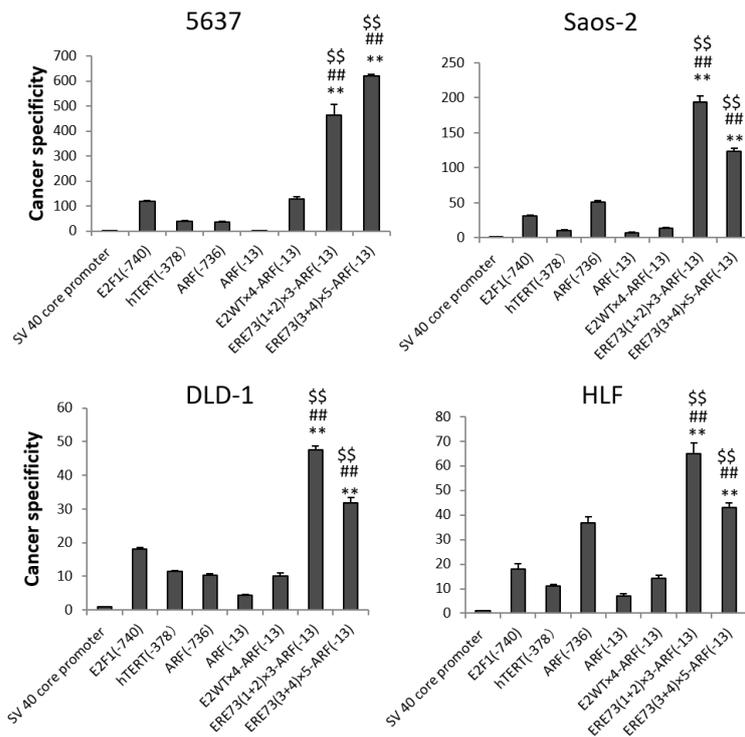


図 3-2-3. ERE73(1+2)x3-ARF(-13)、ERE73(3+4)x5-ARF(-13)は E2WTx4-ARF(-13)、ARF、E2F1、hTERT プロモーターよりがん細胞で特異的に活性を示す

正常細胞 HFF とがん細胞株 5637、Saos-2、DLD-1、HLF を用いて SV40 core、

E2F1、hTERT、ARF(-13)、E2WT×4-ARF(-13)、ERE73(1+2)×3-ARF(-13)、ERE73(3+4)×3-ARF(-13)のがん細胞特異性を調べた。

**** : P<0.01 人工プロモーターvs ARF プロモーター**

: P<0.01 人工プロモーターvs hTERT プロモーター

\$\$: P<0.01 人工プロモーターvs E2F1 プロモーター

ERE73(1+2)x3-ARF、ERE73(3+4)x5-ARF(-13)は ARF、E2F1、hTERT プロモーターよりがん細胞で特異的に活性を示す

次に人工プロモーターのがん細胞特異性の程度を調べるために、人工プロモーターと既存のがん細胞特異的プロモーターARF、E2F1、hTERT プロモーターとでがん細胞特異性を比較した。その結果、人工プロモーターは既存のがん細胞特異的プロモーターARF、E2F1、hTERT プロモーターより高いがん細胞特異性を示した (図 3-2-3)。このことから、人工プロモーターは ARF、E2F1、hTERT プロモーターよりがん細胞で特異的に活性を示す非常にがん細胞で特異的なプロモーターであることが強く示唆された。

その可能性をさらに検討するため、人工プロモーターと ARF、E2F1、hTERT プロモーターのがん性変化に対する反応性を比較した。がん細胞では RB が恒常的に機能低下しており、E2F1, 2, 3a の活性が亢進している。そこで、がん性変化として、RB を強制的に不活性化する E1a の発現と E2F1, 2, 3a の過剰発現を用いた。その結果、人工プロモーターはいずれのがん性変化に対して、ARF、E2F1、hTERT プロモーターよりも高い反応性を示した。このことから、人工プロモーターは ARF、E2F1、hTERT プロモーターよりがん性変化に対する反応性が高いことが示唆された。また、正常細胞でみられる生理的な刺激の一つであるの増殖刺激に対する人工プロモーターの反応性を調べた。細胞はヒト正常線維芽細胞 HFF を用いた。線維芽細胞の増殖因

子は血清中に含まれているので、増殖刺激として血清刺激を用いた。その結果、生理的な E2F に対し反応性を示す E2WTx4-ARF(-13)は血清刺激により活性化され、E2F に対して反応性を失った E2MT x 4 -ARF(-13)は血清刺激によって活性化されなかった(図 3-2-4)。このことから、本実験の条件下では血清刺激により生理的に E2F が活性化されており、細胞は G1 期-S 期にあることがわかった。これに対し、人工プロモーターは血清刺激による活性化が認められなかった(図 3-2-4)。このことから、人工プロモーターは少なくとも G1 期-S 期以降時には活性化を受けないことが分かった。以上のことから、人工プロモーターは ARF、E2F1、hTERT プロモーターよりも、がん性変化に対して特異的に反応性が高く、普遍的にがん細胞で特異的に活性を示すことが強く示唆された。従って、がん細胞特異的な E2F 反応性エレメントは、がん細胞でのみプロモーター活性を非常に向上させることができるがん細胞特異的アプローチに有用なエレメントであることが示唆された。

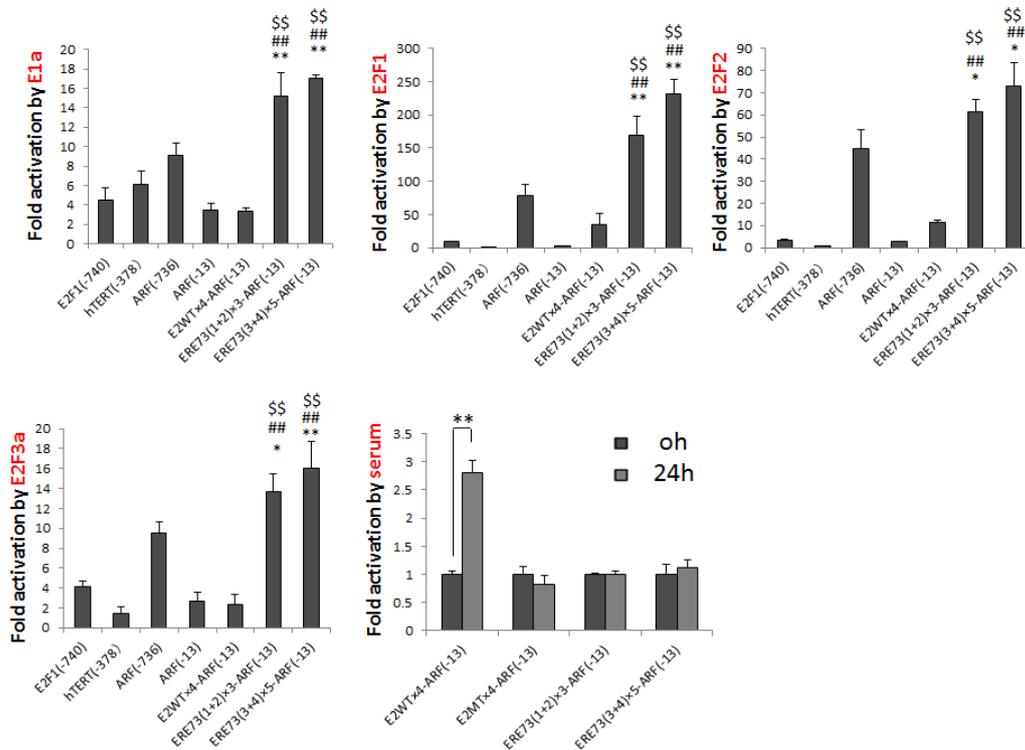


図 3-2-4. 人工プロモーターは ARF、E2F1、hTERT プロモーターよりがん性変化に対して特異的に反応性が高い反応性を示す

(A) E1a、E2F1, 2, 3a に対する反応性を HFF 用いてレポーターアッセイで調べた。E1a、E2F1, 2, 3a の発現ベクターは pcDNA3 12S E1a Δ2-11 (10 ng)、pENTR-E2F1 (80 ng)、pENTR-E2F2 (80 ng)、pENTR-E2F3a (80 ng) を用いた。

(B) 人工プロモーターの血清刺激に対する反応性を HFF 用いてレポーターアッセイで調べた。細胞を撒いてから 24 時間後、メディアムを除去し PBS にて細胞を洗浄した後、0.1%FCS 添加 DEMEM にて 24 時間培養した。トランスフェクション後、8 時間後に PBS にて細胞を洗浄し、0.1%FCS 添加 DMEM にて、16 時間培養した。FCS 添加する前のサンプルを血清刺激後 0 時間のサンプルとして回収し、血清刺激後 24 時間のサンプルは FCS 濃度が 20%となるように FCS を添加後、24 時間培養後に回収した。

* : $0.01 \leq p < 0.05$ 人工プロモーターvs ARF プロモーター

** : $P < 0.01$ 人工プロモーターvs ARF プロモーター

: $P < 0.01$ 人工プロモーターvs hTERT プロモーター

\$\$: $P < 0.01$ 人工プロモーターvs E2F1 プロモーター

人工プロモーターのがん細胞特異的な活性はがん細胞特異的な E2F 活性に 起因する

がん細胞特異的な E2F の反応性エレメントを利用することで、人工プロモーターは既存のがん細胞特異的プロモーターよりもがん細胞で特異的に活性を示した。そこで、人工プロモーターのがん細胞特異的活性ががん細胞特異的な E2F 活性に起因するのかを調べた。そのために、がん細胞特異的な E2F 反応性配列に変異を加えた ERE73(1+2)mt、ERE73(3+4)mt と ARF(-13)を連結した変異型人工プロモーター (ERE73(1+2)mt-ARF(-13)、ERE73(3+4)mt-ARF(-13)) を作成し、野生型人工プロモーターとプロモーター活性を比較した。まずは、変異型人工プロモーターが、がん細胞特異的な E2F に対し反応性を失っているのかを E2F1, 2, 3a の過剰発現に対して反応性を示さないかで確認した。その結果、変異人工プロモーターは E2F1, 2, 3a の過剰発現に対して野生型人工プロモーターよりはるかに低い反応性を示し、ARF(-13)と同程度の反応性しか示さなかった(図 3-2-5)。このことから、変異人工プロモーターは予想通りがん細胞特異的な E2F に対して反応性を失っていることが確認できた。

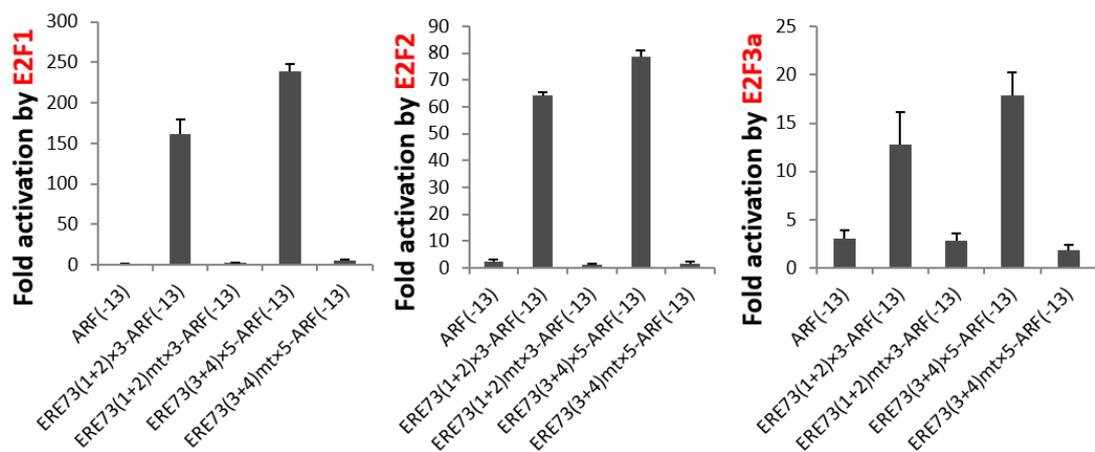


図 3-2-5. 変異型人工プロモーターは E2F1, 2, 3a の過剰発現に対してほとんど反応性を示さない

E2F1, 2, 3a の過剰発現に対する変異人工プロモーターの反応性を調べた。

E2F1, 2, 3a の発現ベクターとして、pENTR-E2F1 (80ng)、pENTR-E2FF2 (80ng)、pENTR-E2F3a (80ng) を用いた。インターナルコントロールには、pRL-CMV を用いた。

次に、正常細胞とがん細胞株で野生型人工プロモーターと変異型人工プロモーターのプロモーター活性を調べ、がん細胞特異性を比較した。その結果、正常細胞 (HFF) では野生型人工プロモーターは変異型人工プロモーターより低い活性を示さなかった。一方で、がん細胞 (5637、Saos-2、DLD-1、HLF) では、野生型人工プロモーターは変異型変異人工プロモーターより低い活性を示した(図 3-2-6)。

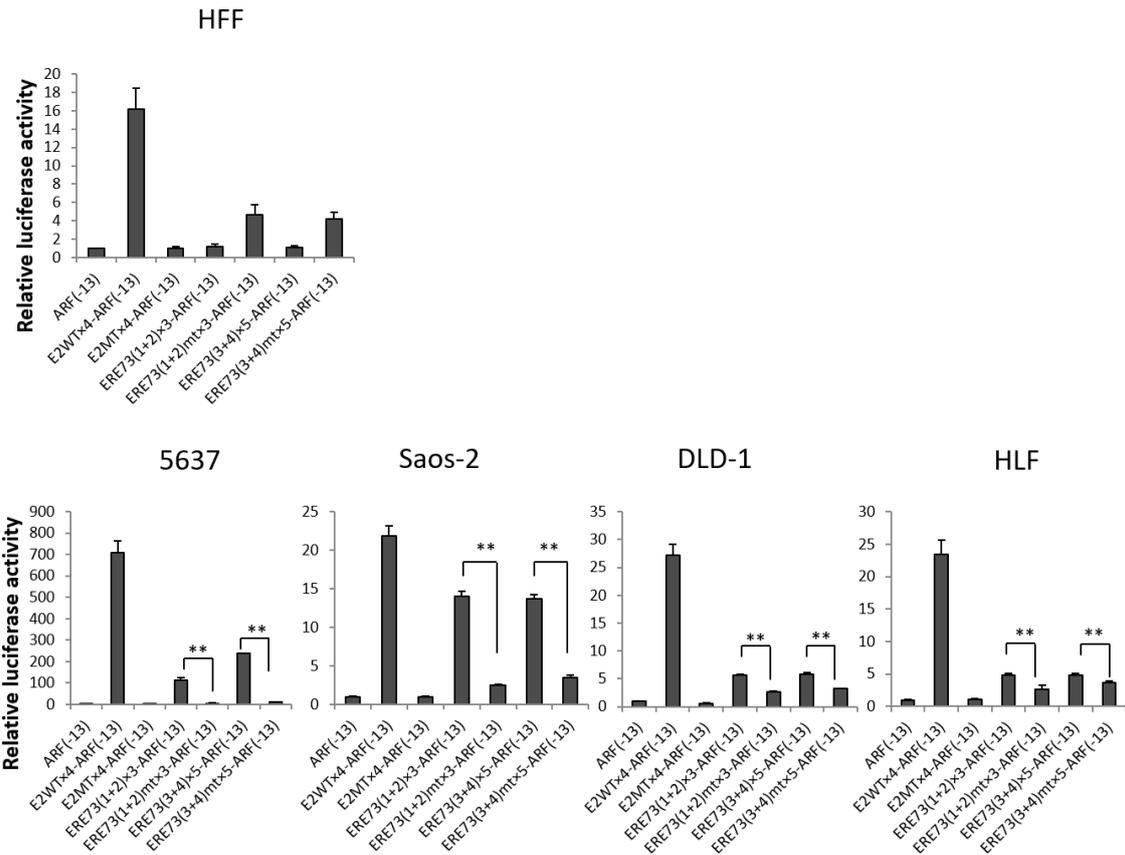


図 3-2-6. 人工プロモーターはがん細胞特異的な E2F の反応性エレメントに変異を加えることで、がん細胞で特異的にプロモーター活性が低下する野生型人工プロモーターと変異型人工プロモーターの活性を正常細胞 HFF とがん細胞株 5637、Saos-2、DLD-1、HLF を用いてレポーターアッセイで調べた。インターナルコントロールには、pRL-CMV を用いた。

