

ドキシソルビシンによる
サイトメガロウイルスプロモーター
駆動性遺伝子の発現制御に関する研究

2009年

木下 淳

目 次

略語・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ i

総論の部

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1

第 1 編 アンスラサイクリン系抗悪性腫瘍薬の負荷による AP-1 前初期遺伝子および CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現挙動解析・・・・・・・・・・・・・・・・ 6

第 1 章 遺伝子導入皮膚線維芽細胞への Dox 負荷および Dox 負荷中止による AP-1 前初期遺伝子および CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現挙動解析・・・・・・・・・・・・・・・・ 6

第 1 節 皮膚線維芽細胞への遺伝子導入・・・・・・・・ 9

第 2 節 Dox 負荷および Dox 負荷中止による AP-1 前初期遺伝子発現量の変化・・・・・・・・ 14

第 3 節 Dox 負荷および Dox 負荷中止による CMV プロモーター駆動性遺伝子発現量の変化・・・・・・・・ 18

第 4 節 小括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23

第 2 章 遺伝子導入肝細胞への Dox 負荷による CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現挙動解析・・・・・・・・・・・・・・・・ 24

第 1 節 肝細胞への遺伝子導入・・・・・・・・・・・・ 25

第 2 節 Dox 負荷による CMV プロモーター駆動性遺伝子発現

量の変化・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 26
第3節 小括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 28

第2編 活性酸素刺激による AP-1 前初期遺伝子および
CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現挙動解
析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29

第1章 遺伝子導入皮膚線維芽細胞への活性酸素刺激による
AP-1 前初期遺伝子およびCMV プロモーター駆動性遺伝子の発現
挙動解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29
第1節 皮膚線維芽細胞への遺伝子導入・・・・・・・・・・ 30
第2節 PQ 負荷による AP-1 前初期遺伝子発現量の変化・・ 33
第3節 PQ 負荷による CMV プロモーター駆動性遺伝子発現量
の変化・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 36
第4節 AP-1 前初期遺伝子発現量と CMV プロモーター駆動性
遺伝子発現量との相関性解析・・・・・・・・・・ 38
第5節 小括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 40

第3編 種々の抗悪性腫瘍薬の負荷による CMV プロモ
ーター駆動性遺伝子の発現挙動解析と発現調節物質の
解明・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41

第1章 種々の抗悪性腫瘍薬負荷およびfree radical scavenger の共
存による CMV プロモーター駆動性遺伝子発現量の変化・・ 41
第1節 抗悪性腫瘍薬負荷による CMV プロモーター駆動性遺
伝子発現量の変化・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 43
第2節 抗悪性腫瘍薬による遺伝子発現誘導におよぼす共存

free radical scavenger の影響	50
第3節 小括	58

第4編 アンスラサイクリン系抗悪性腫瘍薬による心毒性軽減を目的とした有用タンパク質の送達に関する基礎的検討

第1章 遺伝子導入肺上皮細胞への活性酸素刺激によるCMVプロモーター駆動性遺伝子の発現挙動解析	59
第1節 PQ負荷によるCMVプロモーター駆動性遺伝子発現量の変化	61
第2節 小括	65

結論	66
----	----

謝辞	70
----	----

主論文目録	71
-------	----

実験の部

第1編 第1章 実験の部	75
1.実験材料	
2.細胞培養	
3.プラスミドベクター	
4.遺伝子導入および遺伝子導入皮膚線維芽細胞の調製	

- 5. mRNA 転写量測定
- 6. rsGFP タンパク発現量測定
- 7. 遺伝子導入皮膚線維芽細胞に対する Dox 負荷実験および Dox 負荷中止実験
- 8.統計学的処理

第1編 第2章 実験の部・・・・・・・・・・・・・・・・・・84

- 1.実験材料
- 2.細胞培養
- 3.プラスミドベクター
- 4.遺伝子導入および遺伝子導入肝細胞の調製
- 5. EGFP タンパク発現量測定
- 6.遺伝子導入肝細胞に対する Dox 負荷実験
- 7.統計学的処理

第2編 第1章 実験の部・・・・・・・・・・・・・・・・・・86

- 1.実験材料
- 2.細胞培養
- 3.プラスミドベクター
- 4.遺伝子導入および遺伝子導入皮膚線維芽細胞の調製
- 5. mRNA 転写量測定
- 6. rsGFP タンパク発現量測定
- 7. 遺伝子導入皮膚線維芽細胞に対する PQ 負荷実験
- 8.統計学的処理

第3編 第1章 実験の部・・・・・・・・・・・・・・・・・・93

- 1.実験材料

- 2.細胞培養
3. mRNA 転写量測定
4. rsGFP タンパク発現量測定
5. 遺伝子導入皮膚線維芽細胞に対する抗悪性腫瘍薬負荷および free radical scavenger 共負荷実験
- 6.統計学的処理

第4編 第1章 実験の部・・・・・・・・・・・・・・・・・・97

- 1.実験材料
- 2.細胞培養
- 3.総 SOD 活性測定
- 4.遺伝子導入肺上皮細胞に対する PQ 負荷実験
- 5.統計学的処理

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・99

略 語

本論文中に使用した略語について以下に記載する。

AP-1: activator protein 1

BGH: bovine growth hormone

CMV: cytomegalovirus

CMV-LTR: cytomegalovirus long terminal repeat

DDS: drug delivery system

DMEM: dulbecco's modified Eagle's medium

Dox: doxorubicin

Eda: edaravone

EGFP: enhanced green fluorescent protein

FBS: fetal bovine serum

G418: geneticin

G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor

GFP: green fluorescent protein

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HSV-TK: herpes simplex virus thymidine kinase

HVJ: hemagglutinating virus of Japan

HVJ-E: hemagglutinating virus of Japan envelope

LTR: long terminal repeat

MAPK: mitogen activated protein kinase

mRNP: messenger ribonucleoproteins

MTX: methotrexate

NAC: N-acetyl cysteine

NFκB: nuclear factor κB

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PLSD: *post hoc* least significant difference

PQ: paraquat

ROS: reactive oxygen species

RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction

rsGFP: red-shifted green fluorescent protein

SEM: standard error of mean

SOD: superoxide dismutase

TPA: 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate

TRE: 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate response element

5-FU: 5-fluorouracil

総論の部

緒言

アン트라サイクリン系抗悪性腫瘍薬である doxorubicin (Dox)は、広い抗腫瘍スペクトルを有することから、多くのがん化学療法に用いられる。しかしながら Dox は、骨髄抑制や心毒性などの重篤な副作用を引き起こす¹⁻²⁾。これら副作用を軽減するための薬物として、骨髄抑制に対しては granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)、心毒性に対しては Dox の投与によって生ずる活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS)除去作用を有する superoxide dismutase (SOD)のようなタンパク質等が有望視されている。このようなペプチドあるいはタンパク質性薬物は、その分子量の大きさが体内への簡便な投与を困難にしていることに加えて、投与後速やかに分解あるいは排泄を受けるため生物学的半減期がきわめて短く、その薬効の持続化が困難である。

近年における遺伝子工学技術の進歩により、多くの疾患における分子医学的側面や原因遺伝子が明確にされ始めている。こうした背景の中で、目的とする遺伝子を生体に対して間接的 (*ex vivo*)あるいは直接的 (*in vivo*)に導入することで治療を行う遺伝子治療が実用化されるに至っている。米国において、世界初の遺伝子治療としてアデノシンデアミナーゼ欠損症に対する遺伝子治療が行われて以来、その対象は先天的代謝異常にとどまらず、*p53* 遺伝子の導入による悪性腫瘍に対する治療などの後天的疾患に対しても拡大され、その種類は多岐にわたる³⁻⁸⁾。

多くの遺伝子治療では、遺伝子発現過程の最終産物であるタンパク質の発現および送達を目的としており、薬剤学的な観点から遺伝子治療を眺めた場合、従来のタンパク質製剤が抱えていた作

用持続化や標的部位へのターゲティングなどの諸問題を解決する可能性を秘めている。すでに遺伝子治療を応用した **drug delivery system (DDS)**が提案され、様々な疾患に対しての応用が検討されている。

しかしながら、これらの遺伝子治療の課題の一つとして、導入遺伝子の発現調節が挙げられている⁹⁾。すなわち、現段階では目的遺伝子を局所ならびに全身に送達することは可能であっても遺伝子導入後にその発現を制御することが困難とされている。

現在行われている遺伝子治療のベクターはウイルスベクターと非ウイルスベクターの2種類に大別される。前者は複製能を欠くように修飾された人工的なウイルスであり、良好な遺伝子導入効率および遺伝子発現効率を有し、安定した遺伝子発現が得られることから、多くの遺伝子治療において使用されている。しかしながら、毒性・免疫原性、導入後のウイルス複製の可能性など、その臨床応用に際しては多くの欠点も明らかにされてきている¹⁰⁾。一方、後者は前者に比べ遺伝子導入効率が低く発現が一過性であるという欠点を持つが、免疫原性や急性毒性が低く、構成成分が単純であり、また大量調製が容易であるなどの利点も有する。

一般に、真核細胞内での遺伝子発現制御は、細胞の恒常性維持とも密接に関連しており、複数の過程により制御されている。その過程のなかでも、DNA から RNA への転写過程は最も重要であり、*cis element* である DNA 配列そのものと *trans* 因子との相互作用による。*trans* 因子は DNA 結合性因子と DNA 非結合因子の2種に大別され、DNA との直接的、間接的相互作用により、転写過程を制御する。転写を制御する主要かつ直接的な要因は、基本転写因子、転写伸長因子、DNA 結合性の転写制御因子、転写因

子複合体に対して結合能を示すメディエーターなどである。このうち、DNA 結合性の転写制御因子は、標的 DNA 配列に特異的に結合する能力を有している。本研究で注目した activator protein 1(AP-1)は、前初期遺伝子産物である c-Fos および c-Jun のホモおよびヘテロダイマーとして構成される転写制御因子であり、12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA)により誘導されることで見出され、その特異的結合配列は TPA response element (TRE)と呼ばれている¹¹⁻¹³⁾。AP-1 は TPA に限らず、種々化学物質により誘導されることが報告されており、そのうち ROS が強力な AP-1 の誘導物質であることが明らかになっている¹⁴⁻²¹⁾。

