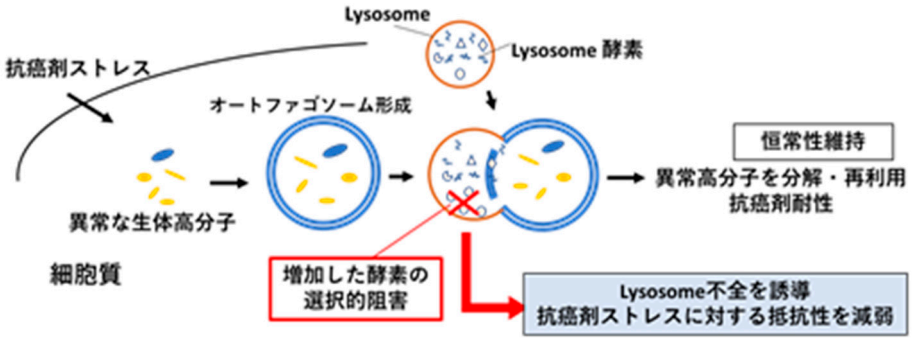
174　癌細胞特異的RNA干渉によるLysosome酵素制御法の開発	白井　祥睦

【目的】膵臓癌の特徴は乏血性の腫瘤であり血管新生に乏しいことである。癌細胞はその増殖を維持するために、アミノ酸、糖質、脂肪酸などをより多く必要とするが、膵臓癌では低酸素、低栄養環境においても生育できるよう細胞内の自食機構であるオートファジーが亢進することで供給されている。近年オートファジーの阻害が癌細胞の発育を抑制し、癌細胞のオートファジーを標的とした治療法の検討がなされているが、オートファジー全体を阻害することは正常細胞へ及ぼす影響が大きく、臨床応用へは新たな観点が必要である。そこで本研究では膵臓癌で亢進したオートファジーの役割と分解の中心を担うライソソームの機能に着目し、癌細胞特異的にライソソーム酵素遺伝子にRNA 干渉を行う方法の開発を行う。

【方法】ヒト膵臓癌細胞株に対し、siRNA 法を用いて *GAA* 遺伝子をノックダウンし、ウエスタンブロッティングにてアポトーシスシグナルが誘導されることを評価した。癌細胞特異的なウイルスベクターの開発のため、shRNA を搭載したアデノウイルスベクターを作製し *in vivo* においても同様に抗腫瘍効果を誘導できることを確認した。EF1αプロモーター下流に shGAA を搭載した第一世代アデノウイルスベクターを作製し GAA タンパク発現抑制効果の評価を行った。

【結果】*GAA* 遺伝子発現抑制により、アポトーシスシグナルが誘導されることが確認された。さらに、siRNA の併用により塩酸ゲムシタビンによって誘導されたアポトーシスシグナルタンパク発現が増強していることを確認した。マウス異種同所性皮下担癌モデルを作製し、AdU6shGAA ベクターを腫瘍に局注することで、腫瘍の発育抑制効果を認めた。また、第一世代ベクターを作製し GAA タンパク発現抑制効果を確認した。

Lysosome 酵素制御による抗癌剤耐性改善の治療戦略



174. 癌細胞特異的 RNA 干渉による Lysosome 酵素制御法の開発

白井　祥睦

東京慈恵会医科大学 外科学講座 消化器外科

Key words：膵臓癌，Lysosome，Autophagy，酸性αグルコシダーゼ，アデノウイルスベクター

緒　言

栄養飢餓により強く誘導されるオートファジーは癌細胞で亢進していることが示され、癌治療研究における有望な標的として注目されている［1］。オートファジーは、ミトコンドリアなどのオルガネラの新陳代謝やタンパク質、脂質、核酸といった生体高分子の分解を担う細胞内大規模分解系であり、細胞内の栄養供給や恒常性維持に重要な役割を果たしている。さらに、抗癌剤によってストレス環境に晒された細胞内においても細胞内環境の維持のためオートファジーが重要な役割を担い、治療抵抗性に関与することや、オートファジー抑制による抗腫瘍効果も報告されている［2］。その一方で、これまでの研究ではオートファジー全体を機能不全に陥らせる薬剤が多く、多大な副作用が問題視され臨床応用へは新たな観点が必要であった。そこで我々は、オートファジーの実態が多様な加水分解酵素を内包する細胞内小器官である Lysosome に依存した分解系であることに着目し、Lysosome 内の特定の酵素を制御することでオートファジーの抑制を誘導し抗癌剤の治療効果を高める方法を着想した。本研究は癌細胞に Lysosome 酵素欠損を引き起こし治療に利用するという逆転の発想である。Lysosome 酵素である酸性αグルコシダーゼ（GAA）は細胞内のグリコーゲンのα1.4、α1.6 結合を切断することでグルコースを産生し、生体内において糖代謝を支える重要な役割を担う。また、Lysosome 病の一つである Pompe 病の原因遺伝子として知られ、Pompe 病患者細胞ではオートファジーが抑制されていることが知られている［3］。本研究では GAA を標的とし、癌細胞特異的に GAA の遺伝子発現を抑制する新たな遺伝子治療法の開発を行ったので報告する。