** : P<0.01

また、がん細胞特異性を野生型人工プロモーターと変異型人工プロモーターとで比較したところ、変異型人工プロモーターの方がはるかに低いがん細胞特異性を示した(図 3-2-7)。また、変異型人工プロモーターは、ARF(-13)と同程度のがん細胞特異性を示した(図 3-2-7)。これらのことから、人工プロモーターは

がん細胞特異的な E2F に対する反応性消失に伴い、ARF(-13)と同程度までがん細胞特異性が低下することが明らかとなり、人工プロモーターの高いがん細胞特異性はがん細胞特異的な E2F の反応性配列に起因することが明らかとなった。従って、人工プロモーターのがん細胞特異的活性はがん細胞特異的な E2F 活性に起因することが強く示唆された。

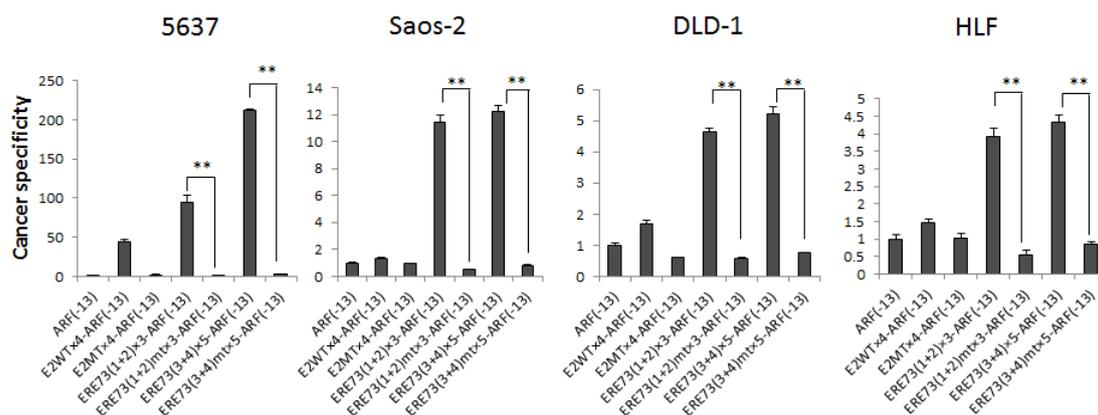


図 3-2-7. 人工プロモーターの高いがん細胞特異性はがん細胞特異的な E2F の反応性エレメントに変異を加えることで低下する

正常細胞として HFF を用いて、野生型人工プロモーターと変異型人工プロモーターのがん細胞特異性を調べた。がん細胞株として、5637、Saos-2、DLD-1、HLF を用いた。インターナルコントロールには、pRL-CMV を用いた。

** : P<0.01

さらに、人工プロモーターのがん細胞特異的活性ががん細胞特異的な E2F 活性に起因するのかを調べるために、正常細胞とがん細胞で pRB により E2F 活性を抑制することで、人工プロモーターのプロモーター活性ががん細胞で特異的に減弱するのかを調べた。pRB は CDK によるリン酸化部位に変異を加えた恒常的活性型 pRB である PSM.-7LP を用いた。この PSM.-7LP は野生型 pRB

より E2F 活性の抑制能が高いため、E2F の抑制に用いた。まず、正常細胞 HFF で調べたところ、予想通り人工プロモーターは PSM.-7LP の発現により活性が抑制されなかった(図 3-2-8)。また、生理的な E2F に反応性を示す E2WTx4-ARF(-13)は抑制され、生理的な E2F に反応性を失った E2MTx4-ARF(-13)は抑制されなかったことから(図 3-2-8)、本実験の条件下では PSM.-7LP の発現により E2F 活性を抑制できていると考えられる。したがって、正常細胞(HFF)では、pRB により E2F を抑制しても、人工プロモーターの活性は抑制されないことが明らかとなった。一方、がん細胞株 (5637、Saos-2、DLD-1、HLF) で調べたところ、人工プロモーターの活性は PSM.-7LP の発現により抑制された(図 3-2-8)。この時、E2F に対して反応性を示す E2WTx4-ARF(-13)は抑制され、E2F に対して反応性を失った E2MTx4-ARF(-13)は抑制されなかったことから(図 3-2-8)、本実験の条件下では PSM.-7LP の発現により E2F 活性を抑制できていると考えられる。このことから、pRB により E2F 活性を抑制することで、がん細胞で特異的に人工プロモーターのプロモーター活性が減弱することが明らかとなった。また、E2F 反応性配列に変異を加え、がん細胞特異的な E2F に対して反応性を失った変異人工プロモーターは PSM.-7LP の発現により抑制されなかった(図 3-2-8)。したがって、PSM.-7LP 発現による人工プロモーターのがん細胞特異的な活性の抑制は、がん細胞特異的な E2F 配列を介していることがわかり、がん細胞特異的な E2F を抑制したことによることも確認できた。以上の結果より、人工プロモーターのがん細胞特異的な活性はがん細胞特異的な E2F 活性に起因することが強く示唆された。したがって、がん細胞特異的な E2F 活性を活用することで、がん細胞特異的なプロモーターを作製できることが強く示唆された。したがって、がん細胞

胞特異的な E2F 活性はがん細胞特異的傷害法に活用しうる有用な活性であることが強く示唆された。

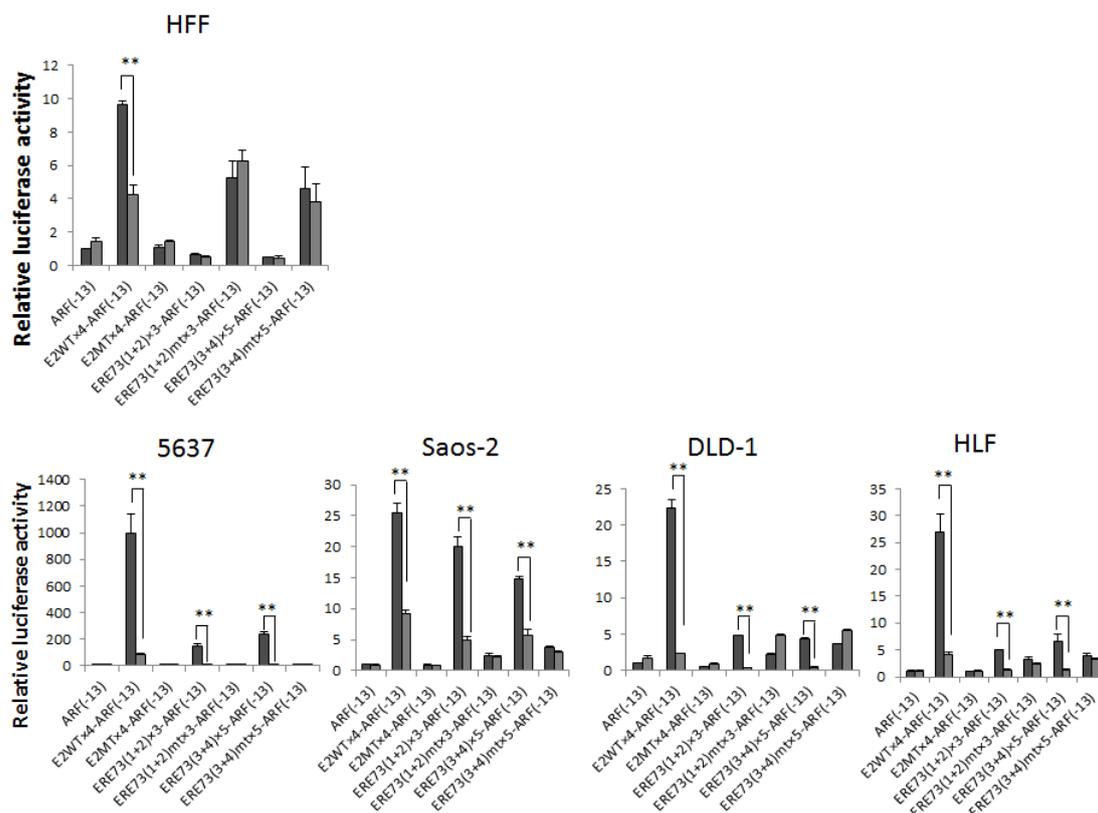


図 3-2-8. 人工プロモーターは PSM.7-LP の発現によりがん細胞で特異的に抑制される

恒常的活性化型 pRB である PSM.7-LP が野生型人工プロモーターと変異型人工プロモーターの活性に及ぼす影響を正常細胞 HFF とがん細胞株 5637、Saos-2、DLD-1、HLF を用いてレポーターアッセイで調べた。PSM.7-LP の発現ベクターは、pPSM.7-LP (HFF は 5 ng、がん細胞株は 1.7 ng) を用いた。インターナルコントロールには、pRL-CMV を用いた。

** : P<0.01

Ad-ERE73s-TK はがん細胞を特異的に傷害する

レポーターアッセイの結果から、人工プロモーターはがん細胞で特異的に活性を示し、そのがん細胞特異的活性はがん細胞特異的な E2F 活性に起因することが明らかとなった。がん細胞特異的な E2F 活性が、がん細胞特異的傷害法に有用な活性であるのかを調べるために、がん細胞特異的な E2F 活性によりがん細胞で特異的な人工プロモーターを用いることでがん細胞を特異的に傷害できるのかを検討した。それを検討するために、自殺遺伝子である *HSV-TK* (*Herpes simplex virus-thymidine kinase*) を人工プロモーターで発現制御した組換えアデノウイルス (Ad-ERE73(1+2)x3-TK および Ad-ERE73(3+4)x5-TK) を作製し、正常細胞およびがん細胞に対する傷害作用を比較した。HSV-TK は不活性型のガンシクロビルを活性型に代謝することで細胞傷害活性を示すため、これらの組換えアデノウイルスは細胞に感染させた後、ガンシクロビル存在下で培養を行った。ウイルスの細胞傷害作用は、アポトーシス細胞の指標である SubG1 期細胞の割合を基に判定した。細胞は正常細胞 HFF とがん細胞株 (5637、Saos-2、DLD-1、HLF) を用いた。

まず、Ad-ERE73(1+2)x3-TK と Ad-ERE73(3+4)x5-TK の正常細胞 HFF に対する細胞傷害作用を調べた。ネガティブコントロールとして、*HSV-TK* の発現を制御するプロモーターを欠失させた組換えアデノウイルス Ad-pless-TK を用いた。正常細胞 HFF で傷害作用を、Ad-ERE73(1+2)x3-TK と Ad-ERE73(3+4)x5-TK の感染力価 (multiplicity of infection: MOI) を振って調べた結果、Ad-ERE73(1+2)x3-TK と Ad-ERE73(3+4)x5-TK を感染させたサンプルはいずれも Ad-pless-TK を感染させたサンプルと同程度の SubG1 期細胞の割合を示した (図 3-2-9)。また、このとき、自殺遺伝子である *HSV-TK* を CMV プロモーターで発現制御した組換えアデノウイルス (Ad-CMV-TK) を感染させた

サンプルはおよそ 50%の SubG1 期細胞の割合を示しており、本実験条件下ではウイルスによる遺伝子導入は行われており、正常細胞を傷害しうる条件下であることが判明した。このことから、Ad-ERE73(1+2)x3-TK と Ad- ERE73(3+4)x5-TK は、人工プロモーターで *HSV-TK* を発現制御したため、正常細胞に対して傷害作用を示さないことが示唆された。

次に、Ad-ERE73(1+2)x3-TK と Ad-ERE73(3+4)x5-TK のがん細胞株に対する細胞傷害作用を調べた。がん細胞株では両プロモーターは正常細胞より強いプロモーター活性を示すため、より低い MOI で感染力価を振って感染させた。その結果、4 種類のがん細胞株で Ad-ERE73(1+2)x3-TK と Ad-ERE73(3+4)x5-TK を感染させたサンプルは Ad-pless-TK を感染させたサンプルより高い SubG1 期細胞の割合を示した (図 3-2-9)。以上の結果より、人工プロモーターで *HSV-TK* を発現制御することで、正常細胞を傷害せず、がん細胞を非常に特異的に傷害できる可能性が示唆された。

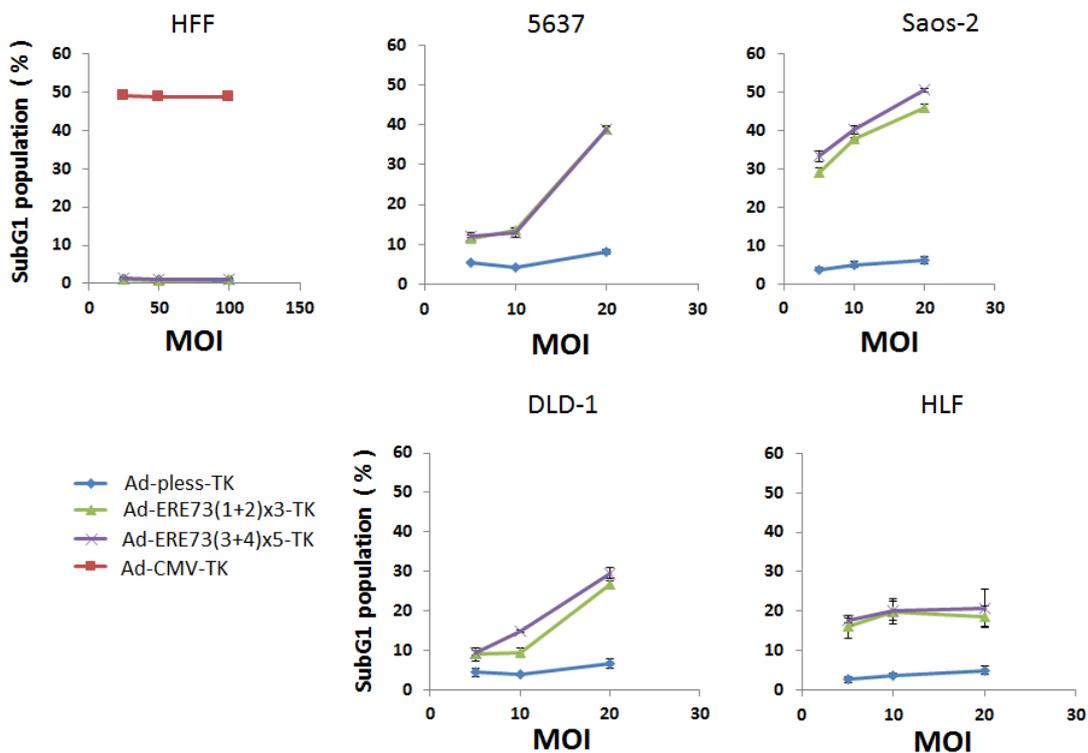


図 3-2-9. Ad-ERE73s-TK はがん細胞を特異的に傷害する

正常細胞 HFF は、ウイルスを MOI 25, 50, 100 で感染させた。がん細胞株 5637、Saos-2、DLD-1、HLF は MOI 5, 10, 20 で感染させた。その後、ガンシクロピル (GCV) 濃度 50 μ M の 10 %FCS 入り DMEM もしくは RPMI にて 5 日間培養し、細胞を回収した。

【考察】

第3章1節により ARF プロモーターは、E2F1 プロモーターよりがん細胞で特異的に活性を示し、がん細胞特異的傷害法に有用なプロモーターであることが明らかとなった。しかし、ARF プロモーターのがん細胞特異的な活性が、がん細胞特異的な E2F 活性に起因するのかは不明であり、その活性が、がん細胞特異的傷害法に有用な活性であるのかは不明であった。

