

氏名	なにわ じゅん 浪花 潤
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第527号
学位授与年月日	平成17年 9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Leptomycin B enhances CDDP-sensitivity via nuclear accumulation of p53 protein in HPV-positive cells (HPV 感染細胞における p53 蛋白の核内蓄積を介した leptomycin B の CDDP 感受性増強作用)
学位論文審査委員	(主査) 佐藤慶佑 (副査) 井藤久雄 寺川直樹

### 学位論文の内容の要旨

抗癌剤感受性と抗癌剤誘導性アポトーシスとの関連が指摘されており、p53 遺伝子はアポトーシス誘導に深く関与する。子宮頸癌は一般に野生型 p53 を有するが、ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染が高頻度にみられる。HPV 感染細胞では、HPV 由来の E6 蛋白と E6 関連蛋白 (E6AP) が複合体を形成する。p53 蛋白は E6/E6AP 複合体と結合しユビキチン化した後、核外へ輸送され分解を受ける。核外移行シグナル (NES) の受容体である chromosomal region maintenance 1 (CRM1) は、NES と結合し核膜孔を通じて蛋白を核内から細胞質へ輸送する。一方、leptomycin B (LMB) は CRM1 に特異的に結合し、NES 依存性の蛋白核外輸送を阻害する。したがって、LMB は p53 蛋白の核外輸送阻害により HPV 感染細胞のシスプラチン (CDDP) 感受性を増強させることが期待される。本研究では、HPV 感染子宮頸癌細胞において HPV がいかに CDDP 感受性に関与するかを検討した。

### 方法

HPV18 型を有する子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞、HPV16 型を有する SiHa 細胞および HPV 陰性である Yumoto 細胞を用いた。これらの 3 株はすべて野生型 p53 を保有する。1.25ng/ml 濃度の LMB は細胞増殖に影響を与えなかったことから、1.25ng/ml の LMB を 24 時間添加して実験を行った。CDDP の添加濃度は LMB 1.25ng/ml 存在下での IC50 値とした。CDDP 単独および LMB との併用添加による細胞の CDDP 感受性は MTT assay にて検討した。アポトーシス細胞比率は Hoechst 33258 染色を用いて測定した。p53 蛋白の核内蓄積は免疫組織化学染色で、p53 蛋白、Bax 蛋白および Bcl-2 蛋白の発現は Western blot 法で検索した。

## 結果

HeLa 細胞および SiHa 細胞に対する CDDP の IC50 値は  $11.7\mu\text{M}$  と  $62.4\mu\text{M}$  であり、LMB の併用添加により IC50 値は各々  $4.6\mu\text{M}$  と  $32.4\mu\text{M}$  へと低下し、CDDP 感受性の著明な増強がみられた。一方、Yumoto 細胞では LMB 併用添加による CDDP 感受性の変化はみられなかった ( $45.5\mu\text{M}$  vs  $49.2\mu\text{M}$ )。CDDP 単独に比して、CDDP と LMB の併用添加時のアポトーシス指数は、HeLa 細胞で 2.3 倍、SiHa 細胞で 1.4 倍へと有意に増加した。Yumoto 細胞では併用添加によるアポトーシス指数の変化はみられなかった。CDDP と LMB の併用添加は、HeLa 細胞と SiHa 細胞の核内 p53 蛋白の蓄積を有意に増加させたが、Yumoto 細胞では増加しなかった。CDDP と LMB の併用添加は HeLa 細胞と SiHa 細胞の p53 蛋白および Bax 蛋白発現を増加させたが、Bcl-2 蛋白発現には変化はみられなかった。

## 考察と結論

HPV 感染子宮頸癌細胞では CDDP 単独添加後に p53 蛋白の核内蓄積と細胞内の Bax 蛋白発現が増加したことから、HPV 感染細胞における p53 依存性アポトーシス経路の存在が示唆された。LMB は HPV 感染細胞の CDDP 感受性を増強させ、CDDP と LMB の併用添加は p53 蛋白の核内蓄積およびアポトーシス細胞比率を増加させた。以上のことから、LMB は p53 蛋白の核外輸送阻害により p53 の分解を阻止し、CDDP 感受性を増強することが示された。また、HPV 感染細胞において p53 の不活化は蛋白核外輸送を伴うことが示唆された。

Bax 蛋白は p53 遺伝子による調節を受け、Bcl-2 蛋白と結合し、アポトーシスを促進する。一方、Bcl-2 蛋白は p53 依存性および非依存性アポトーシスの両者を阻害する。LMB の併用添加により細胞内の p53 蛋白および Bax 蛋白は有意に増加した。一方、Bcl-2 蛋白発現には変化がみられなかったことから、LMB は p53 依存性アポトーシスに関与することが示された。

本研究成績より、HPV 感染子宮頸癌細胞において、LMB は p53 蛋白の核外輸送阻害により核内に p53 蛋白を蓄積させ、CDDP 感受性を増強することが示された。しかしながら、LMB は NES 依存性のすべての蛋白核外輸送を阻害し強い細胞毒性を有するため、その臨床使用は困難である。p53 蛋白の輸送を特異的に阻害する新たな薬剤の開発が必要である。

## 審査結果の要旨

子宮頸癌では HPV 感染が高頻度に見られるが、野生型 p53 を保有する HPV 感染子宮頸癌細胞において、HPV がいかに CDDP 感受性に関与するかを検討した論文である。CDDP 単独添加に比して、NES 依存性の蛋白核外輸送を阻害する LMB との併用添加は頸癌細胞の p53 蛋白および Bax 蛋白発現を増加させ、CDDP 感受性を増強した。このことから、HPV 感染頸癌細胞において、LMB は p53 蛋白の核外輸送阻害により核内に p53 蛋白を蓄積させ、アポトーシスを促進して CDDP 感受性を増強することが示された。

本研究は新知見に富むものであり、その結果は婦人科腫瘍学研究に貢献するとともに学術の水準を高めたものと認める。