非ウイルスベクターとして汎用されているもののひとつに、プラスミドベクターが挙げられる。プラスミドベクターを用いた遺伝子治療の場合、導入遺伝子の発現は、その上流に存在する種々ウイルスの long terminal repeat (LTR)により制御されており、種々転写因子がその重要な役割を果たしていると考えられている。すなわち、ウイルスの LTR が真核細胞におけるプロモーターの役割を担っている。本研究で注目した cytomegalovirus LTR (CMV-LTR) は、真核細胞内で高い遺伝子発現効率を示すプロモーター (CMV プロモーター) として、プラスミドベクター中の導入遺伝子上流に組み込まれることが多いプロモーターであるが、この配列中には TRE が存在している。従って、AP-1 は、CMV プロモーター駆動性のプラスミドベクターを組み込んだ真核細胞内で、導入遺伝子の発現制御に関与していると考えられる。

そこで本研究では、プラスミドベクターを用いた *ex vivo* 型遺伝子治療を想定し、遺伝子導入細胞へ Dox を負荷することで、Dox から発生する ROS によって誘導される AP-1 が CMV プロモータ

一の TRE へ結合し、下流遺伝子の発現を制御できるのではないかと考え、遺伝子治療において問題となっている導入遺伝子の発現制御を試みた。すなわち、Dox により CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御が可能であれば、Dox の副作用を軽減しうるタンパク質の遺伝子を CMV プロモーター下流に挿入することで、Dox の投与に同調した発現制御が期待できる。

本研究は、プラスミドベクターを用いて遺伝子導入した細胞に種々の薬物を負荷した際の導入遺伝子の発現挙動について詳細に解析し、抗悪性腫瘍薬による副作用の回避を目的とした遺伝子治療において導入遺伝子の発現を制御する方法の構築を目的とした。そこでまず、CMV プロモーター駆動性遺伝子導入細胞に対して Dox を負荷した際の AP-1 の前初期遺伝子産物である *c-fos* および *c-jun* mRNA 転写量の変化について検討した。その結果、Dox によって AP-1 前初期遺伝子および CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現が誘導されることを見出した。また、CMV プロモーター駆動性遺伝子導入細胞に Dox を負荷した後にその負荷を中止することで、Dox によって誘導された AP-1 前初期遺伝子および CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現が抑制されることを明らかにした。続いて、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御過程に ROS が深く関与していることを確かめるため、ROS 発現系として汎用されている paraquat (PQ) を CMV プロモーター駆動性遺伝子導入細胞へ負荷したときの AP-1 前初期遺伝子および CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量の変化について検討した。その結果、PQ の負荷によって AP-1 の前初期遺伝子および CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現が誘導されること、両者の間に相関関係が存在することを見出した。続いて、Dox と異なる

る作用機序を持つ種々の抗悪性腫瘍薬を負荷した際の導入遺伝子の発現挙動を解析した。その結果、特定の抗悪性腫瘍薬でのみ導入遺伝子が誘導されることが明らかとなった。さらに、Dox および PQ 負荷による CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現誘導と ROS との関連性について検討するため、ROS の除去作用を有する free radical scavenger と共負荷時の導入遺伝子発現挙動を解析した。その結果、Dox および PQ によって誘導された CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現が、free radical scavenger の共負荷により一部抑制されることを見出した。最後に、実際の Dox による心毒性の軽減を目指し、CMV プロモーター下流にヒト *Cu Zn-SOD* cDNA を持つベクターを導入した細胞へ PQ を負荷した。その結果、導入遺伝子由来の SOD 活性の上昇を認めた。

以上、本研究によって、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御過程の一部が明らかとなり、Dox によって導入遺伝子の発現制御が可能であることが示唆された。本研究結果は、これまでに提案されている薬物応答性プロモーターを利用した導入遺伝子の発現制御とは異なり、薬物から従属的に発生する物質によって導入遺伝子の発現を制御するという新規ストラテジーを提案するものであり、遺伝子治療の問題点とされている導入遺伝子の発現制御について、基礎的知見および有用な情報をもたらすものと考えられる。

以下、これらの結果を四編にわたり論述する。

第 1 編 アンストラサイクリン系抗悪性腫瘍薬の負荷による AP-1 前初期遺伝子および CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現挙動解析²²⁾

第 1 章 遺伝子導入皮膚線維芽細胞への Dox 負荷および Dox 負荷中止による AP-1 前初期遺伝子および CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現挙動解析

Ex vivo 遺伝子治療法は、患者より採取した細胞に対して、目的とする遺伝子を導入した後に再び体内に移植する方法であるため、遺伝子導入細胞として造血幹細胞などの血球系細胞をはじめとして皮膚線維芽細胞、角化細胞、肝細胞、神経細胞、肺細胞、さらにはがん細胞などのなかから選択することが可能である²³⁾。このうち、皮膚線維芽細胞は患者からの採取ならびに培養増殖の技術が簡便であり、皮膚移植においてもその手法が確立されているため、局所への遺伝子送達においての適切な遺伝子導入細胞である。また、遺伝子修飾細胞を移植した後に予期せぬ副作用が発現した場合、遺伝子導入細胞として血球系細胞などを用いたときでは移植片の除去は非常に困難であるが、皮膚線維芽細胞を用いた場合では移植片の除去が簡便であり、投与後における未知なる副作用の回避が可能である²⁴⁻²⁵⁾。以上の理由から、遺伝子導入細胞として皮膚線維芽細胞を選択した。

悪性腫瘍に対する治療戦略は、外科的切除療法、放射線療法および抗悪性腫瘍薬によるがん化学療法に大別され、これらを単独あるいは組み合わせて治療することが一般的である。このうち、抗悪性腫瘍薬を用いたがん化学療法は、切除不能あるいは再発固

形がんや造血器腫瘍などに多く施行される。

がん化学療法を行う目的は、がん細胞の増殖、浸潤、転移を抑え、究極的には患者を死から救うことにある²⁶⁾。がん化学療法に用いられる抗悪性腫瘍薬の種類は非常に多く、アルキル化薬、代謝拮抗薬、天然物由来物質、ホルモンおよびホルモン拮抗薬、分子標的治療薬、生物学的応答修飾物質 (biologic response modifier) などがある。このうち、天然物由来物質に属し、抗腫瘍性抗生物質である Dox は、広い抗腫瘍スペクトルを有し、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、急性白血病といった造血器腫瘍のみならず、乳がん、卵巣がん、小細胞肺癌、胸腺がんなどの固形がんにも用いられる²⁷⁾ (Fig. 1)。しかしながら、Dox は骨髄抑制や心筋細胞におけるアポトーシスが原因の心毒性など、重篤な副作用を引き起こす¹⁻²⁾。これは臨床使用する上で大きな問題点であり、Dox の潜在的能力を制限している原因のひとつである²⁸⁾。さらに、Dox の副作用は、ミトコンドリアの電子伝達系において一電子還元された semiquinone 型から生成される superoxide anion が関連しているとされており、生体内で ROS を発生させることに起因しているといわれている²⁹⁻³⁰⁾。

がんに対する遺伝子治療を含め、現在の遺伝子治療の問題点として遺伝子導入後の発現制御が挙げられている³¹⁾。また、Dox から発生する ROS は、転写制御因子の AP-1 を誘導することが報告されている¹⁴⁻²¹⁾。さらに、今回注目した CMV プロモーターには AP-1 結合部位である TRE が存在し、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御過程への AP-1 の関与が推察される。そこでまず、CMV プロモーター下流にオワンクラゲ (*Aequoria victoria*) 由来の green fluorescent protein (GFP) の変異体である red-shifted green

fluorescent protein (rsGFP)をレポーターとして用いた発現系を構築し、この遺伝子導入細胞に Dox を負荷した際の AP-1 前初期遺伝子および CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量の変化について検討した。また、導入遺伝子の発現制御を可能とするためには、遺伝子誘導物質によって誘導された遺伝子の発現を、誘導物質の除去によって速やかに基礎発現レベルまで低下させる必要があることから、Dox 負荷中止後の発現挙動についても検討した。

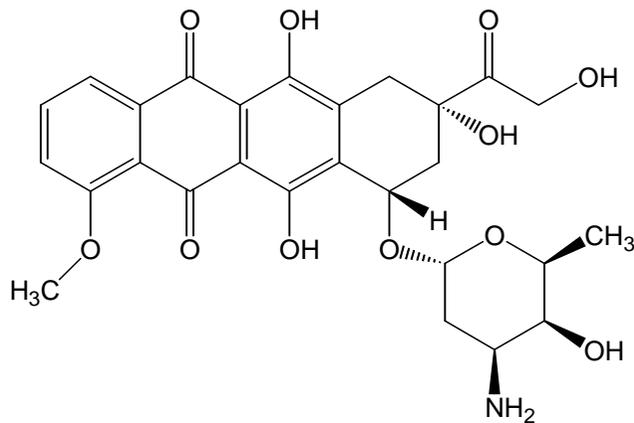


Fig. 1 Chemical structure of Dox (MW: 543.52).

第1節 皮膚線維芽細胞への遺伝子導入

本研究で用いたプラスミドベクターpQBI25は、レポーター遺伝子である *rsGFP* のほかに、アンピシリン耐性遺伝子 (*Amp^r*) を有している(Fig. 2)。このためプラスミドの大量調製は、*E. coli* competent cell に形質転換後、アンピシリン含有LB寒天培地上に出現したコロニーを採取し、アンピシリン含有LB培地にて大量培養後、アルカリ法にて精製した。調整したプラスミドは、0.8%アガロース電気泳動にて確認し (Fig. 3-A)、さらに、調整したプラスミドを鋳型として polymerase chain reaction (PCR)法により解析したところ、*rsGFP* に由来した単一のバンドを認めたことから、目的としたプラスミドが得られていることを確認した(Fig. 3-B)。

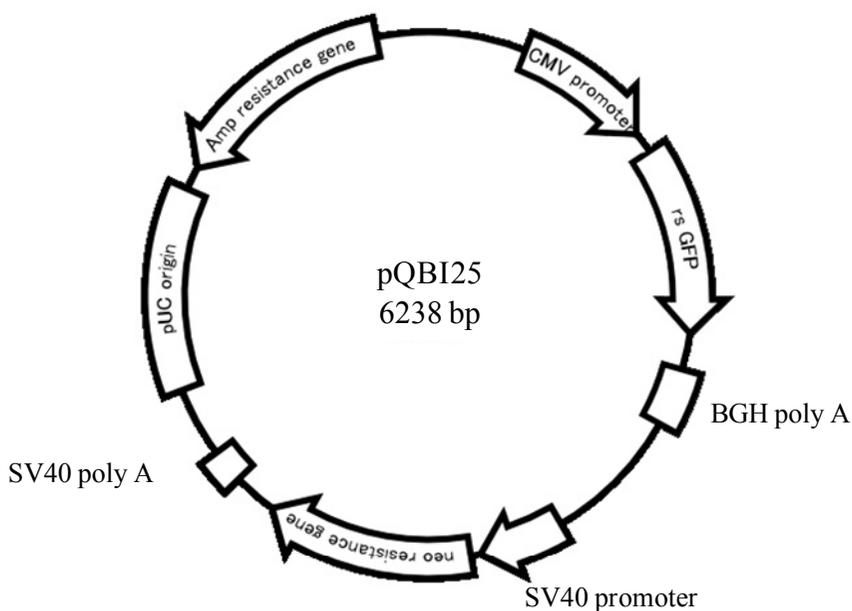


Fig.2 Structure of pQBI25.
BGH; bovine growth hormone.