そこで、がん細胞特異的な E2F 活性が、がん細胞特異的傷害法に有用な活性であるのかを調べるために、がん細胞で特異的に活性を示さない ARF コアプロモーター (ARF(-13)) にごん細胞特異的な E2F の反応性エレメントである ERE73(1+2)と ERE73(3+4)を複数コピー連結することで、細胞特異的 E2F に対して高い反応性を示すがん細胞で特異的な人工プロモーターを作製できるのかを検討した。その結果、正常細胞では人工プロモーター(ERE73(1+2)x3-ARF(-13)、ERE73(3+4)x5-ARF(-13))の活性は、ARF(-13)と同程度である一方で、がん細胞では ARF(-13)とよりはるかに高い活性を示した (図 3-2-2)。このことから、がん細胞特異的な E2F 反応性エレメントはがん細胞で特異的にプロモーター活性を向上させることが明らかとなった。また、がん細胞特異性を人工プロモーターと既存のがん細胞特異的なプロモーター ARF、E2F1、hTERT プロモーターとで比較すると、人工プロモーターは ARF、E2F1、hTERT プロモーターより高いがん細胞特異性を示すことが分かった(図 3-2-3)。また、人工プロモーターは ARF、E2F1、hTERT プロモーターよりも E2F1, 2, 3a の過剰発現やアデノウイルスのがん遺伝子産物 E1a の発現などのがん性変化に対して高い反応性を示した(図 3-2-4)。このことから、人工プロモーターは普遍的に ARF、E2F1、hTERT プロモーターよりもがん細胞で特異的に活性を示すことが示唆された。従って、がん細胞特異的な E2F 反応性エレメントはがん細胞

でのみプロモーター活性を非常に向上させることができるがん細胞特異的アプローチに有用なエレメントであることが示唆された。また、がん細胞特異的な E2F 反応性エレメントに変異を加えて E2F に対する反応性を消失させると、人工プロモーターのがん細胞特異性がコアプロモーター ARF(-13)と同程度まで低下した(図 3-2-7)。さらに、恒常的活性型 pRB の発現により E2F 活性を抑制すると、人工プロモーターのプロモーター活性はがん細胞で特異的に減弱した(図 3-2-8)。これらのことから、人工プロモーターのがん細胞特異的な活性はがん細胞特異的な E2F 活性に起因することが強く示唆され、がん細胞特異的な E2F 活性を活用することで、非常にがん細胞で特異的なプロモーターを作成できることが強く示唆された。したがって、がん細胞特異的な E2F 活性は自殺遺伝子療法やウイルス療法といったプロモーターを用いたアプローチに活用できる有用な活性であることが示唆された。実際に、がん細胞特異的な E2F によりがん細胞で特異的な人工プロモーターで自殺遺伝子である *HSV-TK* を発現制御した組換えアデノウイルス(Ad-ERE73(1+2)x3-TK および Ad-ERE73(3+4)x5-TK)は正常細胞を傷害せず、がん細胞のみを傷害した(図 3-2-9)。したがって、がん細胞特異的な E2F 活性は自殺遺伝子療法やウイルス療法に有用な活性であると考えられる。その可能性をさらに検討するためにも、皮下腫瘍マウスなどの腫瘍マウスモデルを用いて、*in vivo* における Ad-ERE73(1+2)x3-TK および Ad-ERE73(3+4)x5-TK の抗腫瘍効果および副作用に対する影響を調べることは重要である。

がん研究において、がん組織と正常組織を識別する染色法の開発も重要な課題となっている。これは、外科的治療時、がん組織と正常組織を目視で識別してがん組織を除去するため、がん組織を完全に除去することが難しいためである。もしこのような方法が開発できれば、外科的にがん組織を完全に除去でき

る確率が上がり、より手術成功率を高めることができると予想される。そのがん組織特異的な染色法として、人工プロモーターで RFP などの蛍光タンパクを発現制御した組換えアデノウイルスを用いたアプローチが有用であるのかもしれない。人工プロモーターはがん細胞特異的な E2F 活性によりがん細胞で非常に特異的に活性を示すため、人工プロモーターで蛍光タンパクを発現制御することで、蛍光タンパクをがん細胞で特異的に発現させることができ、がん組織と正常組織を染め分けできると予想される。また、人工プロモーターで蛍光タンパク質だけでなく、自殺遺伝子やウイルス複製に必要な遺伝子を発現制御したアデノウイルスは、がん組織の染め分けだけでなく、がん治療も行えるため、非常に有用なウイルスであると考えられる。外科的治療によるがん組織の除去の前にはがん組織周辺に投与すれば、がん組織と正常組織を染め分けするだけでなく、がん組織を小さくすることもできる。また、術後に投与すれば、がん組織の除去を確認確認することができ、さらに除去できなかった小さながん組織を除去できる可能性がある。このように、がん細胞特異的な E2F 活性は、がん治療だけでなく、がん組織と正常組織との染め分けにも活用しうる有用な活性であると予想される。

現在、がん細胞特異的な E2F 活性がどのようなメカニズムにより生じているか不明であるため、がん細胞特異的な E2F 活性を利用したがん細胞特異的アプローチがすべてのがん細胞に対して有用であるかは断言できない。しかし、すべてのがん細胞で RB 経路に異常が生じていることが示唆されており、また正常細胞に RB 経路の異常を生じさせることでがん抑制遺伝子を発現誘導するがん細胞で特異的な E2F 活性が生じることが示唆されている。さらに、調べた限りすべてのがん細胞は、そのような E2F 活性を保持していた。これらのことから、すべてのがん細胞でがん抑制遺伝子を発現誘導するがん細胞で特異的な E2F 活

性が生じている可能性が示唆され、がん細胞で特異的な **E2F** 活性を利用したがん細胞特異的アプローチがすべてのがん細胞に対して有用であることが期待される。

第3節 PI3K 経路ががん性変化特異的な E2F 活性に及ぼす影響の解析

第3章1および2節より、がん抑制遺伝子を活性化する E2F 活性はがん細胞にのみに存在し、がん細胞特異的傷害法に有用な活性であることが明らかとなった。しかし、そのがん細胞特異的な E2F 活性がいかに制御されているかは不明である。がん細胞特異的な E2F 活性を活用した傷害法の改善策を開発するためには、その E2F 活性の制御機構を解明することは重要である。

PI3K 経路は増殖刺激によって活性化され、特にアポトーシス誘導を抑制することで細胞増殖促進に貢献する。一般的に、増殖刺激により増殖関連遺伝子だけでなく、アポトーシス誘導を行うがん抑制遺伝子も発現誘導されることが知られている(70)。増殖刺激により活性化された PI3K 経路はアポトースを阻害することから、増殖刺激による PI3K 経路の活性化が増殖刺激によるアポトーシス誘導を阻害し、細胞がアポトーシス誘導されず増殖できると考えられている。PI3K 経路はその経路の主要因子 Akt/PKB を介して、アポトーシス誘導を抑制する。Akt/PKB は p53 をユビキチン化し分解促進する HDM2 をリン酸化により核への移行を促進する(75,76)。これにより、p53 は不安定化し p53 によるアポトーシス関連遺伝子の発現誘導が阻害され、アポトーシスが起こりにくくなる。その他に、Akt/PKB はミトコンドリアからのシトクローム C の放出を促進する Bad をリン酸化することで、Bad の細胞質からミトコンドリアへの移行を阻害する(77)。さらに、Akt/PKB はカスパーゼ阻害因子である XIAP をリン酸化して安定化を行うだけでなく、カスパーゼ 9 をリン酸化して活性型になるためのカスパーゼの部分的な切断を阻害することで、カスパーゼの活性化を阻害する(78,79)。このように、Akt/PKB は様々な因子をリン酸化することでアポトーシス誘導を阻害する。また、E2F1 過剰発現によるアポトーシス誘導が増殖刺

激によって阻害されることが明らかとなり、さらに E2F1 過剰発現による一部のアポトーシス関連遺伝子(*Nr4a3* (*nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3*), *AMPKα2* (*AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-2*), *Cyp26b1* (*Cytochrome P450 26B1*))の発現誘導は増殖刺激によって活性化された PI3K 経路により阻害されるということが報告された(70) (図 3-3-1)。このことから、PI3K 経路はがん性変化特異的ながん抑制遺伝子を発現誘導する E2F 活性を抑制することが示唆された。もしそうであるのなら、PI3K 経路を阻害することで ARF プロモーターの傷害法を改善できると考えられる。ただし、E2F1 過剰発現により発現誘導され、PI3K 経路によってそれが阻害されるアポトーシス関連遺伝子には、がん性変化特異的な E2F により活性化される *ARF* や *Bim* などは含まれていない。また、そのような制御を受けるアポトーシス関連遺伝子はアポトーシス誘導における重要性はあまり知られおらず、E2F1 過剰発現により発現誘導される遺伝子としてもあまり知られていない。このことから、これらのアポトーシス関連遺伝子は E2F1 によるがん化抑制における貢献度は高くないと考えられる。したがって、PI3K 経路はがん化抑制に重要ながん性変化特異的な E2F 活性を抑制していない可能性もある。そこで、PI3K 経路が、がん性変化特異的な E2F 活性に及ぼす影響を調べるために、PI3K 経路が E2F1 過剰発現による *ARF*、*Bim* の発現誘導に及ぼす影響を調べた(図 3-3-1)。

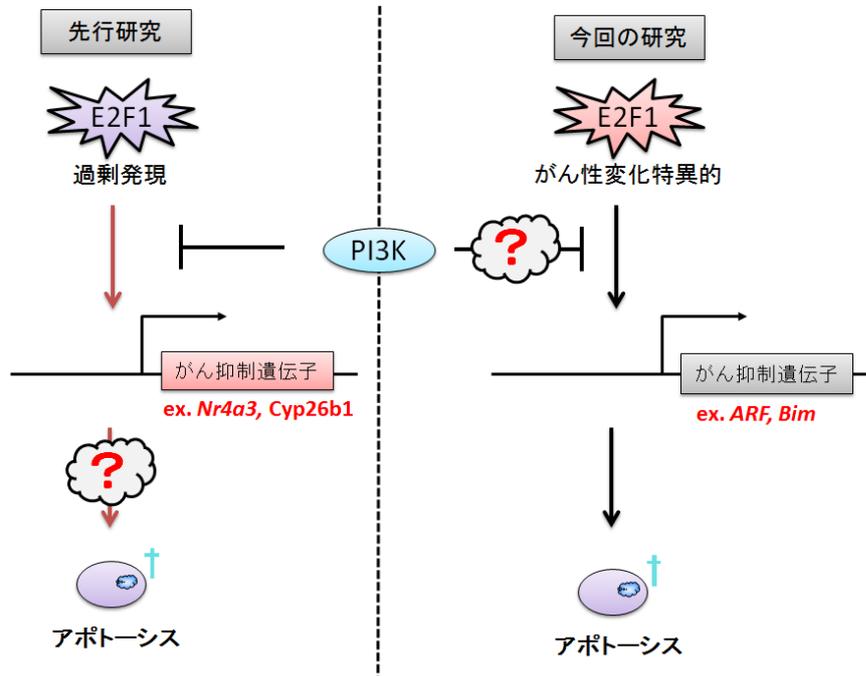


図 3-3-1. 先行研究と今回の研究の違い

先行研究では、PI3K が E2F によるがん抑制遺伝子の発現誘導に及ぼす影響を *Nr4a3*、*AMPKα2*、*Cyp26b1* などのがん抑制遺伝子を用いて検討したが、本研究では、PI3K が、がん性変化特異的な E2F によるがん抑制遺伝子の発現誘導に及ぼす影響を *ARF*、*Bim* を用いて検討した。

増殖刺激によって活性化された PI3K は E2F1 過剰発現による *ARF*、*Bim* 遺伝子およびプロモーターの活性化を抑制しない

PI3K 経路が、がん細胞特異的な E2F 活性に及ぼす影響を調べるために、増殖刺激により活性化された PI3K 経路が E2F1 過剰発現による *ARF*、*Bim* 遺伝子の発現誘導を阻害するのかを qRT-PCR を用いて検討した。細胞はヒト正常線維芽細胞 HFF を用いた。その結果、増殖刺激により、E2F1 過剰発現による *ARF*、*Bim* の発現誘導は減弱しなかった(図 3-3-2)。また、この時、PI3K 経路に活性化に伴い生じる Akt のセリン 473 のリン酸化が、増殖刺激により亢進していることが確認できており、増殖刺激による PI3K 経路は活性化されていると考えられる(図 3-3-2)。このことから、増殖刺激により活性化された PI3K 経路が E2F1 過剰発現による *ARF*、*Bim* の発現誘導を阻害しないことが強く示唆された。

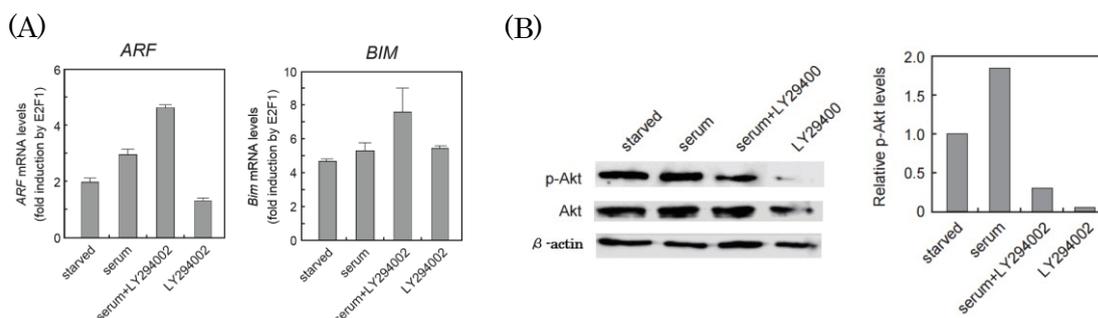


図 3-3-2. 増殖刺激によって活性化された PI3K は E2F1 過剰発現による *ARF*、*Bim* 遺伝子の発現誘導を阻害しない

(A) 増殖刺激が E2F1 過剰発現による *ARF*、*Bim* の発現誘導に及ぼす影響を qRT-PCR を用いて検討した。HFF 細胞を撒いてから、24 時間後に PBS にて細胞を洗浄した後、培地を 0.1% FCS 加 DMEM に換え、48 時間培養し細胞を休止期に同調した。その後、Ad-Con または Ad-E2F1 を MOI 200 で感染させた。その後に血清刺激を加えるサンプルは、FCS を培地中で 20% になるように加えて、PI3K 阻害剤を加えるサンプルは、血清を加えた培地にさらに

LY294002 を 25 μ M となるように加えて培養した。それから 24 時間後に細胞細胞を回収した。インターナルコントロールには、*18SrRNA* 遺伝子を用いた。

(B) Akt が増殖刺激によりリン酸化が亢進するのかをウェスタンブロッティング法を用いて調べた。細胞を撒いてから、24 時間後に PBS にて細胞を洗浄した後、培地を 0.1% FCS 加 DMEM に換え、48 時間培養し細胞を休止期に同調した。その後、Ad-Con を MOI 200 で感染させ、その 24 時間後に PI3K 阻害剤を加えサンプルには LY294002 を 25 μ M となるように加え、血清刺激を加えるサンプルに FCS を培地中で 20% になるように加えて培養し、その後、5 分後にサンプルを回収した。 β -actin はインターナルコントロールとして用いた。リン酸化 Akt のバンドを定量化し β -actin で補正したものをグラフ化した。

