

馬 玉華 論文の要旨

主 論 文

Effective transgene constructs for combination suicide gene therapy with trichostatin A
トリコスタチンAと組み合わせた自殺遺伝子治療に於ける、導入遺伝子の効果的な発現の
ためのベクター遺伝子構成

Yuhua Ma, Tomoko Kohno, Masayuki Igarashi, Kiyoshi Yasui, Chua Koon Jiew,
Toshifumi Matsuyama, and Hideki Hayashi

馬玉華、河野友子、五十嵐雅之、安井潔、蔡君柔、松山俊文、林日出喜

掲載雑誌 International Journal of Integrative Biology 2009, 5(2), 108-115

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：松山俊文教授)

緒 言

腫瘍に対する遺伝子治療法の一つに自殺遺伝子導入法がある。これは比較的毒性の低い前駆物質を腫瘍細胞に導入した遺伝子産物の作用により腫瘍細胞内でより毒性の高い物質に変換させ、腫瘍を死滅させる方法である。しかしながら、腫瘍細胞に導入した遺伝子の発現低下が治療効果を下げる大きな要因の一つになっている。この問題を解決する目的で我々はまず、導入した遺伝子の発現を増強させる生物活性物質を、単純ヘルペスウィルスのチミジンキナーゼ (HSV-tk) 遺伝子プロモーターの転写活性化を導入遺伝子発現増強の指標として、いろいろな放線菌株の産物 (メタノール抽出物) の中から検索した。そのなかにこの HSV-tk 遺伝子の転写活性を顕著に増強させる活性が見つかり、それを精製したところ、トリコスタチンA (TSA) というヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) であった。TSA はこれまでも自殺遺伝子治療において導入遺伝子の発現増強の目的で使われてきた試薬であったので、TSA による転写活性化機構を詳しく検討し、導入遺伝子のより効果的な発現増強のためのベクター遺伝子の構築を試みた。

対象と方法

これまでに放線菌の産物から多くの抗生物質や抗癌剤が発見されてきたことから、導入した遺伝子の発現を増強させる生物活性物質を検索する対象としては放線菌の産物を用いることにした。また導入遺伝子の転写活性化を検出する方法として、構成的な転写活性の低い HSV-tk プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子の upstream に繋いだプラスミドベクターを

FuGene トランスフェクション試薬を用いて HeLa 細胞に導入し、簡便で感度の良いルシフェラーゼ活性を測定した。

さらに導入遺伝子の TSA による発現誘導を増強させるためのベクターを作成するにあたり、この HSV-tk プロモーターの欠失変異を作成し、TSA-反応部位を決定するとともに、構成的な転写活性の高いサイトメガロウィルス (CMV) プロモーターと融合させたキメラのプロモーターを作成した。またプロモーター構造だけでなく、イントロン、3'-untranslated region (UTR) の影響も検討した。

結果

MK616-mF5 放線菌株のメタノール抽出物がこの HSV-tk 遺伝子の転写活性を顕著に増強させることがわかり、それを精製したところ、トリコスタチン A (TSA) というヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) であった。TSA は HSV-tk 遺伝子プロモーターの活性を 100 倍程上昇させたが、サイトメガロウィルス (CMV) プロモーター、ヒト β -actin 遺伝子プロモーター、SV40 ウィルス初期遺伝子プロモーター、RS ウィルスの LTR プロモーターの活性も増強することがわかった。しかしながらその程度は 4~28 倍と HSV-tk 遺伝子プロモーターに比べ低かった。HSV-tk プロモーターの欠失変異の解析から、転写開始部位から-281~-111 の位置に TSA-反応部位があることがわかった。そこにはそれぞれ特異的な転写因子が結合するオクタマーモチーフ、NF-Y 結合部位、GC ボックスが含まれていた。TSA-反応の最も高い HSV-tk プロモーターと構成的な転写活性の最も高いサイトメガロウィルス (CMV) プロモーターを融合させたキメラのプロモーターを作成し、構成的な転写活性が低く、TSA 存在下では CMV プロモーターに匹敵する強さを持つもの (100~200 倍の TSA-反応性) を作成することができた。さらに合成したイントロン構造、及び SV40 由来の長い 3'-UTR を挿入することにより、構成的な転写活性が低く、TSA 存在下では CMV プロモーター以上の強さを持つもの (400 倍近い TSA-反応性) を作成することができた。

考察

導入した遺伝子の発現を増強させる生物活性物質を、HSV-tk 遺伝子プロモーターの転写活性化を指標として、放線菌株ライブラリーの中から探索し TSA を得た。次に導入遺伝子の TSA 依存的な発現を目指して種々のベクターの構築を行った結果、構成的な転写活性が低く、400 倍近い TSA-反応性を示す新規のベクターが作成できた。このベクターを自殺遺伝子治療に応用することにより、正常細胞に対する毒性が低く、癌細胞に対する殺傷作用の強い効果が期待できる。現在実際にこのベクター構造に自殺遺伝子治療に使われるチミジンキナーゼ遺伝子を挿入し、これを HeLa 細胞のゲノムに組み込んだ安定な発現株を作成している。今後より低いガンシクロビル、TSA の濃度でより効率的に細胞を死滅させることができるかを検討していく予定である。