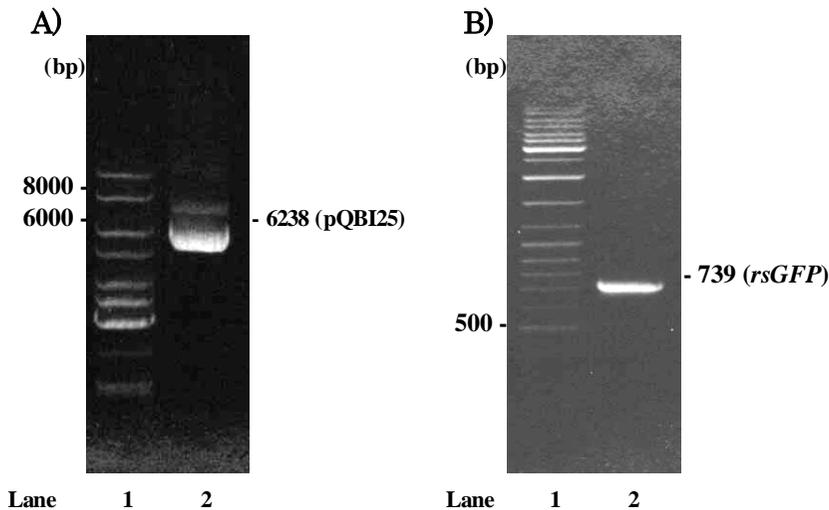


Fig. 3 Confirmation of pQBI25. A) Detections of pQBI25 vector by 0.8% agarose gel electrophoresis. The gel was stained with ethidium bromide and visualized on a transilluminator. Lanes: 1, DNA size marker; 2, purified pQBI25 vector. B) Detections of *rsGFP* gene in pQBI25 by 2% agarose gel electrophoresis after PCR. The gel was stained with ethidium bromide and visualized on a transilluminator. Lanes: 1, DNA size marker; 2, PCR product.

ラット皮膚由来線維芽細胞 (FR 細胞, ATCC CRT 1213)へのトランスフェクションは、hemagglutinating virus of Japan (HVJ) -liposome を用いて行った。本検討で用いたプラスミドベクター pQBI25 は、レポーター遺伝子である *rsGFP* のほかに、ネオマイシン耐性遺伝子 (*Neo^r*)を有しているため、Geneticin (G418)の持つ細胞毒性を中和することが可能である。この性質を利用して、トランスフェクション 48 時間後より G418 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)による選択培養を開始し、2 週間継続後にカップ法を用いたクローニングによって、monocline (FR-pQBI25-H 細胞)を得た。*rsGFP* は、それ自身が蛍光を発するタンパク質であり、遺伝子発現を蛍光顕微鏡下で確認すること

が可能であるため、リポフェクション後における導入遺伝子の発現確認を蛍光顕微鏡下で行った。その結果、今回得られた FR-pQBI25-H細胞が rsGFP を発現していることを確認した。また、FR-pQBI25-H 細胞より調製した全 RNA を reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法にて解析した。その結果、*rsGFP* cDNA に基づく mRNA に由来した単一バンドが検出されたことから、FR-pQBI25-H 細胞における rsGFP の発現が確認された(Fig. 4)。

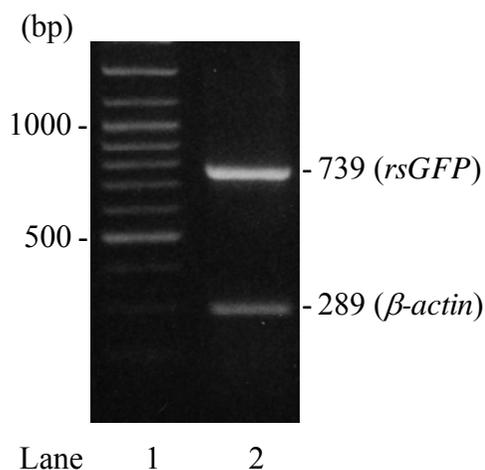


Fig. 4 Confirmation of expression of *rsGFP* in FR-pQBI25-H cells. Detections of *rsGFP* mRNA by RT-PCR. RT-PCR product had electrophoresis on 2 % agarose gel. The gel was stained with ethidium bromide and visualized on a transilluminator. Lanes: 1, DNA size marker; 2, RT-PCR product.

本章では、細胞への遺伝子導入法として安全性と簡便性および導入効率を考慮して HVJ-liposome 法を選択し、この方法を用いた遺伝子修飾皮膚線維芽細胞の調製に関して基礎的検討を行った。

今回用いた HVJ-liposome 試薬である GenomeONE™-Neo は、mild detergent 処理と遠心力によって HVJ envelope (HVJ-E)内に封入された vector が標的細胞に接触し、HVJ-E の HN タンパク質が、標的細胞膜上のシアル酸レセプターと特異的に結合する働きを有する(Fig. 5)³²⁻³³。その後、F タンパク質の働きによって膜融合が起こり、細胞質へ導入されるものと考えられている。また、HVJ-E が細胞に結合するために必要なシアル酸レセプターは、ほとんどの動物細胞の細胞膜上に存在するとされており、幅広い対象に対しての適用が可能である³⁴。

HVJ-liposome 法では、カチオン性脂質によるトランスフェクションで起こるリソソームによる分解を受けないため、導入効率が高く、合成核酸やタンパク質を 70%以上の効率で導入することが可能である³²。本研究においても、遺伝子導入後 12 カ月以上にわたって *rsGFP* mRNA の発現が認められたことから、HVJ-liposome 法を用いた遺伝子導入は、長期にわたり安定した発現が得られる有用な遺伝子導入法であることが示唆された。したがって、HVJ-liposome 法を用いて作成した遺伝子導入細胞は、*ex vivo* 型遺伝子治療に応用する際に、12 か月以上の薬効維持が期待できるものと考えられる。

オワンクラゲより単離された GFP は、非放射性で、経時的な検出が可能な生体物質由来の分子マーカーであり、従来、遺伝子発現のレポーター分子として用いられてきたルシフェラーゼに代表される酵素反応とは異なり、その蛍光の発光に基質やコファクターを必要とせず、生きている細胞や組織中でも、励起光だけで蛍光を発し、蛍光顕微鏡下にて容易に検出可能であるという利点を有することから、近年多く用いられているレポーター遺伝子

である³⁵⁾。さらに今回用いた野生型 GFP の変異体である rsGFP は、野生型 GFP と比較して蛍光強度が高く退色に対する耐性が高いといわれている³⁶⁻³⁷⁾。GFP 類の発色団は、アミノ酸 Ser65、Tyr66 および Gly67 で形成されるトリペプチドからなり、翻訳直後は蛍光性を示さず、酸素分子が存在する場での翻訳後修飾が必要である²⁹⁾。rsGFP はそのアミノ酸配列中に F64L、S65C、I168T という三カ所の変異部位を有しており、野生型 GFP と比べ強い蛍光を発する。また今回用いた pQBI25 は、rsGFP 上流に CMV プロモーターを持ち、これを利用して哺乳類の細胞内で発現する。以上の理由からレポーター遺伝子として rsGFP を用いた発現系を構築し、CMV プロモーター駆動性の rsGFP の発現について、蛍光顕微鏡下で発現が観察されたこと、また RT-PCR により rsGFP cDNA に基づく mRNA に由来した単一のバンドを認めたことから、FR-pQBI25-H 細胞内での発現が確認され、rsGFP が皮膚線維芽細胞の適切なレポーター遺伝子であることが明らかとなった。

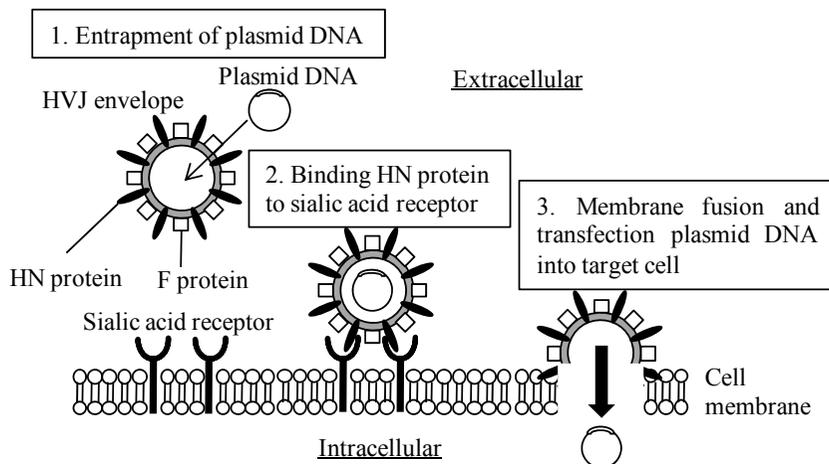


Fig. 5 Schematic representation showing the mechanism of transfection to mammalian cells using HVJ-E