また、増殖刺激により活性化された PI3K 経路が E2F1 過剰発現による ARF、Bim プロモーターの活性化を阻害するのかをレポーターアッセイを用いて検討した。その結果、増殖刺激により、E2F1 過剰発現による ARF、Bim プロモーターの活性化は減弱しなかった(図 3-3-3)。また、この時、PI3K 経路の下流である NF- κ B のが活性化されていることは、NF- κ B レポーターの活性化で確認できており、増殖刺激による PI3K 経路は活性化されていると考えられる(図 3-3-3)。したがって、増殖刺激により活性化された PI3K 経路は E2F1 過剰発現による ARF、Bim の発現誘導を阻害しないことが強く示唆された。PI3K 経路はがん性変化特異的な E2F 活性に影響を及ぼさないことが示唆された。

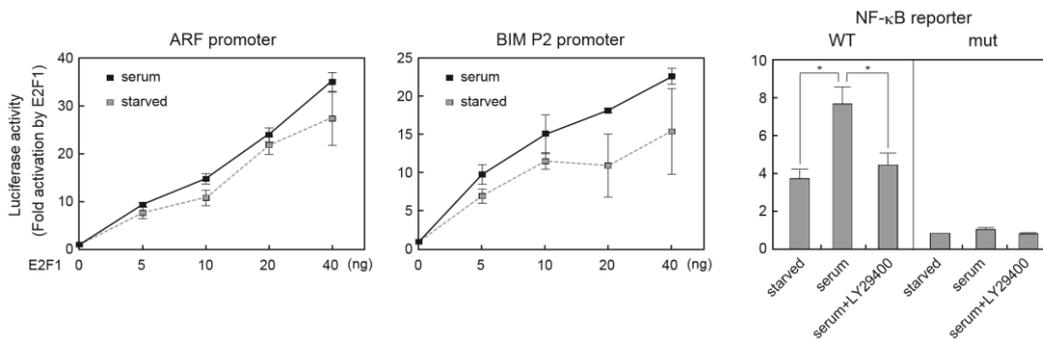


図 3-3-3. 増殖刺激によって活性化された PI3K は E2F1 過剰発現による

ARF、Bim プロモーターの活性化を抑制しない

血清刺激が E2F1 過剰発現による ARF、Bim プロモーターの活性化に及ぼす影響を調べた。ヒト正常細胞 HFF に遺伝子導入してから 24 時間後に PBS にて細胞を洗浄し、培地を 0.1% FCS 加 DMEM に換え後、30 時間培養した。血清刺激を加えてから 18 時間後に細胞を回収した。インターナルコントロールには、 β -galactosidase を恒常的なプロモーター活性を示す elongation factor-1 (EF1) プロモーターで発現制御する pEF1-LacZ を用いた。PI3K 経路が活性化されているかどうかをモニターする陽性コントロールとして NF- κ B 活性をモニターする NF- κ B-Luc、および陰性コントロールとして NF- κ B の結合配列に変異を入れた NF- κ B mut-Luc を用いた。

* : P<0.01

・ 恒常的活性型 Akt (gagPKB) は E2F1 過剰発現による ARF、Bim 遺伝子およびプロモーターの活性化を阻害しない

PI3K 経路が、がん性変化特異的な E2F 活性に及ぼすか否かをさらに調べるために、PI3K 経路の主要制御因子である Akt の過剰発現が E2F1 による ARF、Bim の発現誘導を阻害するのかを qRT-PCR を用いて検討した。Akt として恒常的活性型 Akt である gagPKB を用いた。Akt は増殖刺激に伴い、膜へ移行し

活性化される。Akt 上流に付加したレトロウイルス由来の group specific antigen (gag) 配列は増殖刺激有無に関わらず、膜への移行を促進する。そのため、gagPKB は恒常的に膜へ移行し、恒常的に活性化される。細胞はヒト正常線維芽細胞 HFF を用いた。その結果、gagPKB の発現により、E2F1 過剰発現による *ARF*、*Bim* の発現誘導は減弱しなかった (図 3-3-4A)。また、この時、gagPKB は活性化の指標であるセリン 473 がリン酸化されており、活性型であることが確認できている (図 3-3-5B)。このことから、gagPKB は E2F1 過剰発現による *ARF*、*Bim* の発現誘導を阻害しないことが強く示唆された。

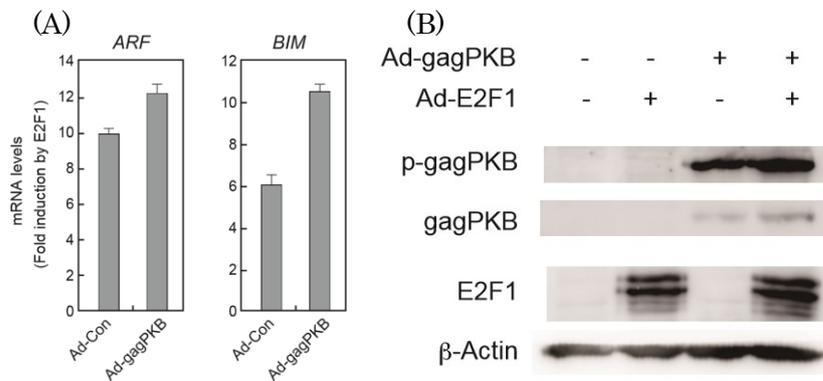


図 3-3-4. 恒常的活性型 Akt (gagPKB) は E2F1 過剰発現による *ARF*、*Bim* 遺伝子の発現誘導を阻害しない

(A) gagPKB が E2F1 による *ARF*、*Bim* の発現誘導に及ぼす影響を qRT-PCR で調べた。HFF 細胞を撒いてから、24 時間後に培地を 0.1%FCS 加 DMEM に換え、血清飢餓状態で 48 時間培養し細胞を休止期に同調した。その後、Ad-Con もしくは Ad-E2F1 を MOI 200 で感染させ、同時に Ad-Con、Ad-gag-Akt を MOI 100 で感染させた。その 24 時間後にサンプルを回収した。

(B) gag-PKB のリン酸化をウェスタンブロッティング法を用いて調べた。(A) と同様なタイムスケジュールでサンプルを回収した。

また、gagPKB の発現が E2F1 過剰発現による ARF、Bim プロモーターの活性化を阻害するのかをレポーターアッセイを用いて検討した。その結果、gagPKB の発現により E2F1 による ARF、Bim プロモーターの活性化は減弱しなかった (図 3-3-5)。また、この時、Akt/PKB の下流である NF-κB が活性化されていることは、NF-κB レポーターの活性化から確認できており、gagPKB は機能していると考えられる (図 3-3-5)。これらのことから、gag-PKB の発現は E2F1 過剰発現による *ARF*、*Bim* 遺伝子の発現誘導を阻害しないことが強く示唆された。以上の結果より、PI3K 経路はがん性変化特異的な E2F 活性を抑制していないことが強く示唆された。

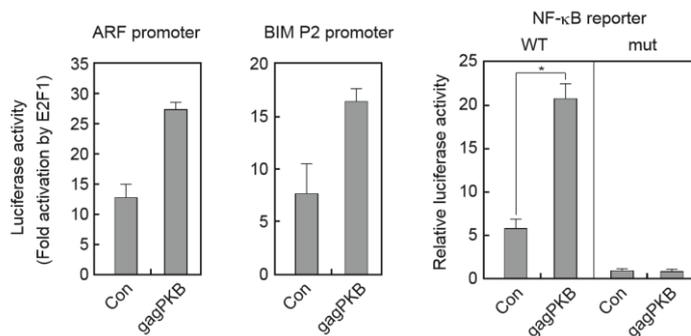


図 3-3-5. 恒常的活性型 Akt (gag-PKB) は E2F1 過剰発現による ARF、Bim プロモーターの活性化を阻害しない

活性化型 Akt の過剰発現が E2F1 の過剰発現による ARF、Bim プロモーターの活性化に及ぼす影響を調べた。遺伝子導入から 24 時間後に PBS にて細胞を洗浄し、培地を 0.1% FCS 加 DMEM に換え、48 時間培養してサンプルを回収した。インターナルコントロールには、β-galactosidase を恒常的なプロモーター活性を示す elongation factor-1 (EF1) プロモーターで発現制御する pEF1-LacZ を用いた。

*: P<0.01

【考察】

PI3K 経路は増殖刺激によって活性化され、特にアポトーシス誘導を抑制することで細胞増殖促進に貢献する。E2F1 過剰発現による一部のアポトーシス関連遺伝子の発現誘導は増殖刺激によって活性化された PI3K 経路により阻害されるということが報告された(70)。このことから、PI3K 経路はがん性変化特異的な E2F によるがん抑制遺伝子の活性化を阻害することが示唆された。ただし、E2F1 過剰発現により発現誘導され、PI3K 経路によってそれが阻害されるアポトーシス関連遺伝子には、がん性変化特異的な E2F によって発現誘導される *ARF* や *Bim* などは含まれていない。また、そのような制御を受けるアポトーシス関連遺伝子はアポトーシス誘導における重要性はあまり知られおらず、E2F1 過剰発現により発現誘導される遺伝子としてもあまり知られていない。このことから、これらのがん抑制遺伝子は E2F1 によるがん化抑制における貢献度は高くない可能性も考えられる。したがって、PI3K 経路はがん化抑制に重要ながん性変化特異的な E2F 活性を抑制していない可能性もある。そこで、PI3K 経路が、がん細胞特異的な E2F 活性に及ぼす影響を調べるために、PI3K 経路が E2F1 過剰発現による *ARF*、*Bim* の発現誘導に及ぼす影響を調べた。細胞はヒト正常線維芽細胞 HFF を用いた。

その結果、増殖刺激によって活性化された PI3K と恒常的活性型 Akt (gag-PKB) は E2F1 過剰発現による *ARF*、*Bim* 遺伝子の発現誘導およびプロモーターの活性化を阻害しなかった。このことから、ヒト正常線維芽細胞 HFF では、PI3K 経路はがん性変化時的な E2F 活性を抑制しないことが示唆された。

先行研究において、E2F1 過剰発現によるアポトーシス関連遺伝子(*Nr4a3*、*AMPKα2*、*Cyp26b1*)の発現誘導は増殖刺激によって活性化された PI3K 経路により阻害された。ただし、*Nr4a3*、*AMPKα2*、*Cyp26b1* プロモーターには E2F1

の結合は確認されておらず、それらは E2F1 の直接の標的でない可能性がある。

一方、*ARF*、*Bim* 遺伝子は E2F1 の直接の標的のアポトーシス関連遺伝子であるが、PI3K 経路は E2F1 過剰発現による *ARF*、*Bim* 遺伝子を抑制しなかった。

したがって、「E2F1 過剰発現によるアポトーシス関連遺伝子(*Nr4a3*、*AMPKα2*、*Cyp26b1*)の発現誘導が増殖刺激によって活性化された PI3K 経路により阻害される」という現象は、PI3K 経路が E2F1 の活性を抑制したのではなくて、E2F1 によって発現誘導された因子を抑制したことによる間接的な影響によると考えられる。また、仮に PI3K が E2F1 活性を直接抑制していたならば、今回の研究成果と相反するような結果と思われるが、この原因としては実験に使用した細胞の生物種の違いが考えられる。先行研究では、ラット由来の REF52 細胞を用い、今回はヒト正常線維芽細胞 HFF を用い、使用した細胞の生物種が異なる。

この生物種の違いが相反する結果の原因になると考えられる。E2F によるがん化抑制遺伝子の活性化はがん化抑制において重要である。がん化抑制機構に生物種間で違いがあり、がん化抑制能に違いがあることが一般的に知られている。細胞の齧歯類の細胞は遺伝子導入せずに培養しているだけで不死化するが、ヒトの細胞は遺伝子導入せずに不死化することはほとんどない。現在のところ、その不死化の起こりやすさの違い原因としては、細胞が保持するテロメラーゼ活性の違いであると考えられている。ヒトの線維芽細胞は、テロメラーゼ活性を保持していないが、齧歯類の細胞はテロメラーゼを保持しており染色体末端に存在するテロメアがヒトの細胞より長い。また、マウスの線維芽細胞に SV40 largeT 抗原と Ras を導入することで腫瘍化するが、ヒトの線維芽細胞は SV40 largeT 抗原と Ras に加え、hTERT を導入しテロメラーゼ活性を生じさせても腫瘍化しないことから、テロメラーゼ活性の有無以外に生物種間でがん化抑制機構やがん化抑制能に違いがある(80)。このように生物種間でがん化抑制機構

に違いがあるため、本研究結果が先行研究と相反する結果となった可能性がある。今回の研究により、ヒトの細胞において **E2F1** によるアポトーシス関連遺伝子の発現誘導は **PI3K** 経路により阻害されないことが明らかとなったが、これは、ヒトはラットより世代時間が長くがん化する可能性が高いため、**E2F** によるアポトーシス関連遺伝子の発現誘導がより阻害されにくくなっているためであると考えられる。このように生物種により制御機構に違いがあることもあるので、生物種を意識して細胞種を選択していくことは重要である。

第4節 Cyclin/CDK 複合体ががん細胞特異的な E2F 活性に及ぼす影響の解析

CDK (cyclin dependent kinase) はサイクリンの結合がキナーゼ活性に必須なキナーゼ群であり、セリン/スレオニンキナーゼに分類される。ヒトでは、少なくとも、CDK は 20 種類 (81)、cyclin は 11 種類が同定されている(82)。そのうち、CDK は 1, 2, 4, 6 が、Cyclin は A, B, D, E が細胞周期に直接関与しており、いずれの Cyclin/CDK も細胞周期進行に貢献する(83)。

CDK 活性は、細胞周期の移行に伴い、主に Cyclin の発現が変動することで調節されている。Cyclin B は G2 期、M 期以降時に発現誘導され、CDK1 と複合体を形成することで M 期進行を促進する。一方、Cyclin D は G1 期初期、Cyclin E は G1-S 期以降時、Cyclin A は S 期以降時に発現誘導され、主に Cyclin D は CDK4, 6、Cyclin E は CDK2、Cyclin A は CDK2 と複合体を形成し、E2F 活性を制御することで細胞周期進行に貢献する(図 3-4-1)。

CyclinB/CDK1 は核膜を形成する核ラミナをリン酸化して、核膜の崩壊を誘導して、前中期移行を誘導する。

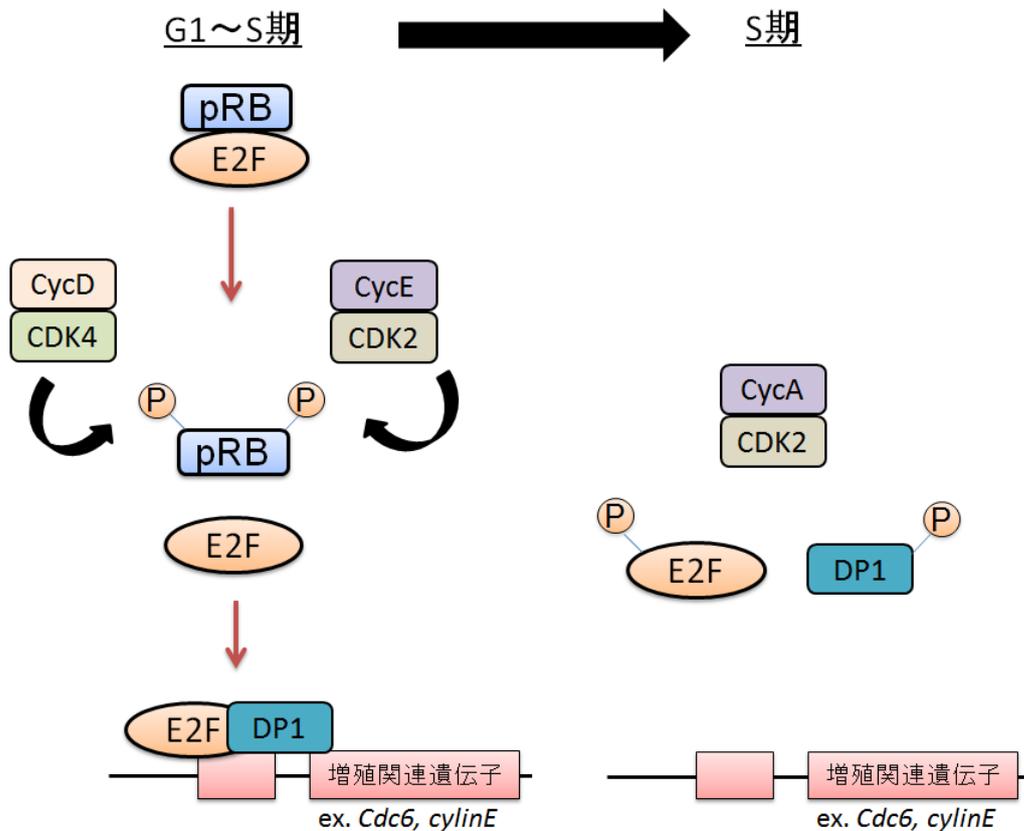


図 3-4-1. Cyclin/CDK 複合体による E2F 活性制御機構

Cyclin D/CDK4 および Cyclin E/CDK2 は pRB を不活性化して、E2F 活性を亢進するが、Cyclin A/CDK2 は E2F もしくは DP1 をリン酸化して、E2F 活性を減弱させる。