方　法

1.　*GAA* 遺伝子発現抑制による抗腫瘍効果の検討

ヒト膵癌培養細胞（PANC-1、MIA PaCa-2）に siRNA 法を用いて GAA の発現抑制し、細胞増殖アッセイにて腫瘍増殖能の評価を行った。siRNA の効果の確認はトランスフェクション後 72 時間で蛋白を回収し、ウエスタンブロッティングにて確認を行った。

2.　アデノウイルスベクターによる *GAA* 発現抑制効果の検討

U6 プロモーターの下流に shRNA を搭載したアデノウイルスベクターを作製し、マウス皮下腫瘍モデルに対して治療し、その抗腫瘍効果を確認した。

3.　EF1 プロモーターを用いた新たな遺伝子抑制ベクターの開発

我々が開発した、免疫反応を最小限に抑えることが可能な EF1αプロモーターを用いた低炎症型アデノウイルスベクター（AdV）を改変し、細胞特異的遺伝子発現 AdV の開発を行う。

4.　統計学的解析

統計学的解析は Student t-test および反復測定分散分析を行った。p 値＜0.05 以下を有意な差とした。

結　果

1.　*GAA* 遺伝子発現抑制による抗腫瘍効果の検討

PANC-1、MIA PaCa-2 に対し siGAA を用いて *GAA* の発現抑制したところ、両細胞株においてアポトーシスシグナルが誘導（cleaved caspase-8、-3、cleaved PARP）された。さらに、siRNA の併用により塩酸ゲムシタビンによって誘導されたアポトーシスシグナルタンパク発現が増強していることを確認した（図 1）。

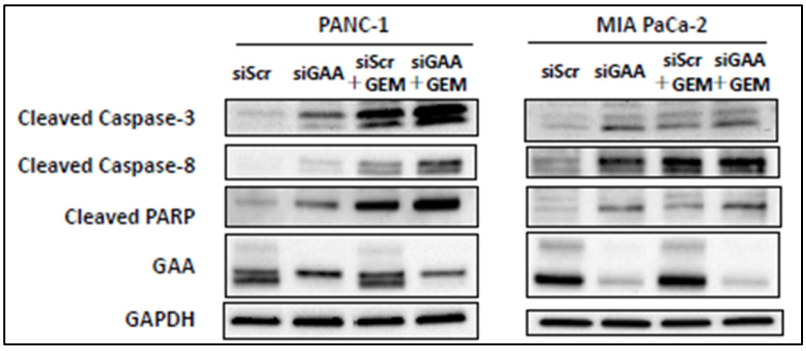


図 1. GAA 発現抑制によるアポトーシスシグナル
siRNA の併用により塩酸ゲムシタビンによって誘導されたアポトーシスシグナルタンパク発現が増強。

2.　GAA を標的としたアデノウイルスベクターによる抗腫瘍効果の検討

U6 プロモーターの下流に shRNA を導入したベクターを作製した（図 2）。培養細胞を用いて AdU6shGAA による GAA タンパク発現抑制効果および酵素活性抑制を確認したのちに、マウス異種同所性担癌モデルに対し腫瘍へベクターを局注した。治療群においては有意な腫瘍発育抑制効果を示すことができた（図 3）。