第2節 Dox 負荷および Dox 負荷中止による AP-1 前初期遺伝子発現量の変化

FR-pQBI25-H 細胞に対して、Dox を負荷した際の AP-1 前初期遺伝子発現量の変化について検討した。すなわち、FR-pQBI25-H 細胞に 0.1 μM の Dox を 96 時間連続負荷し、RT-PCR 法にて、*c-fos* および *c-jun* mRNA 転写量を測定した (experiment 1) (Fig. 6)。また、FR-pQBI25-H 細胞に対して、Dox を負荷し、その後 Dox 負荷を中止した際の AP-1 前初期遺伝子発現量の変化について検討した。すなわち、FR-pQBI25-H 細胞に 0.1 μM の Dox を 48 時間連続負荷し、その後 Dox の負荷を中止した際の *c-fos* および *c-jun* mRNA 転写量を測定した (experiment 2) (Fig. 6)。

その結果、Dox 96 時間連続負荷実験 (experiment 1) における *c-fos* mRNA 転写量は、Dox 負荷 24 時間後から control に比べて有意に増加し、96 時間後まで誘導効果が持続した (Fig. 7)。また、*c-jun* mRNA 転写量は、Dox 負荷 48 時間後から control に比べて有意に増加し、96 時間後まで誘導効果が持続した (Fig. 8)。

Dox 48 時間負荷後の負荷中止実験 (experiment 2) においては、Dox 負荷開始 72 時間後 (Dox 負荷中止 24 時間後) および 96 時間後 (Dox 負荷中止 48 時間後) における Dox 負荷中止群の *c-fos* mRNA 転写量は、Dox 連続負荷群のそれと比較して有意な差は認められなかったものの、control と同程度まで低下した (Fig. 7)。また、Dox 負荷開始 72 時間後 (Dox 負荷中止 24 時間後) における Dox 負荷中止群の *c-jun* mRNA 転写量は、Dox 連続負荷群のそれと比較して有意な差は認められなかったものの、control と同程度まで低下し、Dox 負荷開始 96 時間後 (Dox 負荷中止 48 時間後)

では、Dox 連続負荷群と比較して有意に低下した (Fig. 8)。

以上のように、FR-pQBI25-H 細胞に対して Dox を 96 時間負荷すると、AP-1 前初期遺伝子である *c-fos* および *c-jun* mRNA 転写量が増加し、その効果が長時間持続することが明らかとなった。さらに *c-fos* mRNA 転写量は、Dox の負荷中止によって緩やかに減少したが、*c-jun* mRNA 転写量は、Dox の負荷中止によって速やかに減少した。この違いは、両者の発現機序の違いによるものと推察される。Dox が細胞内で ROS を発生すること、ROS によって AP-1 の誘導されることを踏まえると、Dox による *c-fos* および *c-jun* mRNA 転写量の増加は、従属的に発生する ROS がその一部に参与していると考えられた。

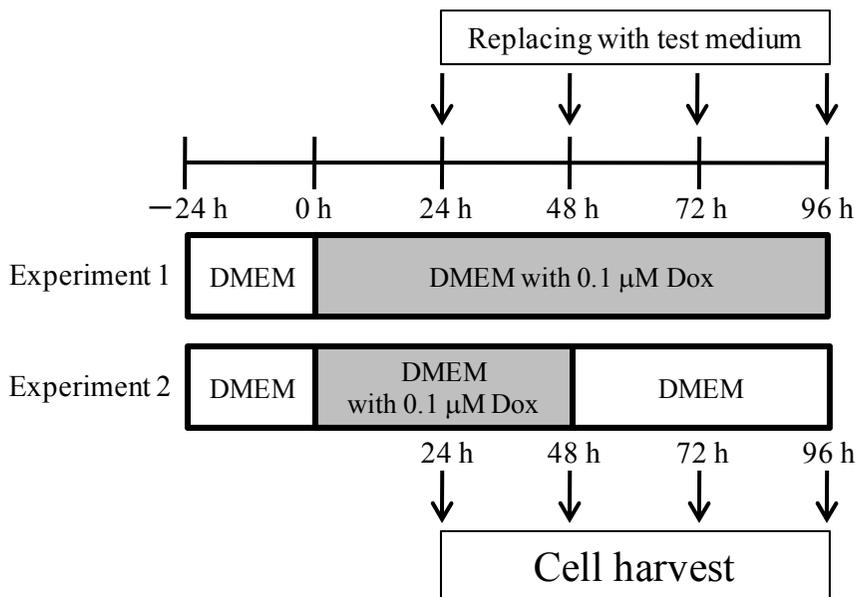


Fig. 6 Experimental model of Dox exposure and cessation of Dox exposure

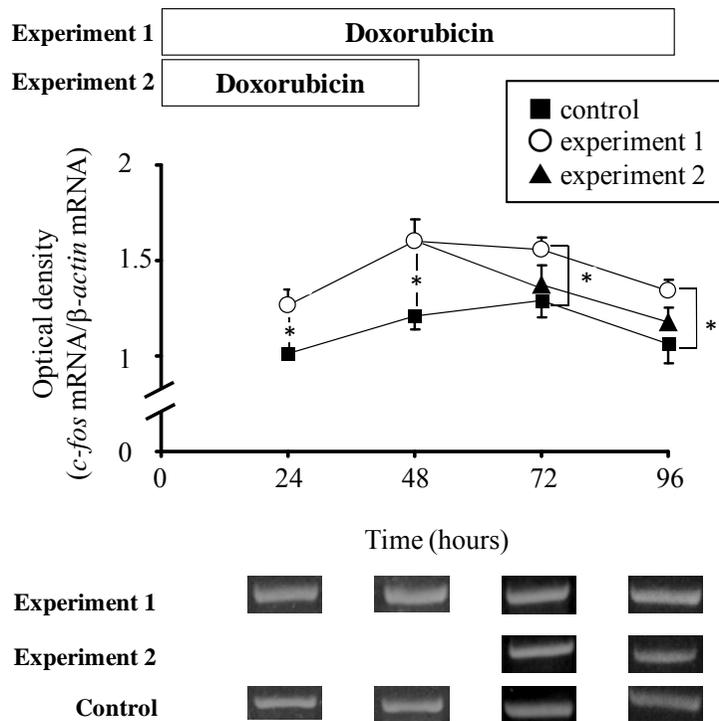


Fig. 7 Effects of Dox treatment on *c-fos* mRNA expression in FR-pQB125-H cells. The graph shows the time course of *c-fos* mRNA expression. Each point represents mean \pm SEM. (n = 4-11). *p < 0.05. The lower panel shows representative images of PCR products representing the *c-fos* cDNA in these experimental conditions.

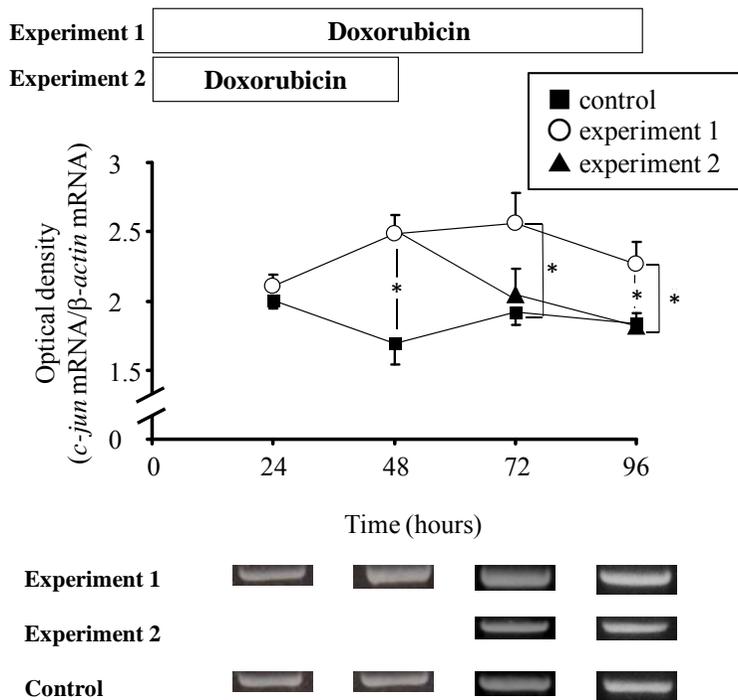


Fig. 8 Effects of Dox treatment on *c-jun* mRNA expression in FR-pQBI25-H cells. The graph shows the time course of the levels of *c-jun* mRNA expression. Each point represents mean \pm SEM. (n = 4–11). *p < 0.05. The lower panel shows representative images of PCR products representing *c-jun* cDNA in these experimental conditions.

第3節 Dox 負荷および Dox 負荷中止による CMV プロモーター駆動性遺伝子発現量の変化

FR-pQBI25-H 細胞に対して、前節と同様の実験を行った際の CMV プロモーター駆動性遺伝子産物である *rsGFP* mRNA 転写量および *rsGFP* タンパク量の変化について検討した (Fig. 6)。

その結果、Dox 96 時間連続負荷実験 (experiment 1) における *rsGFP* mRNA 転写量は、Dox 負荷 24 時間後から control に比べて有意に増加し、96 時間後まで時間依存的な誘導効果を示した (Fig. 9)。また、*rsGFP* タンパク量も同様に、Dox 負荷 24 時間後から control に比べて有意に増加し、96 時間後まで時間依存的な誘導効果を示した (Fig. 10)。

Dox48 時間負荷後の負荷中止実験 (experiment 2) においては、Dox 負荷開始 72 時間後 (Dox 負荷中止 24 時間後) および 96 時間後 (Dox 負荷中止 48 時間後) における Dox 負荷中止群の *rsGFP* mRNA 転写量は、control よりも高いレベルで推移したものの、Dox 連続負荷群のそれと比較して低下する傾向が認められた (Fig. 9)。さらに、Dox 負荷開始 72 時間後 (Dox 負荷中止 24 時間後) および 96 時間後 (Dox 負荷中止 48 時間後) における Dox 負荷中止群の *rsGFP* タンパク量は、control と比べて有意に高いレベルで推移したものの、Dox 連続負荷群のそれと比較して有意に低下した (Fig. 10)。