Cyclin D は増殖刺激に応答して発現誘導され、CDK4 と複合体を形成し、RB の初期のリン酸化を行う。これにより、RB による E2F の抑制能は低下し、細胞周期進行が促進される。Cyclin E/CDK2 は Cyclin D/CDK4,6 とは異なる RB のセリン/スレオニン残基をリン酸化し、RB をさらに不活性化する。これにより、E2F による増殖関連遺伝子の発現誘導がさらに亢進し、G1 期から S 期への移行が促進される。Cyclin A/CDK2 は S 期以降に活性化され、E2F1 もしくは DP1 をリン酸化する。これにより E2F1 と標的プロモーターとの親和性は低下

し、E2F 活性が低下する。この E2F 活性の低下により、E2F 標的の DNA 複製関連遺伝子の発現が低下し、S 期が終結する。このように、Cyclin/CDK 複合体が E2F による増殖関連遺伝子の発現誘導に及ぼす影響は明らかとなっているが、E2F によるがん抑制遺伝子の発現誘導に及ぼす影響はほとんど明らかになっていない。

薬剤性の CDK インヒビターである Flavopiridol は CDK1, 2, 4, 7 など様々な CDK を抑制する汎 CDK インヒビターである。Flavopiridol はがん細胞をアポトーシスに誘導することで、抗がん作用を示すことが明らかとなっている(84,85)。近年、Flavopiridol によるがん細胞のアポトーシス誘導は、E2F1 のノックダウンにより減弱することが報告された(58)。このことから、Cyclin/CDK 複合体はがん細胞特異的に存在するがん抑制遺伝子を発現誘導する E2F 活性を抑制しており、CDK 活性を抑制することでその E2F 活性が増強し、アポトーシスが誘導される可能性が示唆された。もしそうであるのなら、CDK インヒビターにより CDK 活性を抑制することで、がん細胞特異的な E2F 活性を増強することができ、ARF プロモーターを用いたがん細胞特異的傷害法を改善できると予想される。そこで、CDK インヒビターにより CDK 活性を抑制することで E2F 活性を増強することができ、ARF プロモーターを用いたがん細胞特異的傷害法を改善できるのかを検討した(図 3-4-2)。

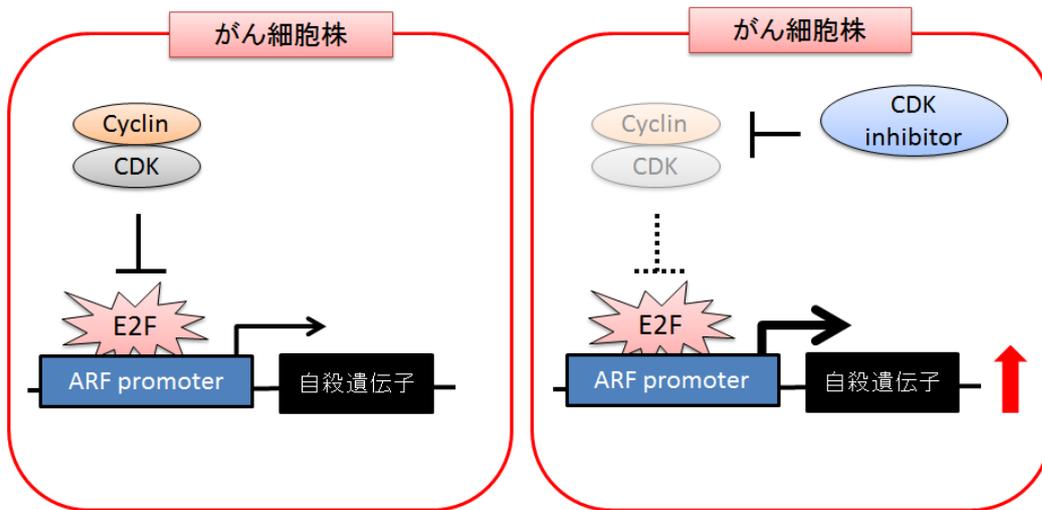


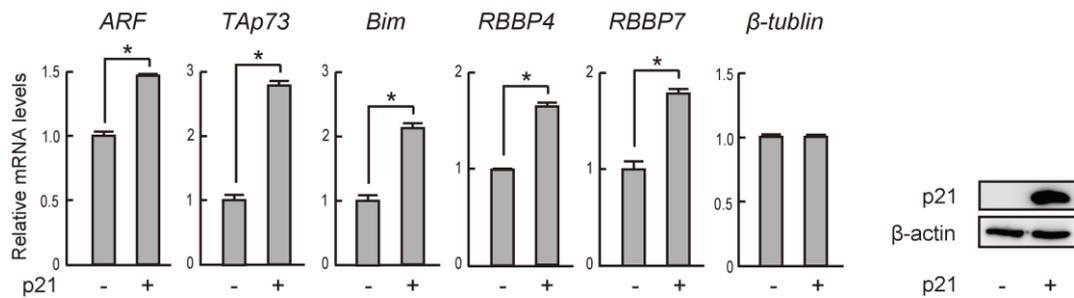
図 3-4-2. ARF プロモーターを用いたがん細胞特異的傷害法の改善策の候補

CDK インヒビターにより Cyclin/CDK 複合体を抑制することで、がん細胞特異的な E2F 活性を亢進させ、ARF プロモーターを用いたがん細胞特異的傷害法を改善できる可能性がある。

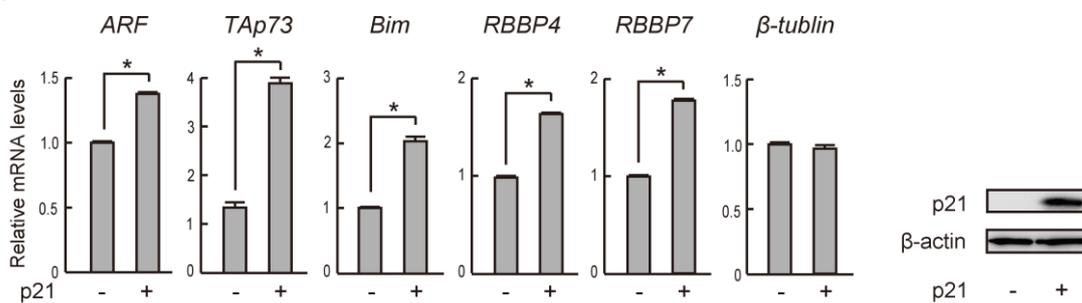
・ CDK インヒビター p21^{Cip1} の過剰発現はがん細胞で特異的な E2F の標的であるがん抑制遺伝子の発現をがん細胞でのみ亢進する

一般的に、薬剤性の阻害剤は特異性が低いとされている。そこで、CDK インヒビターが、がん細胞特異的な E2F 活性に及ぼす影響は、薬剤性の CDK インヒビターではなく、ヒトの細胞が保持するタンパク質性の CDK インヒビターである p21^{Cip1} の過剰発現で調べた。まずは p21^{Cip1} の過剰発現が、がん抑制遺伝子を発現誘導するがん細胞特異的な E2F 活性に及ぼす影響を調べるために、p21^{Cip1} 過剰発現が、がん細胞で特異的な E2F の標的であるがん抑制遺伝子に及ぼす影響をがん細胞と正常細胞で調べた。がん細胞として Saos-2、5637 を用い、正常細胞としてヒト正常線維芽細胞 HFF を用いた。遺伝子発現は qRT-PCR 法で定量した。がん細胞株 5637、Saos-2 において p21^{Cip1} が、がん細胞特異的な E2F 標的であるがん抑制遺伝子 (*ARF*, *TAp73*, *Bim*, *RBBP4*, *RBBP7*) に及ぼす影響を調べたところ、5637、Saos-2 では p21^{Cip1} 過剰発現は *ARF*, *TAp73*, *Bim*, *RBBP4*, *RBBP7* 遺伝子の発現が上昇した(図 3-4-3)。一方で、正常細胞 HFF では、p21^{Cip1} 過剰発現は *ARF*, *TAp73*, *Bim*, *RBBP4*, *RBBP7* 遺伝子の発現を亢進しなかった。むしろ発現の低下が認められた(図 3-4-3)。このことから、p21^{Cip1} の過剰発現は、がん細胞特異的な E2F の標的であるがん抑制遺伝子の発現をがん細胞で特異的に亢進することが明らかとなった。

(A) 5637



(B) Saos-2



(C) HFF

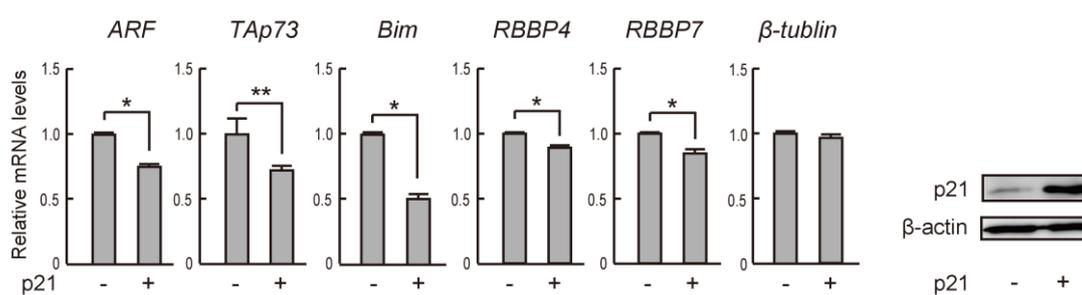


図 3-4-3. p21^{Cip1} の過剰発現はがん細胞で特異的な E2F の標的であるがん抑制遺伝子の発現をがん細胞でのみ亢進する

がん細胞株 (5637, Saos-2)、正常細胞 (HFF) に、撒いてから 24 時間後に Ad-Con、Ad-p21^{Cip1} をそれぞれ MOI 100 で感染させた。感染後、24 時間培養し細胞を回収した。

* : P < 0.01 ** : P < 0.05

次に、p21^{Cip1} の過剰発現が、がん細胞特異的な E2F の標的プロモーターに及ぼす影響をレポーターアッセイで調べた。がん細胞として Saos-2、5637 を用い、正常細胞としてヒト正常線維芽細胞 HFF を用いた。がん細胞特異的な E2F の標的プロモーターとして、ARF、TAp73 プロモーターを用いた。その結果、がん細胞株 (Saos-2, 5637) では、p21^{Cip1} の過剰発現は ARF、TAp73 プロモーターを活性化した(図 3-4-4)。一方で、正常細胞 HFF では p21^{Cip1} 過剰発現により ARF、TAp73 プロモーターの活性化は確認できなかった(図 3-4-4)。むしろ抑制した。このことから、p21^{Cip1} の過剰発現は ARF、TAp73 プロモーターをがん細胞のみで活性化することが分かった。これらのことから、p21^{Cip1} の過剰発現はがん細胞特異的な E2F の標的遺伝子を、がん細胞でのみ転写レベルで発現誘導することが分かった。したがって、p21^{Cip1} はがん細胞特異的な E2F 活性を増強する可能性が示唆された。

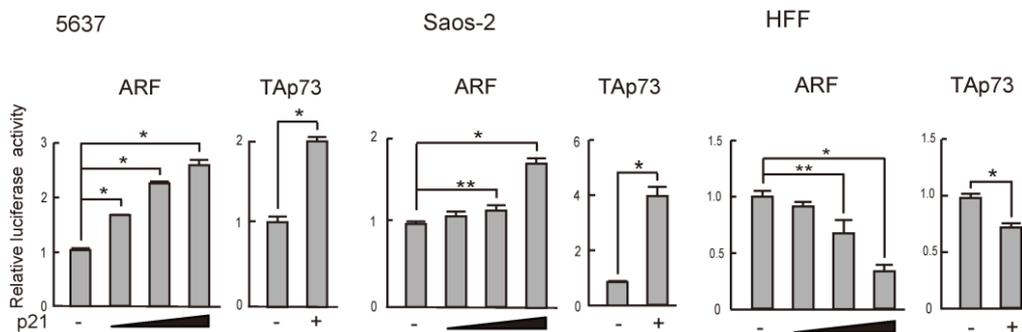


図 3-4-4. p21^{Cip1} の過剰発現はがん細胞で特異的に ARF、TAp73 プロモーターを活性化する

p21^{Cip1} の発現ベクターは pCMV-p21^{Cip1} を用いた。インターナルコントロールには、pRL-CMV を用いた。

* : P<0.01 ** : P<0.05

・p21^{Cip1}の過剰発現はがん細胞に存在する内在性のがん細胞特異的な E2F 活性を増強する

p21^{Cip1} が、がん細胞特異的な E2F 活性を増強するのかをさらに調べるために、p21^{Cip1}による ARF、TAp73 プロモーターの活性化が E2F 依存的であるのかを調べた。そのために、pRB によりがん細胞の E2F を抑制することで、p21^{Cip1}による ARF、TAp73 プロモーターの活性化が減弱するのかを調べた。細胞はがん細胞株 (5637、Saos-2) を用いた。また、pRB は CDK によるリン酸化部位に変異を加えた恒常的活性型 pRB である PSM.-7LP を用いた。この PSM.-7LP は野生型 pRB より E2F 活性の抑制能が高いため、E2F の抑制に用いた。その結果、5637、Saos-2 において、PSM.-7LP の発現により ARF、TAp73 プロモーターの活性が抑制された(図 3-4-5)。したがって、PSM.-7LP の発現により E2F 活性が抑制されたことが示唆された。さらに、同条件下において、PSM.-7LP の発現により p21^{Cip1}によって ARF、TAp73 プロモーターは活性化されなくなかった(図 3-4-5)。したがって、がん細胞での p21^{Cip1}による ARF、TAp73 プロモーターの活性化には E2F 活性が必要であり、p21^{Cip1}による ARF、TAp73 プロモーターの活性化は E2F 依存的であることが分かった。

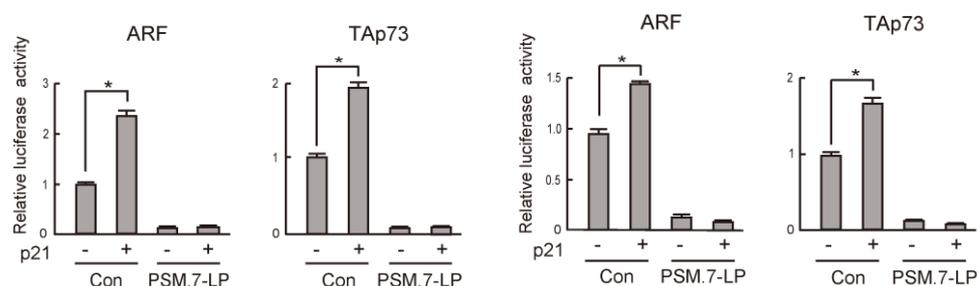


図 3-4-5. がん細胞における $p21^{Cip1}$ による ARF、TAp73 プロモーターの活性化は、PSM.-7LP の発現による E2F 活性の抑制により消失する

