

2017年度 博士研究員研究成果報告書

氏名(所属研究室) 倉吉 健太(理工学研究科 大谷 清 研究室)

研究課題 がん細胞特異的な E2F 活性を活用したがん細胞特異的傷害法の開発及び Cyclin/CDK が、がん細胞特異的な E2F に及ぼす影響の検討

研究期間 2017年4月1日～2018年3月31日

研究成果概要

<背景・目的>

現在の抗がん療法の最大の問題点は、正常な細胞への副作用である。がん抑制因子 pRB 及び p53 の機能不全は、ほぼ全てのがんに存在する。この異常に基づき、正常細胞には影響を及ぼさず、がん細胞特異的に傷害する方法を開発できると考えられる。転写因子 E2F の活性は pRB によりは抑制され、pRB の不活性化に伴い活性化される。現在までに、正常細胞で観察される pRB の生理的な不活性化により生じた生理的な E2F には活性化されず、がん細胞でのみ観察される pRB の機能不全で生じた E2F に特異的に活性化される人工プロモーターが作製されている。従って、その人工プロモーターはがん細胞でのみ活性化されており、そのプロモーターを用いて自殺遺伝子を発現制御することで、自殺遺伝子をがん細胞で特異的に発現させることができ、がん細胞を特異的に傷害できると考えられる。そこで、本研究は(1) がん細胞特異的な E2F により特異的に活性化される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1つ目の目的とした。また、CDK インヒビターである p21 を過剰発現することで、がん細胞のみに存在するがん抑制遺伝子を活性化する E2F 活性を増強することが明らかとなっている。このことから、がん細胞特異的な E2F に対して抑制的に機能する Cyclin/CDK 複合体が存在する可能性が示唆された。そこで、(2) Cyclin/CDK が、がん細胞特異的な E2F に及ぼす影響の検討を2つ目の研究目的とした。以上、2017年度に上記(1)及び(2)の検討を行った。

<結果>

(1) がん細胞特異的な E2F により特異的に活性化される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

①人工プロモーターの傷害法のがん細胞特異的傷害性の検討

人工プロモーターを用いた傷害法のがん細胞特異的傷害性を検討するために、自殺遺伝子である *HSV-TK* 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を作成し、そのウイルスの正常細胞及びがん細胞に対する傷害作用を調べた。細胞は正常細胞である HFF 細胞と4種類のがん細胞株(5637、Saos-2、HLF、DLD-1)を用い、傷害作用はアポトーシス細胞の指標である SubG1 期細胞の割合を指標に判定した。その結果、人工プロモーターのウイルスは正常細胞 HFF に対する傷害作用は認められなかった。また、自殺遺伝子 *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は傷害作用を示しており、本実験は HFF を傷害しうる条件下で行っている。一方、人工プロモーターのウイルスはがん細胞に対して傷害作用を示しており、がん細胞特異的に傷害作用を示すことが明らかとなった。さらに、*HSV-TK* を人工プロモーターで発現制御することで *HSV-TK* はがん細胞で特異的に発現した。このとき、人工プロモーターで発現制御した場合、正常細胞での *HSV-TK* の発現量は CMV プロモーターの場合よりも約 1/1000 であった。従って、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での発現量を低レベルで抑えつつ、がん細胞で特異的に発現させることができることが示唆された。これらのこ