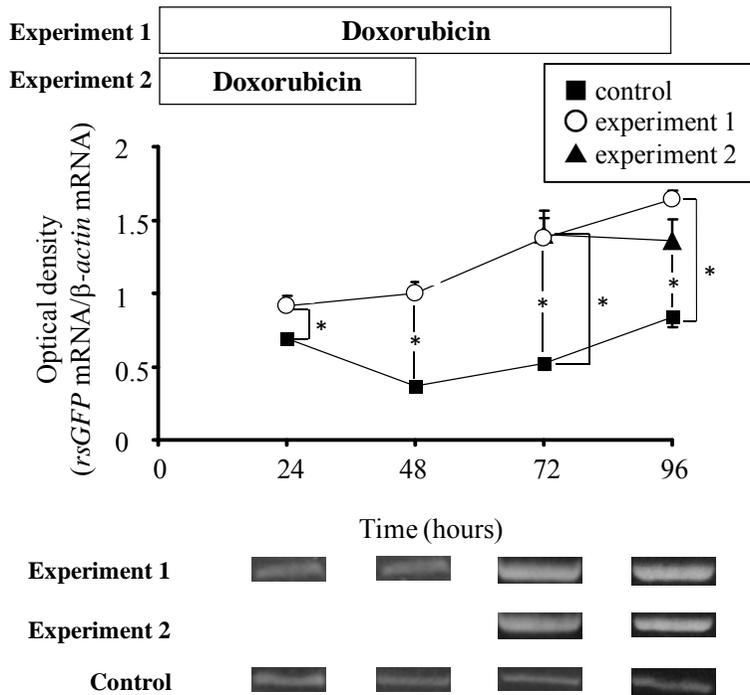


Fig. 9 Effects of Dox treatment on *rsGFP* mRNA expression in FR-pQBI25-H cells. The graph shows the time course of *rsGFP* mRNA expression. Each point represents mean \pm SEM. (n = 4–11). * p < 0.05. The lower panel shows representative images of PCR products representing *rsGFP* cDNA in these experimental conditions.

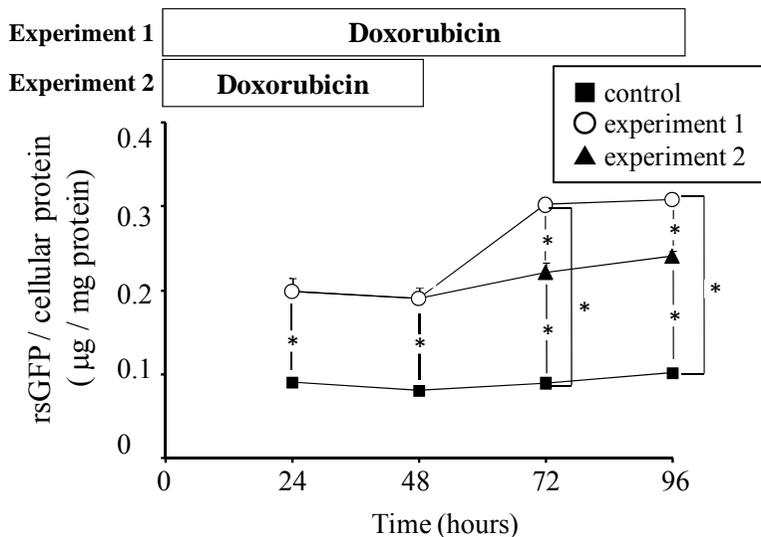


Fig. 10 Effects of Dox treatment on rsGFP protein levels in FR-pQBI25-H cells. Each point represents mean \pm SEM (n = 4–11). * p < 0.05.

FR-pQBI25-H 細胞に対して Dox を 96 時間負荷すると、CMV プロモーター駆動性遺伝子である *rsGFP* mRNA 転写量および rsGFP タンパク質が持続的に増加することが明らかとなった。Dox の負荷中止実験においては、*rsGFP* mRNA 転写量は有意に低下することはなかったが、Dox の負荷中止とともに減少していく傾向がみられた。一方、rsGFP タンパク量は、Dox の負荷中止によって、Dox を 96 時間連続負荷した時と比べて有意に低下した。これらの結果から、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現を Dox によって制御できる可能性が示された。

Li らは p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) によってリン酸化された AP-1 の CMV プロモーターに対する親和性をゲルシフトアッセイ法にて検討し、AP-1 が CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現に関与していると述べている³⁹⁾。また、Kim らは、

CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現が、Dox によって誘導されることを報告している⁴⁰⁾。さらに Kim らは、Dox によって nuclear factor κ B (NF κ B)が誘導されることも示している。緒言にて述べたように、CMV プロモーターには AP-1 結合部位である TRE が存在するため、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御には、AP-1 の関与が強く示唆される。しかしながら、CMV プロモーターには、TRE のみならず NF κ B の結合 motif も存在している。前節では、Dox の負荷中止によって AP-1 前初期遺伝子の発現量、特に *c-jun* mRNA 転写量が速やかに基礎発現レベルまで低下することを示した。一方、本節では、CMV プロモーター駆動性遺伝子を導入した皮膚線維芽細胞に Dox を負荷した際に、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現が誘導され、Dox の負荷中止によって CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現が低下することを示したが、その発現レベルは基礎発現レベルよりは高い値を示した。この理由として、Kim が報告しているように、Dox 負荷により NF κ B が誘導され、かつその効果が Dox 負荷中止後も遷延したために NF κ B を介した CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現が速やかに低下しなかったこと、あるいは、翻訳された c-Fos および c-Jun タンパク質から生成された AP-1 の効果が遷延していることなどが考えられる。したがって、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御には、AP-1 のみならず NF κ B あるいはその他の転写因子が複合的に関与していることが示唆された。しかしながら、これらについては、今後 western blotting 法などを用いたより詳細な検討が必要であろう。

抗悪性腫瘍薬による副作用は重篤なものが多く、Dox も好中球減少症や心毒性といった重篤な副作用を惹起する¹⁻²⁾。臨床にお

けるがん化学療法では、抗悪性腫瘍薬の投与により好中球減少症が発現した場合には G-CSF が投与され、好中球の速やかな回復を図る。本編で示す結果の通り、Dox によって CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御の可能性が見出された。したがって、CMV プロモーター下流に *G-CSF* 遺伝子を導入したベクターで細胞に遺伝子修飾を施し、Dox を含むレジメンで化学療法を施行する前に患者に移植しておくことで、Dox の投与により G-CSF の発現が誘導され、Dox の投与中止により G-CSF の発現が抑制されるという、導入遺伝子の発現制御が可能であると考えられる。また、Dox に特徴的な副作用である心毒性は、Dox から二次的に発生する ROS が深く関与しているとされる。そのため、SOD のような ROS 除去作用を有するタンパク質の遺伝子を用いることで、Dox による心毒性軽減あるいは予防を目的とする遺伝子治療に対しても応用可能であると考えられる。このように、抗悪性腫瘍薬の副作用軽減のための遺伝子治療の構築が可能となると思われる。

第4節 小括

HVJ-liposome を用いて CMV プロモーター駆動性のプラスミドベクターを FR 細胞へ導入した結果、12 か月以上にわたって導入遺伝子を安定して発現させることができた。したがって、この手法による *ex vivo* 型遺伝子治療では、12 か月以上の薬効維持が期待できることが示唆された。

また、FR-pQBI25-H 細胞に対して Dox を負荷した際に、AP-1 前初期遺伝子の発現誘導が起こること、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現誘導が起こることが明らかとなった。さらに、Dox の負荷中止によって、AP-1 前初期遺伝子および CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量が低下することが明らかとなった。これらの結果から、Dox 負荷により AP-1 活性が上昇すること、さらには、Dox によって上昇した AP-1 を介して CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現を制御できることが示唆された。したがって、CMV プロモーターを有するベクターを用いた発現系において、Dox による導入遺伝子の発現制御が可能であることが示唆された。

第2章 遺伝子導入肝細胞への Dox 負荷による CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現挙動解析

Ex vivo 遺伝子治療では、患者から採取した細胞に遺伝子修飾を施したのちに再び体内に移植する。特に、悪性腫瘍を対象疾患とした遺伝子治療では、標的細胞としてがん細胞を用いることもある。我が国における初の悪性腫瘍に対する遺伝子治療においても、患者から摘出したがん細胞に **granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)** を導入し、再び患者に戻すという方法がとられている⁴¹⁾。

第1章は、ラット由来の細胞を用いた検討であった。本章では、Dox による CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現誘導に関する細胞特異性について検討するため、ヒト肝がん由来細胞である HepG2 細胞 (RCB0459) に CMV プロモーター駆動性遺伝子を有するベクター (Fig. 11) を導入し、これに Dox を負荷した際の CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現挙動について検討した。

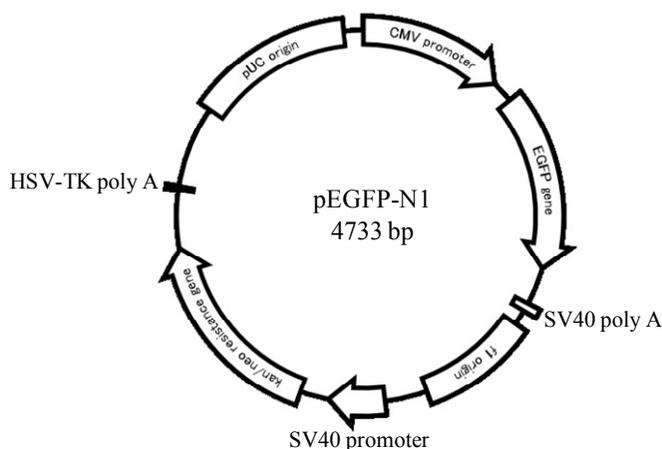


Fig. 11 Structure of pEGFP-N1.
HSV-TK; herpes simplex virus thymidine kinase

第1節 肝細胞への遺伝子導入

本章で用いたプラスミドベクターpEGFP-N1は、レポーター遺伝子である *enhanced GFP (EGFP)* のほかに、カナマイシン/ネオマイシン耐性遺伝子を有している (Fig. 11)。また、*EGFP* 遺伝子上流に *CMV* プロモーターを有していることから、pQBI25 と類似した形状である。以上の理由から、ここではベクターとして pEGFP-N1 を選択し、HepG2 細胞へ導入することとした。