$p21^{Cip1}$ の発現ベクターは pCMV- $p21^{Cip1}$ (5637 は 5 ng、Saos-2 は 5 ng) を用いた。インターナルコントロールには、pRL-CMV を用いた。

* : $P < 0.01$

$p21^{Cip1}$ の過剰発現が、がん細胞特異的な E2F 活性を増強するのかをさらに調べるために、がん細胞での $p21^{Cip1}$ による TAp73 プロモーターの活性化が E2F 反応性エレメントを介しているのかをレポーターアッセイで調べた。 $p21^{Cip1}$ による TAp73 プロモーターの活性化が E2F 反応性エレメントを介しているかは、E2F 反応性エレメントに変異を挿入し E2F に対して反応性を失った TAp73pm が $p21^{Cip1}$ により活性化されるかで判定した。その結果、がん細胞株 (5637、Saos-2) において、野生型 TAp73 は $p21^{Cip1}$ により活性化された一方で、TAp73mt は $p21^{Cip1}$ による活性化を確認できなかった(図 3-4-6)。従って、 $p21^{Cip1}$ による TAp73 プロモーターの活性化が E2F 反応性エレメントを介していることが分かった。以上のことから、 $p21^{Cip1}$ の過剰発現が、がん細胞特異的な E2F 活性を増強することが明らかとなった。

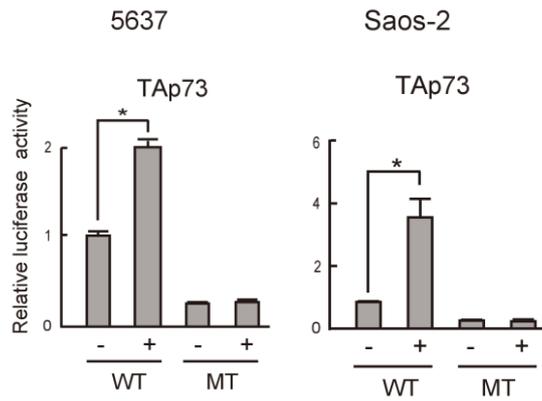


図 3-4-6 p21^{Cip1} による TAp73 プロモーターの活性化は E2F 反応性エレメントを介している

p21^{Cip1} の発現ベクターは pCMV-p21^{Cip1} (5637 は 5ng、Saos-2 は 5ng) を用いた。インターナルコントロールには、pRL-CMV を用いた。

* : P<0.01

・ p21^{Cip1} の過剰発現は Ad-ARF-TK のがん細胞特異的傷害作用を増強する

次に、p21^{Cip1} の過剰発現により ARF プロモーターを用いたがん細胞特異的傷害法を改善できるのかを調べた。それを調べるために、p21^{Cip1} の過剰発現が Ad-ARF-TK (自殺遺伝子である *HSV-TK* を ARF プロモーターで発現制御した組換えアデノウイルス) のがん細胞特異的な傷害作用を増強するのかを調べた。がん細胞として 5637、Saos-2 を、正常細胞としてヒト正常線維芽細胞 HFF を用いた。ウイルスの細胞傷害作用は、アポトーシス細胞の指標である SubG1 期細胞の割合を基に判定した。その結果、がん細胞株 (5637、Saos-2) では Ad-ARF-TK を感染させることで、SubG1 期の割合が上昇した(図 3-4-7C)一方で、正常細胞 HFF では Ad-ARF-TK の感染による SubG1 期の割合の上昇は確認できなかった(図 3-4-7B)。また、正常細胞 HFF において、*HSV-TK* を恒常的に高い活性を示す CMV プロモーターで発現制御した組換えアデノウイルス (Ad-CMV-TK) を感染させたサンプルではおよそ 38% の SubG1 期の割合を示した。Ad-CMV-TK の感染により SubG1 期の割合が上昇したため、本実験の条件下では HFF は *HSV-TK* の発現を介した傷害を十分に受けうる条件であった(図 3-4-7A)。これらのことから、Ad-ARF-TK はがん細胞を特異的に傷害できることを確認できた。また、がん細胞株 (5637、Saos-2) に Ad-ARF-TK に加え、Ad-p21^{Cip1} を重感染させると、SubG1 期の割合が上昇した(図 3-4-7C)。なお、今回の実験の条件下では、Ad-p21^{Cip1} 単独では SubG1 期の割合の上昇は確認できなかった(図 3-4-7C)。このことから、Ad-p21^{Cip1} は Ad-ARF-TK のがん細胞傷害作用を上昇することが示唆された。また、正常細胞 HFF では、Ad-ARF-TK に加え、Ad-p21^{Cip1} を感染させても、SubG1 期の割合の上昇は確認できなかった(図 3-4-7B)。したがって、Ad-p21^{Cip1} による p21^{Cip1} の過剰発現は、Ad-ARF-TK によるがん細胞特異的な傷害作用を増強することが強く示唆された。

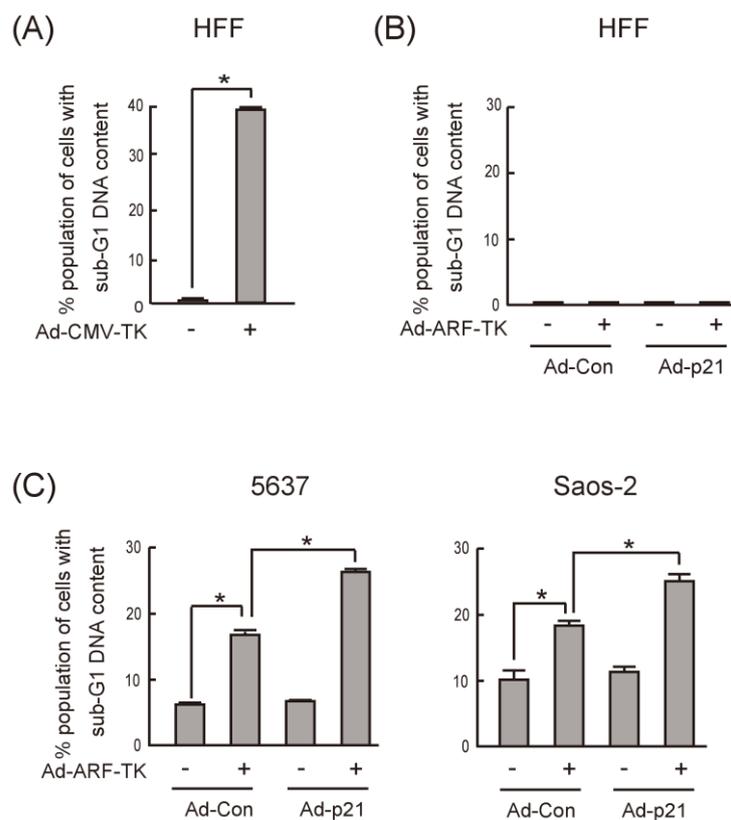


図 3-4-7. Ad-p21^{Cip1} は、Ad-ARF-TK によるがん細胞特異的な傷害作用を増強する

がん細胞株 (5637, Saos-2)、正常細胞 (HFF) に Ad-Con、Ad-ARF-TK、Ad-CMV-TK をそれぞれ MOI 20 で感染させ、ガンシクロビル (GCV) 濃度 50 μ M の 10 %FCS 入り DMEM もしくは RPMI にて 1 日培養した。さらに Ad-Con、Ad-p21 をそれぞれ MOI 100 で感染させ、GCV 濃度 50 μ M の 10 %FCS 入り DMEM もしくは RPMI にてさらに 2 日培養した後、細胞を回収した。アポトーシス細胞の割合は、アポトーシス細胞の指標である SubG1 期細胞の割合を指標とした。

* : P<0.01

・p21^{Cip1}の過剰発現は、がん細胞特異的な E2F の増強を介してアポトーシス誘導を行う

上記実験を行う過程で、p21^{Cip1} を過剰発現してから3日後から、ガンシクロビルを添加していなくても、がん細胞株においては浮いたアポトーシス様の細胞が現れることに気が付いた。一方、このようなアポトーシス様の細胞は正常細胞 (HFF) では観察できなかつた。そこで、p21^{Cip1} の過剰発現は、がん細胞を特異的にアポトーシス誘導すると予想し、その可能性を検討した。アポトーシス細胞の割合は、SubG1 期細胞の割合を指標とした。その結果、p21^{Cip1} の過剰発現は単独で、がん細胞 (5637、Saos-2) を時間依存的に SubG1 期細胞の割合が高くなり、p21^{Cip1} を過剰発現してから5日後には、SubG1 期細胞の割合が約60%に達することが分かった(図 3-4-8)。一方、正常細胞 (HFF) では p21^{Cip1} の過剰発現によるアポトーシス誘導は観察されなかつた(図 3-4-8)。従って、p21^{Cip1} の過剰発現によりがん細胞を特異的にアポトーシスに誘導できることが明らかとなった。

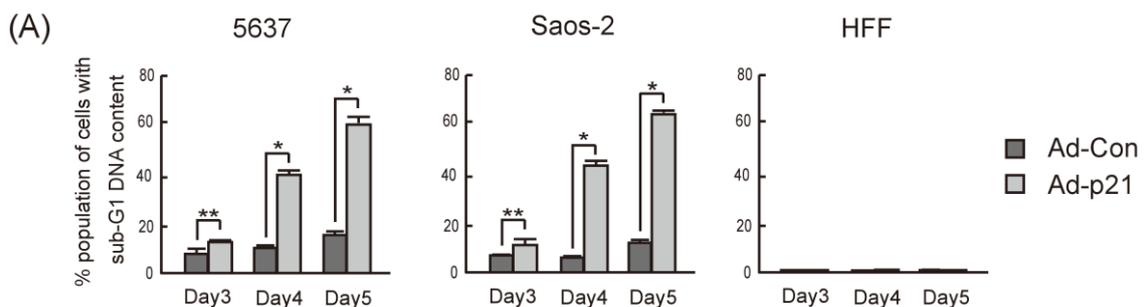


図 3-4-8. p21^{Cip1} の過剰発現はがん細胞を特異的にアポトーシス誘導する

がん細胞株 (5637, Saos-2)、正常細胞 (HFF) に Ad-Con、Ad-p21^{Cip1} をそれぞれ MOI 100 で感染させた。感染後、3、4、5 日間培養しサンプルを回収した。アポトーシス細胞の割合は、アポトーシス細胞の指標である SubG1 期細胞の割合を指標とした。* : P<0.01 ** : P<0.05

次に、p21^{Cip1}によるがん細胞特異的なアポトーシス誘導のメカニズムを探索した。p21^{Cip1}の過剰発現はがん細胞で特異的存在し、アポトーシス誘導能があるがん細胞特異的なE2F活性を増強する。したがって、p21^{Cip1}によるがん細胞特異的なアポトーシス誘導はがん細胞特異的なE2Fを増強したことによる可能性が考えられた。その可能性を検討するために、p21^{Cip1}によるアポトーシス誘導が、pRBの発現によりp21^{Cip1}の過剰発現によるE2F活性の増強を阻害することで消失するか否か調べた。そのためにまず、pRBの発現がE2F活性を抑制することを、p21^{Cip1}による内在性の*TAp73*、*Bim*の発現誘導が消失するかを確認した。内在性の*TAp73*、*Bim*の発現はqRT-PCR法で定量した。その結果、恒常的活性型pRBであるPSM.-7LPの発現により、E2Fの標的である*TAp73*、*Bim*の発現が抑制された。このことから、PSM.-7LPの発現によりE2F活性が抑制されたことが示唆された(図3-4-9)。また、PSM.-7LPの発現によりp21^{Cip1}による*TAp73*、*Bim*の発現誘導が消失した(図3-4-9)。このことから、本実験の条件下は、PSM.-7LPの発現によりp21^{Cip1}によるE2F活性の増強を抑制できていることが示唆された。

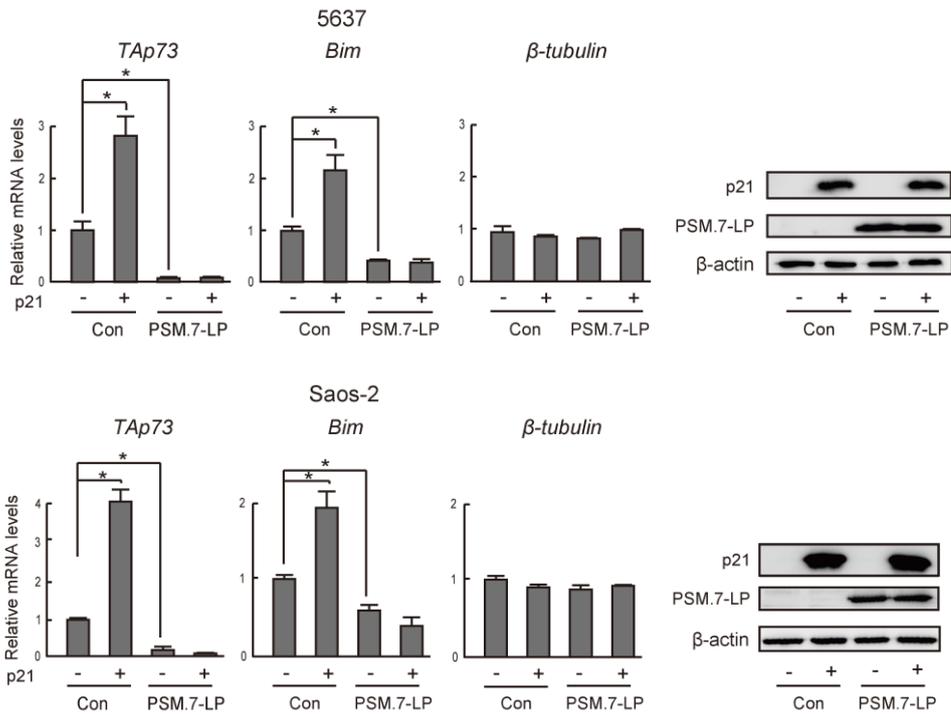


図 3-4-9. PSM.7-LP の発現は、 $p21^{Cip1}$ による E2F 標的の発現誘導を阻害するがん細胞株 (5637, Saos-2)、に Ad-Con、Ad- $p21^{Cip1}$ をそれぞれ MOI 100 で感染させた。同時に、5637 には Ad-Con、Ad-PSM.7-LP をそれぞれ MOI 200 で感染させ、Saos-2 には Ad-Con、Ad-PSM.7-LP をそれぞれ MOI 50 で感染させた。感染後、24 時間培養し細胞を回収した。

* : $P < 0.01$

そこで、同様な条件下で実験を行い、p21^{Cip1} の過剰発現によるアポトーシス誘導が、pRB の発現により p21^{Cip1} による E2F 活性の増強を阻害することで消失するのかを調べた。その結果、p21^{Cip1} の過剰発現によりアポトーシスが誘導され、PSM.-7LP の発現により、p21^{Cip1} によるアポトーシス誘導が消失した(図 3-4-10)。このことから、p21^{Cip1} によるアポトーシス誘導は、p21^{Cip1} の過剰発現による E2F 活性の増強によるものであることが示唆された。