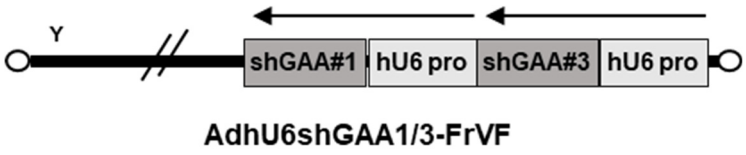


図 2.　AdU6shGAA
U6 プロモーターの下流に shRNA を導入したベクター。

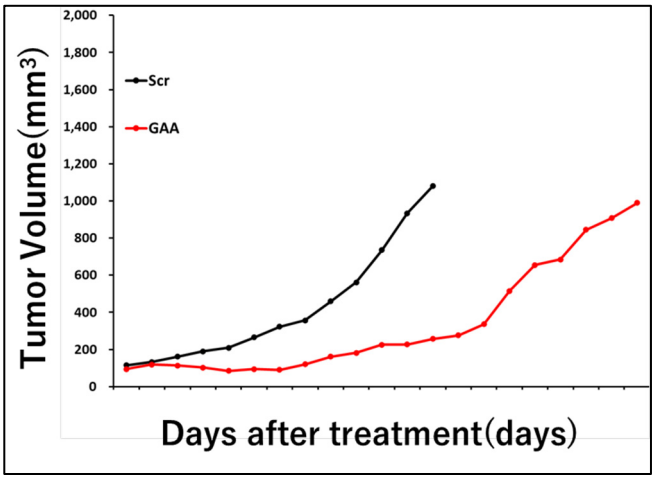


図 3.　AdU6 shGAA による増殖抑制効果の検討
AdU6shGAA 治療群では腫瘍増殖が抑制。

3.　EF1 プロモーターを用いた新たな遺伝子抑制ベクターの開発

上記 2. にて shGAA を搭載したウイルスベクターによる治療効果が確認され、現在 EF1α プロモーターを用いた低炎症型アデノウイルスベクター（AdV）を改変し、任意の目的プロモーターへ組換えることで新たな細胞特異的遺伝子発現 AdV の開発を行っている。本ベクターは EF1α プロモーターから dsRed を発現するが、dsRed の 3’ー非翻訳領域に組み込まれている miR30 の miRNA 配列を *GAA* に対する shRNA に置換するものである。今後、EF1α プロモーターを任意のプロモーターへと変換することで、標的細胞特異的な遺伝子導入を目指す（図 4）。

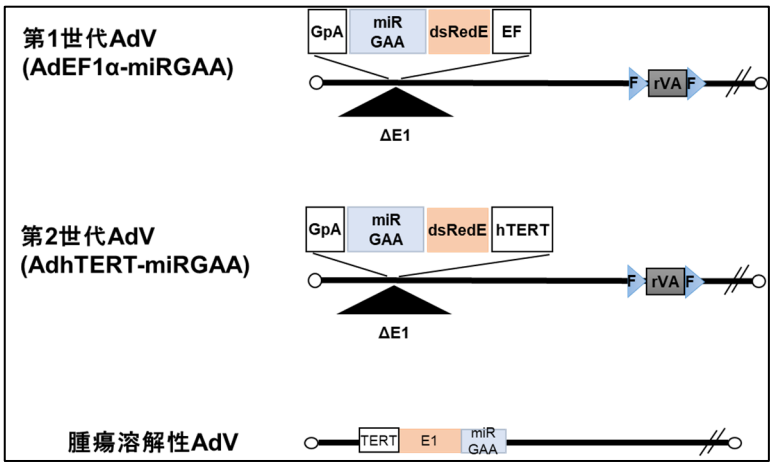


図 4.　AdEF1α shGAA ベクターの開発

EF1α プロモーターを置換し標的細胞特異的な遺伝子導入を目指す。

考　察

本研究では Lysosome 酵素遺伝子である *GAA* を発現抑制することにより抗腫瘍効果を認め、抗癌剤によるアポトーシスシグナルが増強することから、Lysosome 酵素（GAA）が抗癌剤耐性に関与していることが示唆された。酸性α グルコシダーゼ（GAA）は欠損することで Pompe 病を引き起こすことが知られているが、癌細胞における糖代謝における GAA、または Lysosome の機能の位置づけはいまだ不明である。近年臨床研究が行われているオートファジーを抑制することにより抗腫瘍効果を誘導する今までの研究とは異なり、本研究では癌細胞の Lysosome 酵素のみを抑制するため、標的とした組織以外の正常細胞への影響は非常に小さいと考えられる。

また、今研究で開発している腫瘍溶解性アデノウイルスベクターは、癌細胞特異的な治療効果を保ちつつ、正常細胞への影響を最小限に抑える革新的治療法として期待が寄せられている。*GAA* のみならず他の酵素遺伝子を抑制することで最も治療効果の高い遺伝子を同定することでさらなる治療効果の改善が期待される。

今後は、Lysosome 酵素遺伝子の発現抑制が正常膵細胞を含めた各種細胞へ及ぼす影響の分子機構の解明を行い、また、効率よく shRNA の遺伝子導入が可能となるウイルスベクターを開発し、安全性、有効性を担保した新たな癌治療法の確立を目指す。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京慈恵会医科大学外科学講座の羽村凌雅、矢永勝彦、同大学総合医科学研究センター基盤研究施設の鐘ヶ江裕美、同大学総合医科学研究センター遺伝子治療研究部の嶋田洋太、大橋十也である。本研究遂行にあたり共同研究者の諸先生方には研究デザインからデータの評価に至るまで多くの助言を頂いた。またデータ取得に関しても共同研究者の羽村凌雅先生の助力なしでは不可能であった。ここに深い感謝の意を表する。

文 献

1) Kimmelman AC. The dynamic nature of autophagy in cancer. Genes Dev. 2011;25(19):1999-2010. doi: 10.1101/gad.17558811. PMID: 21979913

2) Kallunki T, Olsen OD, Jaattela M. Cancer-associated lysosomal changes: friends or foes? Oncogene. 2013;32(16):1995-2004. doi: 10.1038/onc.2012.292. PMID: 22777359

3) Shimada Y, Klionsky DJ. Autophagy contributes to lysosomal storage disorders. Autophagy. 2012;8(5):715-6. doi: 10.4161/auto.19920. PMID: 22617443