HepG2 細胞へのトランスフェクションには、electroporation 法を用いた。pEGFPN-1 は、pQBI25 と同様に *Neo^r* を有しているため、G418 の持つ細胞毒性を中和することが可能である。この性質を利用して、トランスフェクション 48 時間後より G418 含有 DMEM による選択培養を開始し、2 週間継続後にカップ法を用いたクローニングによって、monoclonal (HepG2-pEGFP 細胞) を得た。トランスフェクション後における導入遺伝子の発現確認は、蛍光顕微鏡下で行った。その結果、今回得られた HepG2-pEGFP 細胞が EGFP を発現していることを確認した。

EGFP は、野生型 GFP と比較して F64L、S65T という 2 つのアミノ酸変異を持ち、これにより強い蛍光強度を発揮する⁴²⁾。HepG2-pEGFP 細胞は、蛍光顕微鏡下での観察で強い蛍光を発したことから、ヒト肝細胞において、EGFP が適切なレポーター遺伝子であることが明らかとなった。

第2節 Dox 負荷による CMV プロモーター駆動性遺伝子発現量の変化

前節で樹立した HepG2-pEGFP 細胞に対して、Dox を負荷した際の CMV プロモーター駆動性遺伝子発現量の変化について検討した。すなわち、HepG2-pEGFP 細胞に 0.1 μM の Dox を 48 時間負荷し、蛍光光度法にて EGFP タンパク量を測定した。

その結果、EGFP タンパク量は、Dox 負荷により control と比べて 3.3 倍と有意に増加した(Fig. 12)。また、回収直前の細胞を蛍光顕微鏡下で観察したところ、Dox 負荷によって EGFP 遺伝子発現が誘導されている様子が確認された (Fig. 13)。

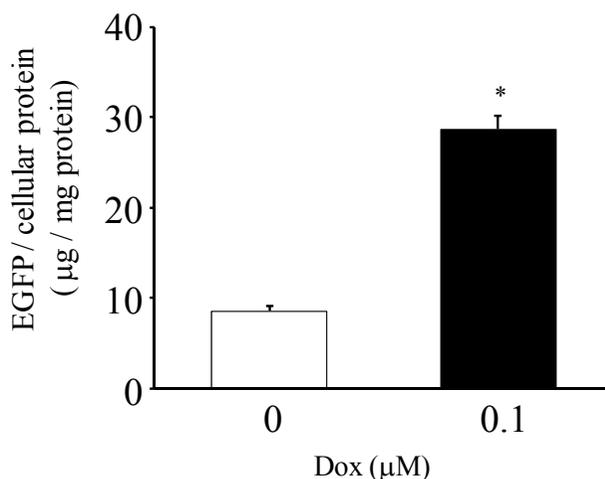


Fig. 12 Effects of Dox treatment on EGFP protein levels in HepG2-pEGFP cells. Each bar represents mean \pm SEM (n = 4). *p < 0.05.

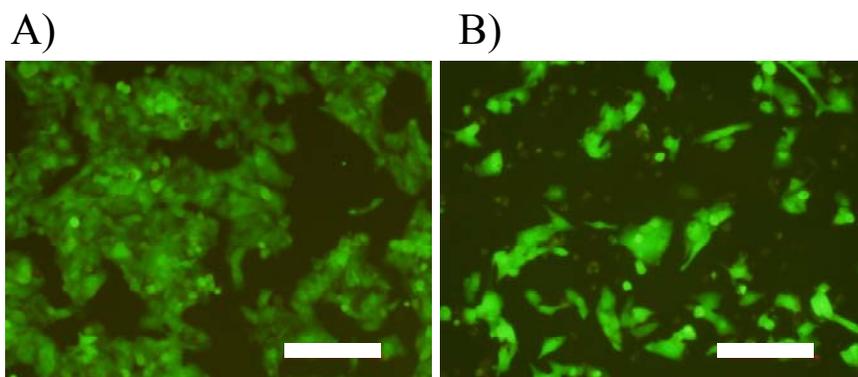


Fig. 13 Fluorescence-microscopic observation of HepG2-pEGFP cells.
(A) control condition, (B) 0.1 μ M Dox condition. Scale bars show 200 μ m.

本節では、ヒト肝がん由来細胞に CMV プロモーター駆動性遺伝子を導入し、Dox による導入遺伝子の変化について検討したが、ラット由来細胞である FR-pQBI25 細胞と同じく、Dox 負荷により導入遺伝子の発現誘導が観察された。さらにその誘導強度も FR-pQBI25 細胞とほぼ同等であった。

第3節 小括

HepG2-pEGFP 細胞に対して Dox を負荷した際に、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現誘導が起こることが明らかとなった。前章で示した通り、ラット由来細胞である FR-pQBI25-H 細胞に Dox を負荷した際の CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現誘導強度は約 3 倍であった。これは、本章で示したヒト由来細胞である HepG2-pEGFP 細胞での結果と同程度の誘導強度であり、これらの結果から、Dox による CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現誘導は、細胞種によらず観察されることが明らかとなった。

第2編 活性酸素刺激による AP-1 前初期遺伝子および CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現挙動解析⁴³⁾

第1章 遺伝子導入皮膚線維芽細胞への活性酸素刺激による AP-1 前初期遺伝子および CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現挙動解析

ビピリジニウム系除草剤の PQ は、細胞内に取り込まれたのちに NADPH および酸素とともに酸化還元反応を繰り返すことで ROS 発生する機能を持つ (Fig. 14)。このため PQ は、*in vitro* および *in vivo* での ROS 負荷実験におけるモデル化合物として汎用されている。また PQ は、AP-1 を誘導することも報告されている⁴⁴⁾。

第1編では、アンスラサイクリン系抗悪性腫瘍薬である Dox によって、AP-1 前初期遺伝子および CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現が誘導されることを示した。この原因として、Dox から従属的に発生する ROS の関与が示唆された。

そこで本編では、遺伝子修飾細胞に対して PQ を作用させたときの AP-1 前初期遺伝子と導入遺伝子の発現量の変化について検討した。また、AP-1 前初期遺伝子発現量と導入遺伝子発現量の関連性について検討した。

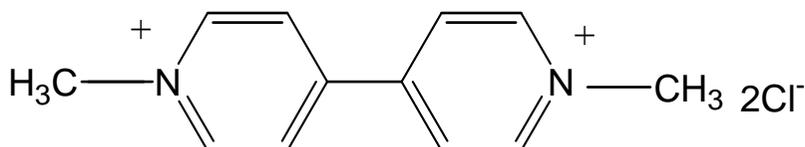


Fig. 14 Chemical structure of PQ (MW: 257.6).

第 1 節 皮膚線維芽細胞への遺伝子導入

第 1 編では、FR 細胞へのトランスフェクションとして HVJ-liposome 法を選択したが、本編では正電荷リポソームである TransFast™ を用いたトランスフェクションを行った。ベクターは、第 1 編で用いた pQBI25 とした。トランスフェクション 48 時間後より G418 含有 DMEM による選択培養を開始し、2 週間継続後にカップ法を用いたクローニングによって、monoclone (FR-pQBI25-L 細胞) を得た。トランスフェクション後における導入遺伝子の発現確認は、蛍光顕微鏡での観察と RT-PCR 法にて行った。その結果、蛍光顕微鏡下で rsGFP の発現を認め、今回得られた FR-pQBI25-L 細胞が rsGFP を発現していることを確認した。また、RT-PCR 法にて *rsGFP* cDNA に基づく mRNA に由来した単一バンドが検出されたことから、FR-pQBI25-L 細胞における *rsGFP* の発現が確認された(Fig. 15)。

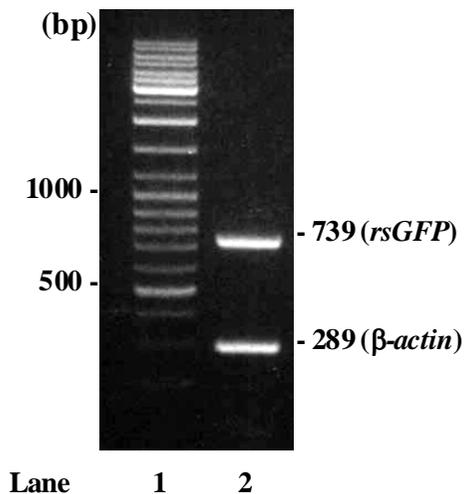


Fig. 15 Confirmation of expression of *rsGFP* in FR-pQB125-L cells. Detections of *rsGFP* mRNA by RT-PCR. RT-PCR product had electrophoresis on 2 % agarose gel. The gel was stained with ethidium bromide and visualized on a transilluminator. Lanes: 1, DNA size marker; 2, RT-PCR product.

本章では、細胞への遺伝子導入法として安全性と簡便性を考慮してリポフェクション法を選択し、この技術を用いた遺伝子修飾皮膚線維芽細胞の調製に関して基礎的検討を行った。

今回用いた TransFast™ はカチオン性脂質である (+)-N,N[bis (2-hydroxyethyl)]-N-methyl -N-[2, 3- di(tetradecanoyloxy)propyl] ammonium iodide (Fig. 16) と非電荷脂質である L-dioleoyl phosphatidylethanoamine (DOPE) を含むリポソームであり、導入する遺伝子を含有する DNA と正電荷を有する複合体を形成し、負の表面電荷を有する細胞膜と静電的に接着し、その後膜融合を起こして細胞内に DNA が送達されるものと考えられている⁴⁵⁾。リポフェクション法による遺伝子導入では、その発現が一過性であるとされていたが、現在ではその一部がゲノム DNA に組み込

まれることにより安定な発現が認められるとされている。本研究においても、遺伝子導入後3ヶ月以上にわたり *rsGFP* mRNA の発現が認められたことから、皮膚線維芽細胞へのリポフェクション法を用いた遺伝子導入は、HVJ-liposome 法と同じく長期にわたり安定した発現が得られる有用な遺伝子導入法であると考察された。一方、リポフェクション法の問題点の一つとして、リポソームによる細胞傷害性が挙げられる。しかしながら、今回の遺伝子導入操作中に明確な細胞傷害性は確認されず、TransFast™ を用いた FR 細胞へのリポフェクション法による遺伝子導入は有用性が高いものと考察された。

