

氏 名	つる た ゆう こ 鶴 田 優 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2369 号
学位授与の日付	平 成 13 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 婦 人 科 学 産 科 学 専 攻
学位論文題目	Combination effect of adenovirus-mediated pro-apoptotic Bax gene transfer with cisplatin or paclitaxel treatment in ovarian cancer cell lines (卵巢癌細胞におけるアデノウイルスを用いた bax 遺伝子導入と化学療法の併用効果についての研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 今 村 正 之 教 授 小 川 修 教 授 藤 井 信 吾

論 文 内 容 の 要 旨

進行卵巢癌患者の治療では手術療法と化学療法が主体である。シスプラチンの登場以降も長期予後については未だ著明な改善は認めておらず、その最大要因は卵巢癌細胞の制癌剤抵抗性、特にシスプラチン抵抗性にあると考えられる。近年、細胞死の一形態であるアポトーシスが癌の発生や進展に重要な役割を果たすことが示されているが、最近では制癌剤の殺細胞効果もこのアポトーシスに基づくことが示唆されてきている。このことから逆に制癌剤抵抗性についても、アポトーシス誘導の異常、すなわちアポトーシスの回避機構が関与する可能性が考えられる。

本研究では、シスプラチン感受性および耐性卵巢癌細胞における、シスプラチン作用下でのアポトーシスシグナルの動態を検討し、この検討からシスプラチン耐性機序としてアポトーシス促進因子 Bax の誘導異常が考えられたため、耐性卵巢癌に対する新しい治療法として Bax の遺伝子導入を検討した。アデノウイルスを用いて卵巢癌細胞に Bax を強発現させ、アポトーシス誘導効果と、さらに制癌剤との併用効果について検討した。

シスプラチン感受性卵巢癌細胞株 A2780 において、シスプラチンを添加した後さまざまな因子の発現を RT/PCR 法にて検討したところ、細胞周期調節因子 p21、癌遺伝子 MDM-2、およびアポトーシス促進因子 Bax の発現が著名に誘導された。この3者はいずれも癌抑制遺伝子 p53 により誘導されることが知られており、シスプラチン誘導性シグナルのなかで Bax と p53 の果たす役割は重要であると考えられた。SSCP/sequence によると感受性株 A2780 における p53 遺伝子は正常であった。一方シスプラチン耐性亜株 A2780/cDDP においては、シスプラチン添加により誘導される Bax 蛋白のレベルは低く、他の耐性株 OVCAR-3, SK-OV-3 においても Bax 蛋白は誘導されなかった。これら耐性株は、p53 の遺伝子変異もしくは欠失を伴っていた。以上の結果から、耐性卵巢癌ではシスプラチンが作用しても Bax の発現レベルが低く、効果的にアポトーシスが誘導されないこと、またこのアポトーシス抑制機序に Bax 誘導因子である p53 の変異が関係している可能性が考えられた。

そこで耐性卵巢癌細胞に Bax を過剰発現させ、アポトーシスが誘導可能か検討した。

Bax 高発現組み替えアデノウイルスを作製し、卵巢癌細胞へ遺伝子導入したところ、耐性亜株 A2780/cDDP において細胞の縮小、核の断片化など著明なアポトーシスの像を示した。ELIZA 法による定量でもアポトーシスはコントロール群に比べ有意に増加し、カスパーゼ 3 活性も Bax 発現ウイルス群において有意な上昇が認められた。Bax 発現ウイルス群においては50%の生細胞数の減少を認め、最終的な殺細胞効果も評価できた。以上の結果から、Bax の誘導異常によるシスプラチン抵抗性が想定された耐性亜株においては、Bax 以降のアポトーシス経路は比較的保たれており、Bax 遺伝子導入による遺伝子治療が有効である可能性が示された。Bax 遺伝子導入による治療効果は感受性株 A2780 においてもほぼ同等であり、卵巢癌細胞におけるその有用性が示唆された。

さらに、感受性株、耐性亜株双方において、Bax 発現ウイルスとシスプラチン又はタキソールの併用効果が認められ、

これらは新たな治療の候補に期待される。

本研究によって、アポトーシス促進因子 Bax の誘導障害がシスプラチン抵抗性に結びついている可能性が示唆され、Bax 発現アデノウイルスを用いて、より積極的にアポトーシスを促進する遺伝子治療は、単独でも、また化学療法と併用しても、シスプラチン抵抗性の卵巢癌細胞に対して有効である可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

卵巢癌では進行例が多く、その治療において化学療法は重要である。有効例は多いが薬剤に対する抵抗性が、長期予後不良の大きな要因となっている。

本研究では化学療法の中心であるシスプラチン（CDDP）の薬剤効果および薬剤抵抗性とアポトーシスとの関連、さらに薬剤作用下でのアポトーシスシグナルの動態の検討から、アポトーシス促進因子 Bax に注目し、これを分子標的とした遺伝子治療により薬剤抵抗性を克服する可能性について検討を進めた。

卵巢癌細胞株を用いた検討で、CDDP 感受性株においては薬剤添加後に Bax の著明な発現とアポトーシスの誘導が確認され、一方耐性株ではアポトーシスは誘導され難く、この時 Bax の発現レベルも低かった。すなわち CDDP 抵抗性機序に Bax を含むアポトーシスシグナルの誘導障害が関与することが示唆された。そこで Bax 高発現組替えアデノウイルスを作製し、卵巢癌細胞へ Bax 遺伝子を導入したところ、耐性卵巢癌において著明なアポトーシスと殺細胞効果を認めた。さらに Bax 遺伝子導入に CDDP 又はタキソールを併用したところ、相加的治療効果を認めた。

本研究によって、積極的なアポトーシス誘導を目指した Bax 遺伝子導入は、単独でも、また化学療法と併用しても、CDDP 抵抗性の卵巢癌細胞に対して有効である可能性が示された。

以上の研究は卵巢癌の制癌剤耐性機序の解明に貢献し、婦人科腫瘍学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、平成13年2月26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。