The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【85】

氏　　名	小林一三（こばやしいちぞう）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　12574　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，0.1〜10μＭ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，３〜10μＭ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10μＭ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0.1～10μＭ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。