

| | |
|--------------|---|
| Title | アンチセンスオリゴヌクレオチドによる消化器癌の治療に関する基礎的検討 |
| Author(s) | 小林, 一三 |
| Citation | 大阪大学, 1996, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/39497 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。 |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

| | |
|------------|---|
| 氏名 | こ ばやし いち ぞう 小 林 一 三 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (医 学) |
| 学位記番号 | 第 1 2 5 7 4 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 8 年 3 月 25 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当 |
| 学位論文名 | アンチセンスオリゴヌクレオチドによる消化器癌の治療に関する基礎的検討 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 鎌田 武信 (副査) 教授 門田 守人 教授 辻本 賀英 |

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

画像診断が発達した今日でも、進行癌の予後は不良で、新たな治療法の開発が望まれている。アンチセンスオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴ）は、mRNAに相補的な塩基配列を持つオリゴヌクレオチドで、特定の遺伝子の発現を特異的に抑制することができる'magic bullet'として注目されている。一方、近年消化器癌は多段階の遺伝子変化の累積によって発生することが明らかになってきた。なかでもc-myc遺伝子は、数多くの癌で発現が亢進しており、その発現の度合いと癌の進行の程度がよく相関することが知られている。また、Ki-ras遺伝子は、大腸癌の40～50%において点変異を認め、腺腫の癌化に大きく関与していると言われている。そこで著者は、消化器癌に対する新たな治療法の試みとして、アンチセンスオリゴを用いてこれらの遺伝子の発現を抑制することにより、消化器癌細胞の増殖を抑制し得るかどうかについて検討した。

〔方法ならびに成績〕

実験には、c-myc遺伝子を過剰発現するヒト胃癌由来細胞株MKN-45と、Ki-ras遺伝子の片方の対立遺伝子に点変異を認めるヒト大腸癌由来細胞株DLD-1を用いた。mRNAの翻訳開始領域に相補的なアンチセンスオリゴと、対照としてセンスオリゴヌクレオチド（センスオリゴ）を、DNaseに安定といわれるフォスフォロチオエート体で合成した。培養細胞の細胞数は、ニュートラルレッドアッセイ法で評価した。

まず、c-mycアンチセンスオリゴをMKN-45細胞の培養液に添加し、増殖曲線に対する影響を検討したところ、0.1～10 μ Mの濃度で増殖抑制効果を示した。濃度依存性を詳しく検討するため、MKN-45細胞を各種濃度のc-mycアンチセンス、センスオリゴを含む培養液中で7日間培養した後、細胞数を比較検討したところ、c-mycアンチセンスオリゴは、3～10 μ Mの濃度で最大70%の増殖抑制効果を示した。一方センスオリゴは、どの濃度においても増殖抑制効果を示さなかった。c-mycアンチセンスオリゴによるMKN-45細胞の増殖抑制が、c-myc遺伝子の発現低下によるものであることを確認するため、MKN-45細胞のc-myc蛋白の発現をフローサイトメトリーにより検討した。その結果、c-mycアンチセンスオリゴは、c-myc蛋白陽性細胞数を濃度依存性に減少させたが、センスオリゴは影響を与えなかった。また、mRNAレベルでのc-myc遺伝子の発現を、RT-PCR法を用いて検討した結果、c-mycアンチセンスオリゴは、c-myc mRNAを濃度依存性に減少させたが、センスオリゴは影響を与えなかった。

次に、Ki-ras アンチセンスオリゴによる DLD-1 細胞の増殖抑制効果を検討するため、各種濃度の Ki-ras アンチセンス、センスオリゴを含む培地中で、DLD-1 細胞を 4 日間培養した後の細胞数を比較検討した結果、Ki-ras アンチセンスオリゴは、DLD-1 細胞の増殖を $10\mu\text{M}$ で最大 58% の抑制を示したが、センスオリゴは抑制しなかった。また、Ki-ras アンチセンスオリゴによる Ki-ras 蛋白の発現抑制を確認するため、ウェスタンブロッティングで解析した結果、Ki-ras アンチセンスオリゴは DLD-1 細胞における Ki-ras 蛋白の発現を $0.1\sim 10\mu\text{M}$ の濃度で抑制した。

in vitro で認められた c-myc, Ki-ras アンチセンスオリゴによる MKN-45, DLD-1 細胞の増殖抑制効果が、実際に消化器癌の治療に応用できるかどうかを検討するため、ヌードマウスを用いて in vivo での検討を行った。MKN-45 細胞が形成した腫瘍に c-myc アンチセンスオリゴを連日腫瘍内に投与した結果、c-myc アンチセンスオリゴは腫瘍体積の増大を有意に抑制したのに対し、センスオリゴは影響を与えなかった。同様に、DLD-1 細胞が形成した腫瘍に、Ki-ras アンチセンスオリゴを連日腫瘍内投与した結果、Ki-ras アンチセンスオリゴは腫瘍体積の増大を有意に抑制したが、センスオリゴは影響を与えなかった。

〔総括〕

以上、今回の検討により、c-myc, Ki-ras 遺伝子に対するアンチセンスオリゴを培地に添加することによって、それぞれ胃癌細胞株 MKN-45, 大腸癌細胞株 DLD-1 の増殖が抑制されることが示されたが、さらに、これらの消化器癌細胞株がヌードマウスに形成した腫瘍に対して、アンチセンスオリゴの腫瘍内投与が有効であることが証明された。これにより、アンチセンスオリゴによる消化器癌治療の可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

画像診断の進歩、集団検診の普及により、消化器癌の早期発見が可能となってきたが、手術のみで治癒することが困難な症例も多くみられる。これらの症例に対し、化学療法、放射線治療等の集学的治療が行われているが、効果が十分とはいえず、新たな治療法の開発が望まれている。一方、分子生物学の発達に伴う癌遺伝子や癌抑制遺伝子の発見により、癌は遺伝子異常によって発生することが明らかとなってきた。したがってこれらの遺伝子の制御が可能となれば、癌の本質に迫る治療法となると考えられる。

本研究は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて癌遺伝子の発現を制御することによる、消化器癌治療の試みを検討したものである。先ず in vitro で消化器癌由来細胞株に対して、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて c-myc, Ki-ras 遺伝子等、細胞の癌化や癌の進展に深く関与する遺伝子の発現を抑制することにより、細胞増殖を抑制し得ることを明らかにした。次にこれらの細胞をヌードマウスに移植して作成した腫瘍にアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与することにより腫瘍の増大を抑制し得ることを証明した。これらの結果より、アンチセンスオリゴヌクレオチドによる消化器癌の治療が可能であることが示された。今後、アンチセンスオリゴヌクレオチドは消化器癌の治療法としてさらなる応用開発が期待される。本研究はその第一歩として重要な意義を有しており、学位に値すると認められる。