とから、人工プロモーターのウイルスは *HSV-TK* をがん細胞で特異的に発現させ、がん細胞を特異的に傷害することが明らかとなった。

②人工プロモーターの傷害法の抗腫瘍性及び副作用の検討

人工プロモーターを用いた傷害法が腫瘍を特異的に傷害できるのかを検討するために、抗腫瘍効果及び副作用を調べた。抗腫瘍効果はがん細胞株 DLDD-1 の皮下腫瘍モデルマウスを用い、皮下腫瘍の体積及び重量を指標に判定した。アデノウイルスは肝臓の細胞に対する指向性が高く、人工プロモーターのウイルスは肝障害を誘導する可能性がある。そこで、血中の肝障害マーカー及び肝臓の HE 染色切片により本アプローチの副作用を検討した。その結果、人工プロモーターのウイルス投与群は未治療群に比べ、腫瘍体積及び腫瘍重量が低かった。また、肝障害マーカーは正常値であり、HE 染色により肝細胞の傷害は確認できなかった。このとき、CMV プロモーターのウイルスは肝障害マーカーが異常高値であり、HE 染色により肝細胞の傷害は確認できおり、本実験は肝障害を誘導しうる条件下で行えている。従って、人工プロモーターのウイルスは、肝障害を誘導せずに抗腫瘍効果を示しうるということが明らかとなった。

(2) Cyclin/CDK が、がん細胞特異的な E2F に及ぼす影響の検討

①がん細胞特異的な E2F に対して、抑制的に機能する Cyclin/CDK 複合体の同定

CDK インヒビターである p21 は CDK2 に対して指向性が高い。そこで、CDK2 が、がん細胞特異的な E2F に対して抑制的に機能するのかを、ドミナントネガティブ CDK2 (dnCDK2) の発現によりがん細胞特異的な E2F 活性を増強するのかが検討した。dnCDK2 の発現により E2F 標的遺伝子の発現が亢進し、がん細胞特異的な E2F により特異的に活性化される人工プロモーターが活性化された。また、dnCDK2 による人工プロモーターの活性化は E2F 配列に起因し、RB の過剰発現により E2F 活性を抑制することで dnCDK2 による人工プロモーターの活性化は消失した。従って、CDK2 が、がん細胞特異的な E2F に対して抑制的に機能することが明らかとなった。また、同様な手法で CyclinA の過剰発現により E2F 活性の減弱、shRNA による CyclinA のノックダウンにより E2F 活性が亢進することが明らかとなった。また、CyclinA 過剰発現による人工プロモーターの抑制は dnCDK2 の発現により減弱することから、CyclinA/CDK2 複合体が E2F に対して抑制的に機能することが明らかとなった。

②CyclinA/CDK2 によるがん細胞特異的な E2F の抑制機構の検討

CyclinA/CDK2 によるがん細胞特異的な E2F の抑制機構の検討するために、CyclinA/CDK2 の過剰発現が E2F1 の局在に及ぼす影響を検討した。その結果、E2F1 の局在は CyclinA/CDK2 の過剰発現した場合でも核に存在しており、E2F1 と CyclinA は共局在していた。また、CyclinA と結合能を欠損した E2F1 は CyclinA/CDK2 による抑制が消失した。このことから、CyclinA/CDK2 は核で E2F1 と複合体を形成することで E2F1 の活性を抑制することが示唆された。さらに、その抑制機構の検討するために、遺伝子変異が生じている多種のがん細胞で CyclinA/CDK2 による E2F1 の抑制能を比較したところ、p65 活性が減弱していると考えられる MCF-7, HeLa 細胞でその抑制が消失していた。また、MCF-7 で p65 の過剰発現によりその活性をレスキューしたところ、CyclinA/CDK2 による E2F1 の抑制能が回復した。このことから、CyclinA/CDK2 による E2F1 の抑制に p65 が必須な役割を果たしていることが示唆された。以上より、がん細胞特異的な E2F 活性を活用したがん細胞特異的傷害法を開発でき、その活性機構として CyclinA/CDK2 による p65 を介した抑制機構があることを新たに見出すことができた。

論文発表

研究テーマ（1）及び（2）の研究成果は、現在、論文投函準備中である。

学会発表

2017年9月30日 倉吉 健太、大谷 清「p21^{Cip1} induces apoptosis specifically in cancer cell through up-regulation of the E2F activity」、『第76回日本癌学会学術総会』、横浜

2017年12月8日 倉吉 健太、大谷 清「CDK インヒビターp21^{Cip1}の過剰発現はがん細胞特異的なE2F活性を増強し、特異的に反応するARFプロモーターを用いた傷害法を改善できる」、『第40回日本分子生物学会年会』、神戸