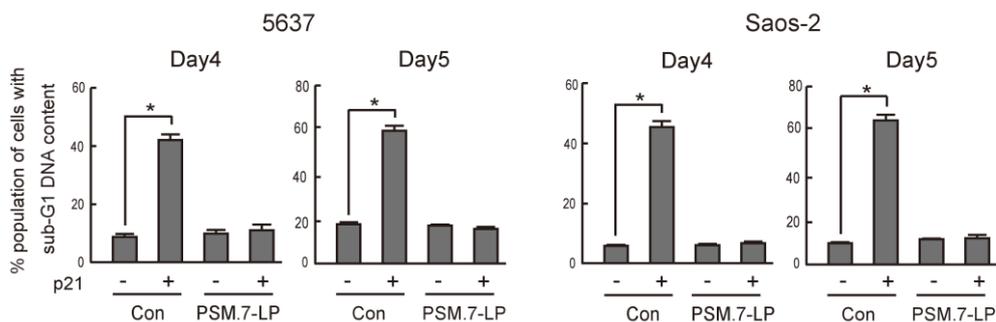


図 3-4-10. PSM.7-LP の発現は p21^{Cip1} によるアポトーシス誘導を阻害する

がん細胞株 (5637, Saos-2)、に Ad-Con、Ad-p21 をそれぞれ MOI 100 で感染させた。同時に、5637 には Ad-Con、Ad-PSM.7-LP をそれぞれ MOI 200 で感染させ、Saos-2 には Ad-Con、Ad-PSM.7-LP をそれぞれ MOI 50 で感染させた。感染後、4 日、5 日間培養し細胞を回収した。

* : P<0.01

【考察】

Cyclin/CDK 複合体が E2F による増殖関連遺伝子の活性化に及ぼす影響は明らかとなっているが、Cyclin/CDK 複合体が E2F によるがん抑制遺伝子の活性化に及ぼす影響はほとんど明らかになっていない。薬剤性の CDK インヒビターである Flavopiridol によるがん細胞のアポトーシス誘導は、E2F1 のノックダウンにより減弱することが報告された(58)。このことから、Cyclin/CDK 複合体はがん抑制遺伝子の発現誘導能があるがん細胞特異的な E2F 活性を抑制しており、CDK 活性を抑制することでその E2F 活性が増強し、アポトーシスが誘導される可能性が示唆された。そこで、CDK インヒビターにより CDK 活性を抑制することで E2F 活性を増強でき、ARF プロモーターを用いたがん細胞特異的傷害法を改善できると予想し、その可能性を検討した。がん細胞では、p21^{Cip1} の過剰発現はがん細胞特異的な E2F 標的遺伝子の発現を亢進し、その標的プロモーターを活性化した(図 3-4-3、3-4-4)。また、p21^{Cip1} 過剰発現によるがん細胞特異的な E2F の標的プロモーターの活性化は、E2F 依存的であった(図 3-4-5、3-4-6)。さらに、p21^{Cip1} の過剰発現は、Ad-ARF-TK のがん細胞特異的な傷害作用をがん細胞でのみ増強した(図 3-4-7)。したがって、p21^{Cip1} の過剰発現により、がん細胞特異的な E2F 活性を増強し、ARF プロモーターの傷害法を改善できることが強く示唆された。

p21^{Cip1} を過剰発現することで、がん細胞特異的な E2F 活性が増強した。p21^{Cip1} は主に CDK インヒビターとして機能する。したがって、CDK を抑制することでがん細胞特異的な E2F 活性が増強することが示唆され、がん細胞特異的な E2F は CDK によって抑制されることが示唆された。当研究室において、Cyclin D/CDK4 はがん細胞特異的な E2F に対して抑制的に働くことが分かっている。また、今回用いたがん細胞株 (5637, Saos-2) は Cyclin D の発現が非

常に低く、Cyclin D/CDK4 の活性は非常に低いことから、p21^{Cip1} による E2F 活性の増強は、Cyclin D/CDK4 ではなく、他の CDK を抑制したことによると考えられる。したがって、Cyclin D/CDK4 以外に、E2F に対して抑制的に働く Cyclin/CDK 複合体の存在が示唆された。Cyclin D/CDK4 はがん性変化で活性化された E2F を生理的な E2F に変換することが示唆されていることから、その他の Cyclin/CDK も同様に、E2F の機能変換を行っているのかもしれない。その機構があるため、増殖刺激により CDK 依存的に E2F を活性化すると、がん抑制遺伝子を発現誘導する E2F 活性が生じないのかもしれない。生理的な E2F とがん性変化特異的な E2F の違いを探索するためにも、CDK と E2F 活性の関連をより詳細に調べる必要があると考えられる。

p21^{Cip1} の過剰発現は、がん細胞特異的な E2F 活性を増強し、さらに Ad-ARF-TK のがん細胞特異的な傷害作用も増強した。したがって、Ad-ARF-TK と Ad-p21^{Cip1} を併用することで、副作用を抑えつつ、より高い治療効果を得ることができると考えられる。また、p21^{Cip1} の過剰発現はがん細胞を特異的にアポトーシス誘導することも判明した。このことから、がん細胞特異的傷害法として、p21^{Cip1} の過剰発現が有望であることが示唆された。ただ、p21^{Cip1} の過剰発現により正常細胞はアポトーシスが誘導されないが、E2F による増殖関連遺伝子の発現誘導が抑制されることから、p21^{Cip1} の過剰発現により増殖が阻害され、それに伴い副作用が生じる可能性がある。したがって、副作用の可能性を軽減するためにも、p21^{Cip1} はがん細胞特異的プロモーターで発現制御する必要があると考えられる。ARF プロモーターは p21^{Cip1} の過剰発現によりがん細胞でのみ活性化される。このことから、p21^{Cip1} を ARF プロモーターで発現制御することで、正常細胞での p21^{Cip1} の発現を抑制しつつ、がん細胞での p21^{Cip1} の発現を正のフィードバックにより増強できると予想される。したがって、p21^{Cip1} を

ARF プロモーターで発現制御することで、非常のがん細胞で特異的ながん治療法を開発できることが示唆された。また、p21^{Cip1} 過剰発現はがん細胞の E2F 活性を増強することでがん細胞をアポトーシスに誘導することも明らかとなった。このことから、がん細胞特異的な E2F 活性を増強することでがん細胞を特異的にアポトーシス誘導できることが示唆され、がん細胞特異的な E2F 活性を増強することが、がん細胞特異的傷害法として有望であることが示唆された。

E2F によって活性化される ARF プロモーターを活用することで、がん細胞を特異的に傷害でき、さらに p21^{Cip1} を過剰発現することで、E2F 活性を増強でき、よりがん細胞を特異的に傷害できることが明らかとなった。また、がん細胞の E2F 活性を増強することでがん細胞にアポトーシスを誘導できことも明らかとなった。したがって、がん細胞特異的な E2F 活性はがん細胞特異的傷害法に有用な活性であることが強く示唆された。

第4章 総括

E2F は細胞増殖を誘導する一方で、アポトーシスを誘導する二面性のある転写因子である。E2F が細胞増殖を誘導するのか、アポトーシスを誘導するのかは E2F の活性化の仕方に依存し、がん性変化時特異的に E2F はがん抑制遺伝子のプロモーターに結合しがん抑制遺伝子を活性化することで、アポトーシスを誘導することが本研究室の研究により明らかとなった。また、このがん抑制遺伝子を活性化する E2F 活性は、正常細胞に存在せず、がん細胞のみに存在することも判明した。したがって、がん細胞特異的に存在する E2F によるがん抑制遺伝子の活性化能は、がん細胞特異的傷害法に有用な活性であることが示唆された。事実、E2F 標的であるがん抑制遺伝子 *ARF* のプロモーターはがん細胞特異的な E2F1 プロモーターよりがん細胞で特異的に活性を示し、*ARF* プロモーターを用いたアプローチは E2F1 プロモーターを用いたアプローチよりがん細胞を特異的に傷害できた。また、がん細胞特異的な E2F 活性に特異的に反応するエレメントを利用することで、E2F 依存的にがん細胞で特異的に活性を示す人工プロモーターを作成でき、その人工プロモーターを利用するとがん細胞を特異的に傷害できた。したがって、がん細胞特異的な E2F 活性を活用することでがん細胞特異的な傷害法ができること明らかとなった。さらに、p21^{Cip1} 過剰発現によりがん細胞特異的に存在する E2F によるがん抑制遺伝子の発現誘導能を増強し、*ARF* プロモーターを用いた傷害法のがん細胞特異的傷害作用を増強できることが明らかとなった。したがって、p21^{Cip1} を用いて E2F によるがん抑制遺伝子の活性化能を増強することで、*ARF* プロモーターを用いた傷害法をさらに改善できることも明らかとなった。さらに、p21^{Cip1} を用いてがん細胞特異的に存在する E2F によるがん抑制遺伝子の活性化能を増強すると、がん細胞のみを傷害できることも明らかとなった。このように、がん細胞特異的な E2F によ

るがん抑制遺伝子の活性化能に着目して、その E2F 活性をプロモーター活性で活用したり、E2F のアポトーシス誘導能を活用したりすることで、がん細胞を特異的に傷害できることが明らかとなった (図 3-5)。多角的にがん細胞特異的な傷害に活用しうるがん細胞特異的な E2F 活性は、がん細胞特異的傷害に有用な活性であると考えられる。

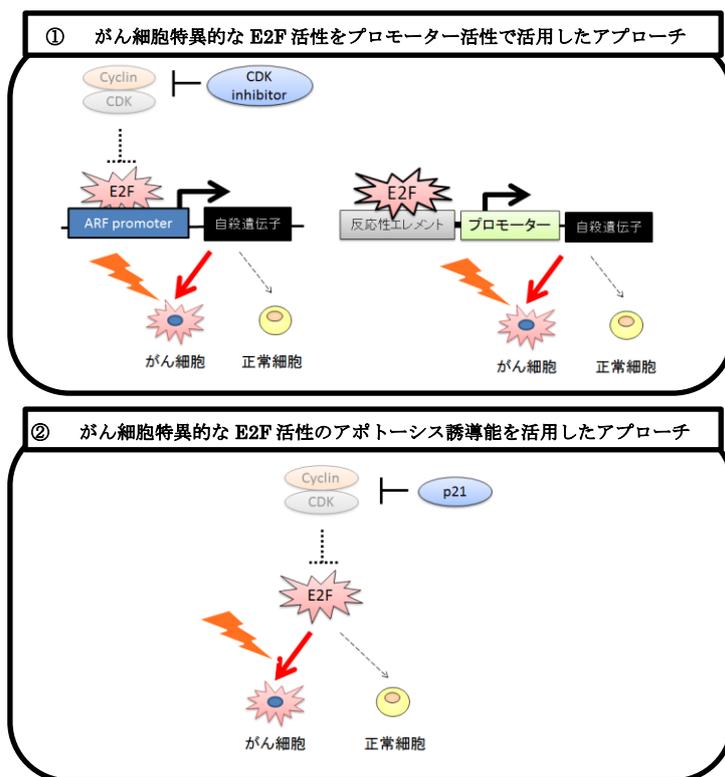


図 3-5. がん細胞特異的な E2F 活性を活用した傷害法

がん細胞特異的な E2F 活性をプロモーター活性で活用したり、E2F のアポトーシス誘導能を活用したりすることで、がん細胞を特異的に傷害できる

第 5 章 参考文献

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**;100:57-70
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**;144:646-74
3. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, *et al.* Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* **2001**;291:319-22
4. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**;99:12293-7
5. Duarte S, Carle G, Faneca H, de Lima MCP, Pierrefite-Carle V. Suicide gene therapy in cancer: Where do we stand now? *Cancer Letters* **2012**;324:160-70
6. Gu J, Kagawa S, Takakura M, Kyo S, Inoue M, Roth JA, *et al.* Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancers. *Cancer Research* **2000**;60:5359-64
7. Komata T, Kondo Y, Kanzawa T, Hirohata S, Koga S, Sumiyoshi H, *et al.* Treatment of malignant glioma cells with the transfer of constitutively active caspase-6 using the human telomerase catalytic subunit (human telomerase reverse transcriptase) gene promoter. *Cancer Research* **2001**;61:5796-802
8. Komata T, Kondo Y, Kanzawa T, Ito H, Hirohata S, Koga S, *et al.* Caspase-8 gene therapy using the human telomerase reverse transcriptase promoter for malignant glioma cells. *Human Gene Therapy* **2002**;13:1015-25
9. Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nature Biotechnology* **2012**;30:658-70
10. Tsukuda K, Wiewrodt R, Molnar-Kimber K, Jovanovic VP, Amin KM. An E2F-responsive replication-selective adenovirus targeted to the defective cell cycle in cancer cells: Potent antitumoral efficacy but no toxicity to normal cell. *Cancer Research* **2002**;62:3438-47
11. Kawashima T, Kagawa S, Kobayashi N, Shirakiya Y, Umeoka T, Teraishi F, *et al.* Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clinical Cancer Research* **2004**;10:285-92
12. Hershko T, Ginsberg D. Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **2004**;279:8627-34

13. Knudsen ES, Buckmaster C, Chen TT, Feramisco JR, Wang JYJ. Inhibition of DNA synthesis by RB: effects on G(1)/S transition and S-phase progression. *Genes & Development* **1998**;12:2278-92
14. Hsu JY, Reimann JDR, Sorensen CS, Lukas J, Jackson PK. E2F-dependent accumulation of hEml1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nature Cell Biology* **2002**;4:358-66
15. Parr MJ, Manome Y, Tanaka T, Wen P, Kufe DW, Kaelin WG, *et al.* Tumor-selective transgene expression in vivo mediated by an E2F-responsive adenoviral vector. *Nature Medicine* **1997**;3:1145-9
16. Nevins JR. The Rb/E2F pathway and cancer. *Human Molecular Genetics* **2001**;10:699-703
17. Spitkovsky D, JansenDurr P, Karsenti E, Hoffmann I. S-phase induction by adenovirus E1A requires activation of cdc25A tyrosine phosphatase. *Oncogene* **1996**;12:2549-54
18. Uchino J, Takayama K, Harada A, Kawakami Y, Inoue H, Curiel DT, *et al.* Infectivity enhanced, hTERT promoter-based conditionally replicative adenoviruses are useful for SCLC treatment. *Cancer Gene Therapy* **2005**;12:737-48
19. Su CQ, Wang XH, Chen L, Liu YL, Wang WG, Li LF, *et al.* Antitumor activity of an hTERT promoter-regulated tumor-selective oncolytic adenovirus in human hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* **2006**;12:7613-20
20. Zou WG, Luo CX, Zhang ZL, Liu J, Gu JF, Pei ZF, *et al.* A novel oncolytic adenovirus targeting to telomerase activity in tumor cells with potent. *Oncogene* **2004**;23:457-64
21. Irving J, Wang Z, Powell S, O'Sullivan C, Mok M, Murphy B, *et al.* Conditionally replicative adenovirus driven by the human telomerase promoter provides broad-spectrum antitumor activity without liver toxicity. *Cancer Gene Therapy* **2004**;11:174-85
22. Lanson NA, Friedlander PL, Schwarzenberger P, Kolls JK, Wang GS. Replication of an adenoviral vector controlled by the human telomerase reverse transcriptase promoter causes tumor-selective tumor lysis. *Cancer Research* **2003**;63:7936-41
23. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* **1996**;274:1672-7
24. Knudsen ES, Buckmaster C, Chen TT, Feramisco JR, Wang JYJ. Inhibition of DNA synthesis by RB: effects on G(1)/S transition and S-phase progression. *Genes & Development* **1998**;12:2278-92
25. Kovesdi I, Reichel R, Nevins JR. Identification of a cellular transcription factor involved in E1A Transactivation. *Cell* **1986**;45:219-28
26. Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nature Reviews Molecular*