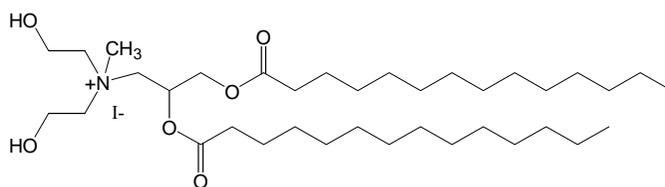


Fig. 16 Structure of the synthetic cationic lipid component of the TransFast™ Reagent

第2節 PQ 負荷による AP-1 前初期遺伝子発現量の変化

前節で樹立した FR-pQBI25-L 細胞に対して、PQ を負荷した際の AP-1 前初期遺伝子の発現量の変化について検討した。すなわち、FR-pQBI25-L 細胞に 5, 20 および 50 μM の PQ を 24 時間負荷し、RT-PCR 法にて、*c-fos* および *c-jun* mRNA 転写量を測定した。

その結果、*c-fos* および *c-jun* mRNA 転写量は、各 PQ 濃度ともに control に比べて有意に増加した (Fig. 17, 18)。*c-fos* mRNA 転写量は、control に比べて 1.5-1.9 倍に増加した (Fig. 17)。また、*c-jun* mRNA 転写量は、control に比べて 1.5-1.6 倍に増加した (Fig. 18)。

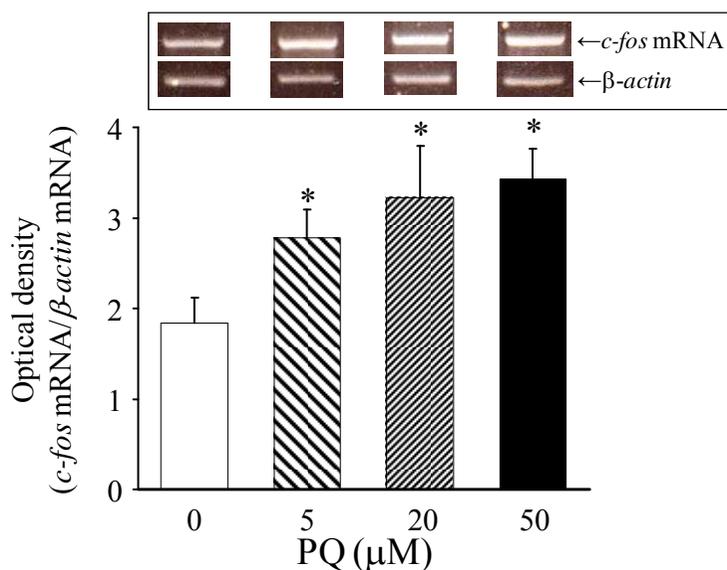


Fig. 17 Effects of PQ treatment on *c-fos* mRNA expression in FR-pQBI25-L cells.

Upper panel shows representative blots of *c-fos* mRNA and β -actin mRNA. Each bar represents mean \pm SEM (n = 5-9). *p < 0.05 compared with control conditions.

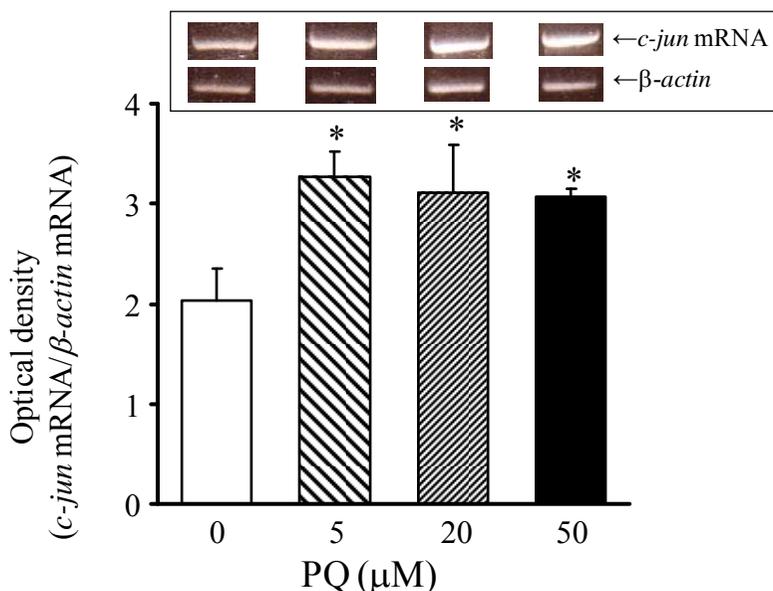


Fig. 18 Effects of PQ treatment on *c-jun* mRNA expression in FR-pQB125-L cells. Upper panel shows representative blots of *c-jun* mRNA and β -actin mRNA. Each bar represents mean \pm SEM (n = 5-9). *p < 0.05 compared with control conditions.

AP-1 は、FOS および JUN ファミリーにより構成され、両者のヘテロダイマーあるいは JUN のホモダイマーがロイシンジッパー構造を形成し、DNA 上の TRE を認識して結合することで、下流遺伝子の転写活性化を引き起こす転写制御因子である⁴⁶⁻⁴⁷⁾。

AP-1 は多くの遺伝子の発現過程を制御しており、collagenase, stromelysin, cyclin D, TGF-1 beta あるいは多くのサイトカインのプロモーター領域には TRE が存在している⁴⁸⁾。また、c-Fos および c-Jun は、TPA をはじめとする phorbol ester により誘導されることが報告されている⁴⁸⁻⁴⁹⁾。さらに AP-1 は、PQ や H₂O₂ といった ROS に関連する化学物質などにより誘導されることが報告されている¹⁴⁻²¹⁾。第 1 編では、遺伝子導入皮膚線維芽細胞への Dox 負荷により、AP-1 前初期遺伝子の発現が誘導されることを示し

た。これらのことから、遺伝子導入皮膚線維芽細胞に対して Dox および PQ を負荷した際の *c-fos* および *c-jun* mRNA の誘導には、Dox および PQ が発生する ROS が関与しているものと推察された。

第3節 PQ負荷によるCMVプロモーター駆動性遺伝子発現量の変化

次に、FR-pQBI25-L 細胞に対して PQ を負荷した際の、*rsGFP* mRNA 転写量および *rsGFP* タンパク発現量の変化について検討した。すなわち、FR-pQBI25-L 細胞に 5, 20 および 50 μM の PQ を 24 時間負荷し、RT-PCR 法にて、*rsGFP* mRNA 転写量を、蛍光光度法にて *rsGFP* タンパク量を測定した。

その結果、*rsGFP* mRNA 転写量は、各 PQ 濃度ともに control に比べて 1.9-2.9 倍と有意に増加した (Fig. 19)。また、*rsGFP* タンパク量は、各 PQ 濃度ともに control に比べて 1.8-3.1 倍と有意に増加した (Fig. 20)。

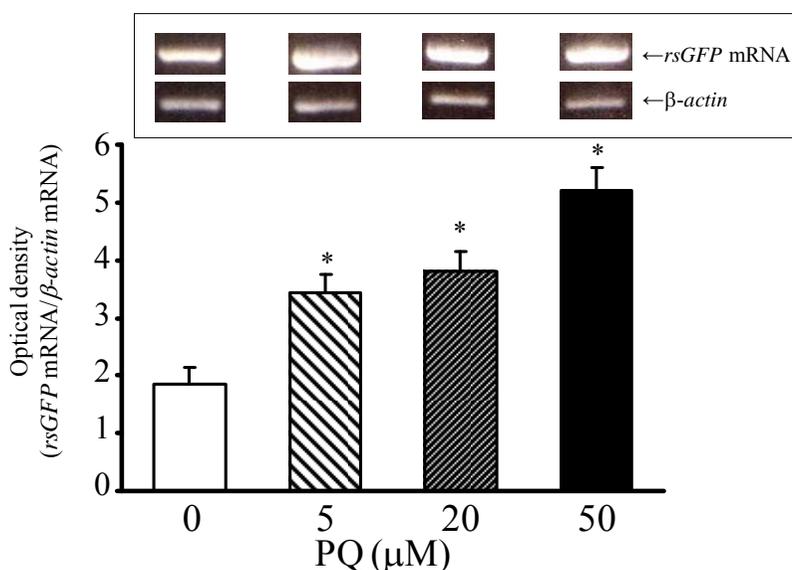


Fig. 19 Effects of PQ treatment on *rsGFP* mRNA expression in FR-pQBI25-L cells. Upper panel shows representative blots of *rsGFP* mRNA and β -actin mRNA. Each bar represents mean \pm SEM (n = 5-9). *p < 0.05 compared with control conditions.

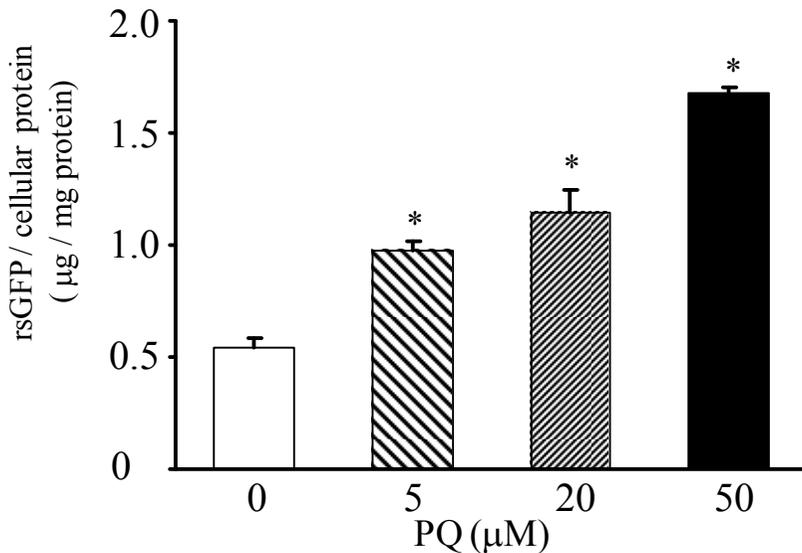


Fig. 20 Effects of PQ treatment on *rsGFP* protein expression in FR-pQBI25-L cells. Each bar represents mean \pm SEM (n = 8-9). *p < 0.05 compared with control conditions.

