

|         |                                                                                                                                                                                        |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名     | 田 浦 康 二 朗                                                                                                                                                                              |
| 学位の種類   | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                              |
| 学位記番号   | 医 博 第 2735 号                                                                                                                                                                           |
| 学位授与の日付 | 平 成 16 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 外 科 系 専 攻                                                                                                                                                                    |
| 学位論文題目  | Impact of novel histone deacetylase inhibitors, CHAP31 and FR901228 (FK228), on adenovirus-mediated transgene expression<br>(新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 CHAP31 及び FR901228 のアデノウイルス遺伝子発現に対する影響) |
| 論文調査委員  | (主 査)<br>教 授 藤 田 潤 教 授 下 遠 野 邦 忠 教 授 田 中 紘 一                                                                                                                                           |

### 論 文 内 容 の 要 旨

〔背景〕アデノウイルスベクターは遺伝子治療用のベクターとして有望視されているが、肝障害をはじめとする毒性や、発現が短期間しか持続しないことなど、臨床応用へ向けては解決されなければならない問題も多い。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDI) の一つである trichostatin A (TSA) は in vitro の実験でアデノウイルスによる遺伝子発現を増強、遷延させることが報告されている。このことより HDI の使用は、より少量のベクターで十分な遺伝子を発現させ、ベクターによる毒性を軽減させるための有用な戦略となる可能性がある。

〔目的〕新規 HDI である Cyclic Hydroxamic-acid-containing Peptide 31 (CHAP31) 及び FR901228 (FK228) の、アデノウイルス導入遺伝子発現増強効果につき、in vitro, in vivo にて検討した。

〔方法・結果〕Rat 2 fibroblast に AdLacZ を感染後、培地中に HDI を添加し、LacZ 遺伝子発現の推移を検討した。CHAP31, FR901228 を添加したものでは発現の最大値が10倍以上に増加し、高発現が7日以上にわたって持続した。同様の効果はヒト胃癌細胞株 MKN7 やヒト大腸癌細胞株 DLD1 でも観察され、細胞の種類によらない普遍的な現象であることが示唆された。ヒストンのアセチル化を Western blot にて検討した結果、アセチル化の程度と発現増強の程度が良く相関し、ヒストンの高アセチル化が発現増強に関与していることが示唆された。この HDI による遺伝子発現増強効果が内因性遺伝子についてもみられるかどうかを熱ショック蛋白 72 (HSP72) を用いて検討した。発現の増強はアデノウイルスによって HSP72 を遺伝子導入した場合には LacZ 同様に見られたが、熱ショックによって内因性の HSP72 を誘導した場合には見られず、導入遺伝子に特異的な現象であることが示唆された。最後に in vivo におけるこれらの薬剤の効果についても検討した。マウスに AdLacZ を経静脈投与し、その24時間後に CHAP31, FR901228 を静注したところ、肝臓における  $\beta$ -galactosidase の発現が約2倍に増強した。in vivo における効果が in vitro の5分の1である原因は in vivo における経静脈投与ではヒストンのアセチル化の程度が in vitro に比べ弱いことにあると考えられた。

〔考察〕CHAP31, FR901228 によるヒストンのアセチル化がアデノウイルスを用いた遺伝子治療の問題点を克服するために有用な手段となる可能性が示唆された。in vitro におけるこれらの薬剤の効果は未だ十分とはいえないが、遺伝子発現増強効果とヒストンのアセチル化程度に相関があり、臨床応用にむけて今後より強力な HDI が開発されることが期待される。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

アデノウイルスベクターは肝障害をはじめとする毒性や、発現が短期間しか持続しないことなど、遺伝子治療の臨床応用へ向けては解決されなければならない問題がある。ヒストンのアセチル化は遺伝子の転写の活性化と密接に関連している。このためヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDI) 導入された遺伝子の発現を増強させ、より少量のベクターで十分な遺伝子を発現させることで、ベクターによる毒性を軽減させるための有用な戦略となる可能性がある。

新規 HDI である Cyclic Hydroxamic-acid-containing Peptide 31 (CHAP31) 及び FR901228 (FK228) の、アデノウイルス

ス導入遺伝子発現増強効果につき、in vitro, in vivo にて検討した。両薬剤とも in vitro, in vivo におけるアデノウィルス遺伝子発現を、細胞、臓器を選ばず増強させた。遺伝子発現増強効果は細胞内ヒストンの高アセチル化と良く相関し、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害作用が発現の増強に結びついていることが示唆された。一方で内因性の遺伝子発現に対する影響は限られたものであると思われた。in vivo における発現増強効率は決して十分とは言えないが、投与法の工夫や薬剤の修飾により改善が期待され、これら薬剤がアデノウィルスを用いた遺伝子治療の効果増強、毒性の軽減に寄与する可能性が示唆された。

以上の研究はアデノウィルスを用いた遺伝子治療の効果増強、毒性の軽減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16年2月9日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。