The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒストンデアセチラーゼ阻害剤が単純ヘルペスウイルスを用いた腫瘍融解性ウイルス療法に及ぼす影響
Author(s)	桂, 智子
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49246
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

【4】

氏　　　　　名	桂（かつら）　智（とも）子（こ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学 位 記 番 号	第　２１９０６　号
学位授与年月日	平成 20 年３月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学 位 論 文 名	**ヒストンデアセチラーゼ阻害剤が単純ヘルペスウイルスを用いた腫瘍融解性ウイルス療法に及ぼす影響**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　由良　義明 （副査） 教　授　川端　重忠　　准教授　大倉　正也　　准教授　中原　寛和

論 文 内 容 の 要 旨

【研究目的】

腫瘍融解性ウイルス療法で用いられる神経毒性遺伝子を欠失した複製可能型の単純ヘルペスウイルス１型（HSV-1）では、遺伝子欠損による効果の減弱があり、放射線や化学療法を用いた併用療法の必要性が指摘されている。

口腔癌の化学療法では、最近、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）を阻害して、ヒストンのアセチル化によって遺伝子発現を変化させる研究が進められている。ヒストンデアセチラーゼ阻害剤（HDI）であるトリコスタチンA（TSA）は細胞周期を停止し、細胞の分化を誘導し、腫瘍原性を低下させることが報告されている。一方、TSA は頭頸部癌細胞では転写因子 NF-κB を活性化するため、その抗腫瘍効果が低下することも知られている。

NF-κB は炎症、細胞の増殖、分化にかかわる広範な遺伝子群の転写因子で、ウイルス感染でも活性化が報告されている。腫瘍融解性ウイルス療法に用いる変異型 HSV-1 感染において NF-κB が重要な働きをする場合、これを修飾する併用薬は腫瘍融解性ウイルス療法の効果に大きな影響を及ぼす可能性がある。そこで、本研究では NF-κB に着目し、口腔扁平上皮癌細胞において変異型 HSV-1 と HDI である TSA が NF-κB 活性に及ぼす影響と TSA が変異型 HSV-1 の増殖と細胞傷害性に及ぼす影響について検討を行った。

【実験方法】

1）細胞として、ヒト口腔扁平上皮癌由来 SAS 細胞、下顎歯肉扁平上皮癌由来 Ca9-22 細胞、下顎歯肉扁平上皮癌から当科で樹立した FI 細胞およびサル腎由来 Vero 細胞を用いた。HSV-1 はγ34.5 遺伝子を欠失した複製可能型 HSV-1 である R849 を用いた。ウイルス感染力価の測定は、Vero 細胞上で plaque assay を行い、感染力価を plaque forming unit で表した。2）HDI として TSA、NF-κB の阻害剤として SN50 を用いた。3）NF-κB 活性化については、細胞質画分と核画分を調製して NF-κB を構成する p50 と p65 をイムノブロット法で検出した。また、核抽出物と NF-κB 結合領域のオリゴヌクレオチドを用いて、electrophoretic mobility shift assay（EMSA）を行った。4）p65 のアセチル化は核抽出物と抗 p65 抗体で免疫沈降法を行ったのち、イムノブロット法で抗アセチル化ペプチド抗体を用いて検出した。5）p65 の局在については、蛍光抗体法で共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。6）細胞傷害性は

MTT 法で測定した。7）mRNA レベルの遺伝子発現は RT-PCR にて検出した。8）細胞周期の測定は、フローサイトメトリー（FCM）解析にて行った。

【結果】

1）NF-κB は活性化にともなって細胞質から核内に移行することが知られている。変異型 HSV-1 による NF-κB の活性への影響を明らかにするため、細胞質画分と核画分を用いてイムノブロット法を行った結果、R849 感染により核内の p50 ならびに p65 が増加した。蛍光抗体法では、R849 感染によって円形化した細胞の核で p65 が強く染色された。

2）HDI は p65 の脱アセチル化を阻害し、転写の活性化を維持することが報告されている。SAS 細胞を TSA で処理し、核抽出物を用いて抗 p65 抗体で免疫沈降を行い、アセチル化 p65 を検出したところ、経時的にアセチル化 p65 の増加がみられた。また、イムノブロット法で TSA 処理による核内での p65 の増加が認められた。

3）感染細胞における TSA の影響を知るため、R849 感染細胞を TSA で 12 時間処理したところ、核内 p65 の発現が増加した。NF-κB 活性を EMSA で測定した場合も、R849 感染による NF-κB の活性化と TSA 処理による亢進がみられた。NF-κB 阻害剤 SN50 の処理で p65 の核移行は抑制された。また、TSA と SN50 を同時に処理すると、SN50 による阻害効果が減弱した。

4）TSA のウイルス増殖に対する効果につき、SAS 細胞に R849 を感染させ、TSA 存在下で培養し、ウイルス産生量を測定したところ、感染 24 時間でウイルス産生量は増加した。HSV-1 遺伝子発現の RT-PCR による検出では、後期遺伝子の gD とγ34.5 遺伝子に組み込まれた LacZ の発現の増加がみられた。gD の増加はイムノブロット法でも確認された。

5）HSV-1 感染と TSA が細胞増殖に及ぼす影響を知るため、細胞生存率を MTT 法で測定した。その結果、R849 感染あるいは TSA 処理単独で、それぞれ細胞生存率は低下したが、R849 感染に TSA を併用した場合、細胞生存率の低下はより顕著となった。

6）TSA が細胞周期に及ぼす影響につき、細胞周期停止に関与する p21 の発現をイムノブロット法で、また細胞周期を FCM で解析したところ、TSA 処理により p21 の発現増強と細胞周期の G1 期停止がみられた。

【考察】

口腔扁平上皮癌細胞において、複製可能型変異 HSV-1 の感染は NF-κB を活性化させることが明らかとなった。また、HDI である TSA は p65 をアセチル化し、R849 感染細胞でも核内 p65 を増加させて NF-κB の活性化に働くと考えられた。核内 p65 とウイルス産生量が NF-κB 阻害剤で低下することは、NF-κB がウイルス複製の促進因子として働くことを示している。TSA は NF-κB の活性化を助長してウイルス産生を増加させて、腫瘍細胞に対してより強い増殖抑制効果を示すと考えられた。また、TSA は p21 発現を介して細胞周期の G1 期停止を誘導するため、この作用も細胞増殖の抑制に貢献するものと思われる。

以上より、TSA は R849 を用いた口腔癌の腫瘍融解性ウイルス療法において有用な併用薬剤と考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究はヒストンデアセチラーゼ阻害剤が単純ヘルペスウイルスを用いた腫瘍融解性ウイルス療法に及ぼす影響について研究したものである。その結果、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤であるトリコスタチン A（TSA）はウイルス感染による NF-κB の活性化を助長してウイルス産生を増加させ、腫瘍細胞に対してより強い増殖抑制効果を示すことを明らかにした。

以上の結果は、口腔癌に対する腫瘍融解性ウイルス療法に有用な指針を与えるものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。