- Cell Biology **2002**;3:11-20
27. Pearson BE, Nasheuer HP, Wang TSF. Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells. *Molecular and Cellular Biology* **1991**;11:2081-95
 28. Yoshida K, Inoue I. Regulation of Geminin and Cdt1 expression by E2F transcription factors. *Oncogene* **2004**;23:3802-12
 29. Ohtani K, DeGregori J, Nevins JR. Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**;92:12146-50
 30. Wu LZ, Timmers C, Maiti B, Saavedra HI, Sang L, Chong GT, *et al.* The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* **2001**;414:457-62
 31. Johnson DG, Ohtani K, Nevins JR. Autoregulatory control of E2F1 expression in response to positive and negative regulators of cell cycle progression. *Genes & Development* **1994**;8:1514-25
 32. Theillet C, Adnane J, Szepietowski P, Simon MP, Jeanteur P, Birnbaum D, *et al.* BCL-1 participates in the 11q13 amplification found in breast cancer. *Oncogene* **1990**;5:147-9
 33. Buckley MF, Sweeney KJE, Hamilton JA, Sini RL, Manning DL, Nicholson RI, *et al.* Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene* **1993**;8:2127-33
 34. Pedoutour F, Suijkerbuijk RF, Forus A, Vangaal J, Vandeklundert W, Coindre JM, *et al.* *Genes Chromosomes & Cancer* **1994**;10:85-94
 35. Ueki K, Ono Y, Hensen JW, Efird JT, vonDeimling A, Louis DN. CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Research* **1996**;56:150-3
 36. Lee E, To H, Shew JY, Bookstein R, Scully P, Lee WH. Complex composition and co-amplification of SAS and MDM2 in ring and giant rod marker chromosomes in well-differentiated liposarcoma. *Science* **1988**;241:218-21
 37. Yamasaki L, Jacks T, Bronson R, Goillot E, Harlow E, Dyson NJ. Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* **1996**;85:537-48
 38. Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, *et al.* p14(ARF) links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* **1998**;395:124-5
 39. Irwin M, Marin MC, Phillips AC, Seelan RS, Smith DI, Liu WG, *et al.* Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* **2000**;407:645-8
 40. Honda R, Yasuda H. Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *Embo Journal* **1999**;18:22-7

41. Stiewe T, Putzer BM. p73 in apoptosis. *Apoptosis* **2001**;6:447-52
42. Ren DC, Tu HC, Kim H, Wang GX, Bean GR, Takeuchi O, *et al.* BID, BIM, and PUMA Are Essential for Activation of the BAX- and BAK-Dependent Cell Death Program. *Science* **2010**;330:1390-3
43. Nakazawa Y, Kamijo T, Koike K, Noda T. ARF tumor suppressor induces mitochondria-dependent apoptosis by modulation of mitochondrial Bcl-2 family proteins. *Journal of Biological Chemistry* **2003**;278:27888-95
44. Sherr CJ. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes & Development* **1998**;12:2984-91
45. Melino G, Bernassola F, Ranalli M, Yee K, Zong WX, Corazzari M, *et al.* p73 induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *Journal of Biological Chemistry* **2004**;279:8076-83
46. Bell HS, Dufes C, O'Prey J, Crighton D, Bergamaschi D, Lu X, *et al.* A p53-derived apoptotic peptide derepresses p73 to cause tumor regression in vivo. *Journal of Clinical Investigation* **2007**;117:1008-18
47. Chau BN, Chen TT, Wan YSY, DeGregori J, Wang JYJ. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis requires p73 and c-ABL activation downstream of RB degradation. *Molecular and Cellular Biology* **2004**;24:4438-47
48. Komori H, Enomoto M, Nakamura M, Iwanaga R, Ohtani K. Distinct E2F-mediated transcriptional program regulates p14(ARF) gene expression. *Embo Journal* **2005**;24:3724-36
49. Iwanaga R, Komori H, Ishida S, Okamura N, Nakayama K, Nakayama KI, *et al.* Identification of novel E2F1 target genes regulated in cell cycle-dependent and independent manners. *Oncogene* **2006**;25:1786-98
50. Ozono E, Komori H, Iwanaga R, Ikeda MA, Iseki S, Ohtani K. E2F-like elements in p27(Kip1) promoter specifically sense deregulated E2F activity. *Genes to Cells* **2009**;14:89-99
51. Ozono E, Komori H, Iwanaga R, Tanaka T, Sakae T, Kitamura H, *et al.* Tumor suppressor TAp73 gene specifically responds to deregulated E2F activity in human normal fibroblasts. *Genes to Cells* **2012**;17:660-72
52. Kitamura H, Ozono E, Iwanaga R, Bradford AP, Okuno J, Shimizu E, *et al.* Identification of novel target genes specifically activated by deregulated E2F in human normal fibroblasts. *Genes to Cells* **2015**;20:739-57
53. Zindy F, Williams RT, Baudino TA, Rehg JE, Skapek SX, Cleveland JL, *et al.* Arf tumor suppressor promoter monitors latent oncogenic signals in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**;100:15930-5

54. DeGregori J, Leone G, Miron A, Jakoi L, Nevins JR. Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**;94:7245-50
55. Liu K, Paik JC, Wang B, Lin FT, Lin WC. Regulation of TopBP1 oligomerization by Akt/PKB for cell survival. *Embo Journal* **2006**;25:4795-807
56. Liu K, Luo YH, Lin FT, Lin WC. TopBP1 recruits Brg1/Brm to repress E2F1-induced apoptosis, a novel pRb-independent and E2F1-specific control for cell survival. *Genes & Development* **2004**;18:673-86
57. Lu HR, Liang XD, Issaenko OA, Hallstrom TC. Jab1/CSN5 mediates E2F dependent expression of mitotic and apoptotic but not DNA replication targets. *Cell Cycle* **2011**;10:3317-26
58. Ma YH, Cress WD, Haura EB. Flavopiridol-induced apoptosis is mediated through up-regulation of E2F1 and repression of Mcl-1. *Molecular Cancer Therapeutics* **2003**;2:73-81
59. Hallstrom TC, Nevins JR. Jab1 is a specificity factor for E2F1-induced apoptosis. *Genes & Development* **2006**;20:613-23
60. Marlowe JL, Fan YX, Chang XQ, Peng L, Knudsen ES, Xia Y, *et al.* The aryl hydrocarbon receptor binds to E2F1 and inhibits E2F1-induced apoptosis. *Molecular Biology of the Cell* **2008**;19:3263-71
61. Docquier A, Harmand PO, Fritsch S, Chanrion M, Darbon JM, Cavailles V. The Transcriptional Coregulator RIP140 Represses E2F1 Activity and Discriminates Breast Cancer Subtypes. *Clinical Cancer Research* **2010**;16:2959-70
62. Liu K, Lin FT, Ruppert JM, Lin WC. Regulation of E2F1 by BRCT domain-containing protein TopBP1. *Molecular and Cellular Biology* **2003**;23:3287-304
63. Mans DA, Vermaat JS, Weijts BG, van Rooijen E, van Reeuwijk J, Boldt K, *et al.* Regulation of E2F1 by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein predicts survival in renal cell cancer patients. *Journal of Pathology* **2013**;231:117-29
64. Eymin B, Karayan L, Seite P, Brambilla C, Brambilla E, Larsen CJ, *et al.* Human ARF binds E2F1 and inhibits its transcriptional activity. *Oncogene* **2001**;20:1033-41
65. Yang SZ, Lin FT, Lin WC. MCPH1/BRIT1 cooperates with E2F1 in the activation of checkpoint, DNA repair and apoptosis. *Embo Reports* **2008**;9:907-15
66. Hauck L, Kaba RG, Lipp M, Dietz R, von Harsdorf R. Regulation of E2F1-dependent gene transcription and apoptosis by the ETS-related transcription factor GABP gamma 1. *Molecular and Cellular Biology* **2002**;22:2147-58
67. Aoki I, Higuchi M, Gotoh Y. NEDDylation controls the target specificity of E2F1 and apoptosis induction. *Oncogene* **2013**;32:3954-64

68. Wang CG, Chen LH, Hou XH, Li ZY, Kabra N, Ma YH, *et al.* Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nature Cell Biology* **2006**;8:1025-U109
69. Wang CG, Rauscher FJ, Cress WD, Chen JD. Regulation of E2F1 function by the nuclear corepressor KAP1. *Journal of Biological Chemistry* **2007**;282:29902-9
70. Hallstrom TC, Mori S, Nevins JR. An E2F1-dependent gene expression program that determines the balance between proliferation and cell death. *Cancer Cell* **2008**;13:11-22
71. Burgering BMT, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* **1995**;376:599-602
72. Liu K, Luo YH, Lin FT, Lin WC. TopBP1 recruits Brg1/Brm to repress E2F1-induced apoptosis, a novel pRb-independent and E2F1-specific control for cell survival. *Genes & Development* **2004**;18:673-86
73. Singh P, Wong SH, Hong WJ. Overexpression of E2F-1 in rat embryo fibroblasts leads to neoplastic transformation. *Embo Journal* **1994**;13:3329-38
74. Kowalik TF, Degregori J, Schwarz JK, Nevins JR. E2F1 overexpression in quiescent fibroblasts leads to induction of cellular DNA synthesis and apoptosis. *Journal of Virology* **1995**;69:2491-500
75. Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**;98:11598-603
76. Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, Isazawa Y, Suzuki T, Tanaka K, *et al.* Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Journal of Biological Chemistry* **2002**;277:21843-50
77. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu HA, Gotoh Y, *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **1997**;91:231-41
78. Dan HC, Sun M, Kaneko S, Feldman RI, Nicosia SV, Wang HG, *et al.* Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) (vol 279, pg 5405, 2004). *Journal of Biological Chemistry* **2016**;291:22846-
79. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, *et al.* Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **1998**;282:1318-21
80. Rangarajan A, Hong SJ, Gifford A, Weinberg RA. Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell* **2004**;6:171-83
81. Malumbres M, Harlow E, Hunt T, Hunter T, Lahti JM, Manning G, *et al.* Cyclin-

- dependent kinases: a family portrait. *Nature Cell Biology* **2009**;11:1275-6
82. Lim SH, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* **2013**;140:3079-93
 83. Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* **2009**;28:2925-39
 84. Shapiro GI, Koestner DA, Matranga CB, Rollins BJ. Flavopiridol induces cell cycle arrest and p53-independent apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines. *Clinical Cancer Research* **1999**;5:2925-38
 85. Gojo I, Zhang B, Fenton RG. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol induces apoptosis in multiple myeloma cells through transcriptional repression and down-regulation of Mcl-1. *Clinical Cancer Research* **2002**;8:3527-38

第 6 章 研究成果

学会実績

2013 年 倉吉 健太、大谷 清「pRB の機能不全によって特異的に活性化される ARF プロモーターは、がん細胞特異的アプローチに有用である」、『第 36 回日本分子生物学会年会』、神戸

2014 年 倉吉 健太、大谷 清「ARF tumor suppressor promoter is useful for driving cytotoxic gene expression specifically in cancer cells」、『第 73 回日本癌学会学術総会』、横浜

2015 年 倉吉 健太、大谷 清「PI3K pathway does not suppress activation of the *Bim* and *ARF* genes by deregulated E2F」、『第 74 回日本癌学会学術総会』、名古屋

2015 年 倉吉 健太、大谷 清「PI3K 経路は制御を外れた E2F1 による *Bim* および *ARF* 遺伝子の発現誘導を抑制しない」、『第 38 回日本分子生物学会年会』、神戸

2016 年 倉吉 健太、大谷 清「DDX5 promotes *ARF* gene expression and apoptosis induced by deregulated E2F1」、『AACR annual Meeting 2016』、ニューオーリンズ

2016 年 倉吉 健太、大谷 清「Utility of an artificial promoter, ERE73s-ARF core, for driving suicide gene expression specifically in cancer cells」、『第 75 回日本癌学会学術総会』、横浜

2016 年 倉吉 健太、大谷 清「がん細胞に特異的に存在する制御をはずれた E2F 活性は自殺遺伝子のがん細胞特異的発現に有用である」、『第 39 回日本分子生物学会年会』、横浜

論文実績

1. **K. Kurayoshi**, E. Ozono, R. Iwanaga, A.P. Bradford, H. Komori, K. Ohtani, Cancer cell specific cytotoxic gene expression mediated by ARF tumor suppressor promoter constructs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450 (2014) 240-246.
2. Kitamura H, Ozono E, Iwanaga R, Bradford AP, Okuno J, Shimizu E, **Kurayoshi K**, Kugawa K, Toh H, Ohtani K.: Identification of novel target genes specifically activated by deregulated E2F in human normal fibroblasts. *Genes Cells, Genes Cells.* 20 (2015) 739-757
3. Ozono. E, Bradford. A.P, Iwanaga. R, **Kurayoshi. K**, Araki. K, Ohtani, Deregulated E2F Activity: Novel Targets and Therapeutic Potential in Cancer Treatment. *K. International Biology Review*, No. 3 (2016) KEI Journals
4. **K. Kurayoshi**, Okuno J, Ozono E, Iwanaga R, Bradford AP, Kugawa K, Araki K, Ohtani K, The phosphatidyl inositol 3 kinase pathway does not suppress activation of the ARF and BIM genes by deregulated E2F1 activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482 (2016) 784-790
5. **Kenta Kurayoshi**, Ayumi Shiromoto, Eiko Ozono, Ritsuko Iwanaga, Andrew P. Bradford, Keigo Araki and Kiyoshi Ohtani, Ectopic expression of CDK inhibitor p21Cip1 upregulates deregulated E2F activity and enhances cancer cell-specific cytotoxic gene expression mediated by ARF tumor suppressor promoter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press

第7章 謝辞

2008年に関西学院大学に入学して、早9年。気づいたら、博士課程の修了の時期になってしまいました。大学に入学するまで、一人暮らしをしたことがなく、何も自分で行ったことのない世間知らずの本当に世間知らずの人間でした。市役所にも一人で行ったこともなければ、住民票を取りに行ったことがありませんでした。右も左もわからない本当に未熟な人間でした。また、自分でご飯を作ることもなく、洗濯を行うこともありませんでした。一人暮らしを通じて、これら一般的に生活していたら経験するさまざまなことを経験することができたと同時に、母親がやってくれていた家事のありがたみを身をもって感じることができました。一人暮らしをするにあたって、膨大な資金援助をし、私の代わり家事をしていただいた両親に対してまずは、感謝申し上げます。一人暮らしの様々な経験を通じて、少しではありますが成長できたかと思えます。また、膨大な学費も援助していただきました。この資金援助のおかげで、何不自由なく大学生活を送ることはできました。心からお礼申し上げます。

大学に入学してからバイトをやったり、旅行に行ったり、就職活動を行ったり様々な経験を通じて成長できたかと思いますが、人生の中で一番、私を成長させてくれたのが、「研究室での研究活動」です。実験を始めて間もないころは、実験で思うような結果が得られなかったときは、自分一人では失敗の原因を突き止めることができず、実験を進めることができませんでした。しかし、大谷先生がいつもその原因を見つけて、解決策を教えてくださいました。大谷先生に問題を解決していただく過程で、「論理的に物事を考える方法」を学ぶことができ、研究を通じて「論理的な思考力」や「問題解決能力」を培うことができました。これらの能力は、研究だけでなく、私生活や企業での仕事など

様々な分野で役立つ有用な能力だと思います。このような有用な能力を学ばせて頂いた大谷先生には、心からお礼申し上げます。人生の宝ともいえる能力を身につけることができたような気がします。また、大谷先生から論理的な考え方だけでなく、一般常識や物事に取り組む姿勢や書類作成のポイントなど研究以外の様々なことも学ばせていただきました。大谷先生のおかげで大きく成長できたかと思います。

本論文にはマウスを使ったデータを掲載しませんが、マウスの実験を行っています。私自身、手先が不器用で眼下採血や尾静脈投与など、うまく行うことができませんでしたが、関西医科大学の田中正和先生に懇切丁寧な、長時間の指導のおかげで、何とかマウスの実験を行うことができるようになりました。実験施設を使わせて頂いたこと、丁寧に指導して頂いたこと、心からお礼申し上げます。

また、いつも丁寧な授業をしていただいた生命科学の先生方にも、感謝申し上げます。授業を通じて、生命科学の基礎を培うことができたと思います。また、忙しいところ、本博士論文を査読して頂いた主査の平井洋平先生、副査の今岡進先生にも心から感謝申し上げます。

最後に、陰ながら私を支えてくれた友人や研究室のメンバー、特にいつも話し合い相手になってくれて、研究室のラボメンテをしっかりと行ってくれたM2の好川君にも感謝申し上げます。簡単ではありますが、これをもって謝辞とさせていただきます。