

氏 名	たけ はやし ひろ ひで 竹 林 浩 秀
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2097 号
学位授与の日付	平 成 11 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
学位論文題目	Hormone-induced apoptosis by Fas-nuclear receptor fusion proteins: novel biological tools for controlling apoptosis in vivo (Fas-核内レセプター融合蛋白質による脂溶性ホルモン依存性アポトーシスを用いた新しい癌遺伝子治療法の開発に関する研究)
	(主査)
論文調査委員	教 授 平 岡 眞 寛 教 授 伊 藤 嘉 明 教 授 成 宮 周

論 文 内 容 の 要 旨

APL (急性前骨髄球性白血病) 細胞は、ビタミンA誘導体であるレチノイン酸によって成熟した顆粒球への分化が誘導される。つまり、APLの患者は大量のレチノイン酸の経口投与により完全寛解に至ることが、臨床的に知られている。この現象は、レチノイン酸受容体がPMLという核蛋白に融合し、PML本来の機能がレチノイン酸依存性に置き換わっているというモデルで説明されている。

そこで、ほかの融合蛋白を人工的に設計し癌細胞に選択的に発現できれば、APL以外の癌も治療できる可能性があるのではないかと考えた。具体的には、組織透過性などの優れた性質をもつ脂溶性ホルモンの投与により細胞の自殺スイッチをオンにできるような融合蛋白を設計し、これによる癌細胞のアポトーシス誘導を試みた。

アポトーシスのシグナルを伝えるFas抗原と、エストロゲン受容体のエストロゲン結合領域を融合した融合遺伝子を作製した。この融合遺伝子をFas抗原によるアポトーシスに感受性のあるマウス線維芽細胞L929細胞に遺伝子導入し、恒常的に融合蛋白を発現するような細胞株を得た。この細胞株をエストロゲン処理すると、濃度依存性にアポトーシスが誘導され、0.1nMで100%の細胞死が認められた。また、Fas-核内レセプター融合蛋白のホルモン結合領域を、エストロゲンレセプターの代わりに、レチノイン酸レセプターを用いた融合蛋白も、レチノイン酸依存性にアポトーシスを誘導できることがわかった。L929細胞の代わりにヒト子宮頸癌細胞株のHeLa細胞を用いた場合も同様の実験結果が得られた。

次に、*in vivo*においても、このシステムが有効かどうか示すため、親株のL929細胞とFas-エストロゲン受容体融合遺伝子を発現したL929細胞とをヌードマウスの背中に移植し腫瘍をつくった。そのヌードマウスへエストロゲンを投与したところ、コントロールのL929細胞による腫瘍は、増大し続けたにもかかわらず、融合遺伝子を発現したL929細胞がつくった腫瘍の増大は停止した。この体積の増加の停止はアポトーシスによるものと判明した。

以上のことから、このシステムは、*in vitro*のみならず、*in vivo*でも有効ということが示された。

このシステムの応用としては、まず第一に、トランスジェニックマウスの手法とくみあわせ、生体内での細胞の機能を解析できるということが考えられる。つまり、生体内の特定の細胞に融合遺伝子を発現させ、適当な成長段階に脂溶性ホルモンを投与しその細胞を除去することができれば、生体内での細胞の機能を直接解析できる。これは、gene targetingにかわる、より大きなレベルのcell targetingとも言える新しい方法論につながる。この方法はとくに発生生物学や、神経系の細胞の機能解析に有用と考えている。さらには、癌治療の応用に関して、担癌モデル動物の体内で癌細胞に選択的に融合蛋白を発現させることができれば、脂溶性ホルモン投与により、生体内からの癌細胞除去が可能である。これは、従来の侵襲的な治療にかわる全く新しい遺伝子治療法の開発の可能性を秘めている。また、生体の免疫機能を高める物質を産生するようにした癌細胞に融合蛋白を発現させ、生体内に移植し、不必要になったときに除去するといった方法も考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、癌の新しい遺伝子治療法の開発を目指したものである。癌遺伝子治療の分野では、自殺遺伝子を癌細胞に導入し、死滅させる方法がよく使用されている。この際、自殺遺伝子としてチミジン・キナーゼが頻繁に用いられているが、ウイルス由来の蛋白で抗原性が高いなど、さまざまな制約がある。そこで、本研究では、従来の自殺遺伝子とは異なる方法で癌細胞にアポトーシスを誘導することを試みた。

アポトーシスのシグナルを伝えるFasと、脂溶性ホルモンのシグナルを伝える核内レセプターの融合遺伝子を作製した。この融合遺伝子をマウスL929細胞に恒常的に発現させると、エストロゲン依存性に細胞死を誘導できることが示された。この細胞死は、DNAの断片化、核の凝集を伴うことから、アポトーシスであることが確認された。融合遺伝子を恒常的に発現している細胞株をヌードマウスに移植すると腫瘍が形成される。この担癌マウスにエストロゲンを投与すると、腫瘍の増殖がおさえられ、腫瘍細胞にアポトーシスが誘導されていることが示された。

以上の研究は、脂溶性ホルモンによりアポトーシスを誘導する従来にはない自殺遺伝子を作りだしたもので、癌の新しい遺伝子治療法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成11年1月29日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。