ここでは、FR-pQBI25-L 細胞に対して PQ を負荷した際の CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量の変化について検討した。その結果、*rsGFP* mRNA 転写量および *rsGFP* タンパク量は、PQ 負荷によって有意に増加した。また、両者を比較すると、その誘導強度はほぼ同等であり、PQ 濃度に依存して *rsGFP* 遺伝子発現量が増加する傾向があった。第 1 編では、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現が Dox 負荷によって誘導されることを示したが、PQ 負荷によっても Dox と同様に誘導効果が確認され、さらにその誘導強度は約 3 倍とほぼ同等の誘導強度を示した。先に述べたように ROS によって AP-1 が誘導されること、CMV プロモーターに TRE が存在することから、Dox および PQ による CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現誘導には、Dox および PQ から従属的に発生する ROS が深く関与していることが示唆された。

第4節 AP-1 前初期遺伝子発現量と CMV プロモーター駆動性遺伝子発現量との相関性解析

次に、本章第2節で得られた AP-1 前初期遺伝子の発現量と本章第3節で得られた CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量との関連について検討した。すなわち、*c-fos* mRNA 転写量と *rsGFP* mRNA 転写量との相関および *c-jun* mRNA 転写量と *rsGFP* mRNA 転写量との相関について解析した。

その結果、*c-fos* mRNA 転写量と *rsGFP* mRNA 転写量との相関係数は 0.9508 であり、有意な相関が認められた(Fig. 21A)。また、*c-jun* mRNA 転写量と *rsGFP* mRNA 転写量との相関係数は 0.7552 であったが、有意な相関は認められなかった(Fig. 21B)。

本研究で用いた pQBI25 は、レポーターである *rsGFP* 遺伝子の upstream に CMV プロモーターを有している。また、CMV プロモーターには、AP-1 結合部位である TRE が存在する。これらの事実から、著者は CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現が AP-1 によって制御されているという仮説を立てた。本節にて、AP-1 前初期遺伝子産物である *c-fos* mRNA 転写量と CMV プロモーター駆動性遺伝子産物である *rsGFP* mRNA 転写量に有意な相関が認められたことから、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御過程は、AP-1 に依存していると考えられた。したがって、CMV プロモーター駆動性遺伝子導入細胞において、Dox や PQ から従属的に発生した ROS によって導入遺伝子の発現を制御できる可能性が示された。

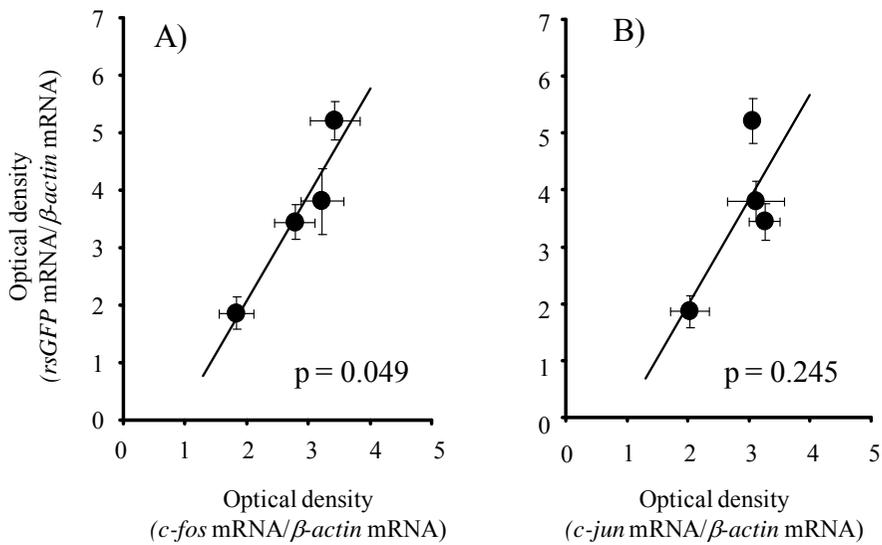


Fig. 21 Correlation between *rsGFP* mRNA and *c-fos* mRNA (A), and the correlation between *rsGFP* mRNA and *c-jun* mRNA (B) expression in FR-pQBI25-L cells. Correlation coefficients for (A) and (B) by linear approximation least-squares method were 0.9508 and 0.7552, respectively. Each point represents mean \pm SEM (n = 5-9).

第 5 節 小括

FR-pQBI25-L 細胞に対して PQ を負荷した際に、AP-1 前初期遺伝子の発現誘導が起こること、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現誘導が起こることが明らかとなった。また、両者の間に有意な相関が認められた。第 1 編における Dox での結果と併せて考えると、薬物から従属的に発生した ROS によって AP-1 が誘導され、CMV プロモーター上の TRE へ AP-1 が結合することを介して、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現が制御されていると考えられた。したがって、CMV プロモーターを有するベクターを用いた発現系において、導入遺伝子の発現制御が可能であることが示唆された。

第3編 種々の抗悪性腫瘍薬の負荷による CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現挙動解析と発現調節物質の解明⁵⁰⁾

第1章 種々の抗悪性腫瘍薬負荷および free radical scavenger の共存による CMV プロモーター駆動性遺伝子発現量の変化

悪性腫瘍に対するがん化学療法では、複数の抗悪性腫瘍薬を組み合わせて投与する多剤併用療法が一般的に用いられる。多剤併用療法の妥当性を示すもののひとつとして、Goldie-Coldman 理論が挙げられる⁵¹⁾。Goldie-Coldman 理論とは、腫瘍細胞が時間経過とともに自然と抗悪性腫瘍薬に対する耐性を獲得するという理論である。この理論に従うと、非交差耐性の薬剤を可能な限り多く短時間に投与することで、抗悪性腫瘍薬に耐性を有する腫瘍細胞の増殖を防ぐことができるといえる。このため、複数の抗悪性腫瘍薬を短時間に大量に投与する大量化学療法が、がん化学療法において標準治療となっている。さらに、近年開発された分子標的治療薬やホルモン療法剤と従来の抗悪性腫瘍薬との組み合わせによる複合的治療も進み、がん化学療法はその複雑さが一層増したといっても過言ではないように思われる。

第1編では、アンスラサイクリン系抗悪性腫瘍薬である Dox によって、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現を制御できる可能性が示された。第2編における PQ での結果と併せると、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現誘導は、Dox あるいは PQ が細胞内に取り込まれたのちに従属的に発生する ROS を介したものであると考えられる。しかしながら、Dox をはじめとする抗悪性

腫瘍薬は、元来が細胞増殖を抑制する機能を有する薬物であるため、細胞への Dox の負荷によって細胞内情報伝達過程に変化を及ぼし、転写調節因子の変動等によって CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現に変動をきたした可能性も否定できない。

したがって本編では、がん化学療法においては、多剤併用療法が一般的であることを鑑み、CMV プロモーター駆動性遺伝子導入細胞に対して、Dox とは異なる作用機序を有する抗悪性腫瘍薬を負荷した際の CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量の変化について検討した。また、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御過程における発現調節物質の解明を目的として、ROS 除去作用を有する free radical scavenger と抗悪性腫瘍薬を共負荷した際の CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量の変化について検討した。

第1節 抗悪性腫瘍薬負荷によるCMVプロモーター駆動性遺伝子発現量の変化

第1編にて樹立したFR-pQBI25-H細胞に対して、種々の抗悪性腫瘍薬を負荷した際のCMVプロモーター駆動性遺伝子発現量の変化について検討した。抗悪性腫瘍薬は、第1編にて選択したDoxのほかに、フッ化ピリミジン系核酸代謝阻害薬である5-fluorouracil (5-FU) および葉酸代謝阻害薬であるmethotrexate (MTX)を選択した (Fig. 22)。さらに第2編で検討したPQについても同様に検討した。すなわち、FR-pQBI25-H細胞に0.1 μ M Dox、5 μ M PQ、10 μ M 5-FU および20 nM MTXを48時間負荷し、RT-PCR法にて*rsGFP* mRNA転写量を、蛍光光度法にてrsGFPタンパク量を測定した。

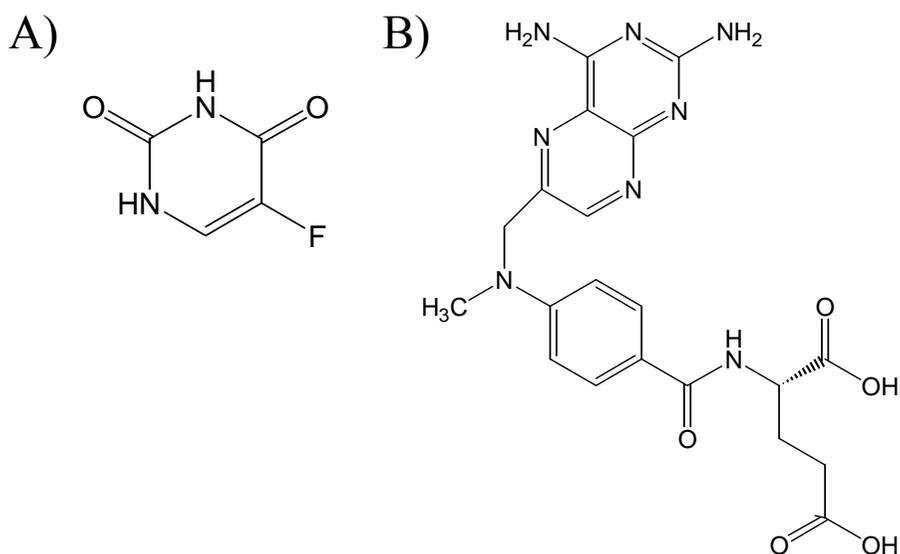


Fig. 22 Chemical structure of 5-FU (A) and MTX (B) (MW:130.08, 454.44, respectively).

その結果、*rsGFP* mRNA 転写量は、Dox 負荷により control と比べて約 11.6 倍と有意に増加し、rsGFP タンパク量も control と比べて約 1.7 倍と有意に増加した (Fig. 23)。PQ 負荷実験では、*rsGFP* mRNA 転写量が、control と比べて約 15.0 倍と有意に増加し、rsGFP タンパク量についても control と比べて約 2.2 倍と有意に増加した (Fig. 24)。

5-FU 負荷実験では、*rsGFP* mRNA 転写量が、control と比べて約 2.3 倍と有意に増加したものの、rsGFP タンパク量については変化が観察されなかった (Fig. 25)。また、MTX 負荷によつては、*rsGFP* mRNA 転写量および rsGFP タンパク量は変化しなかった (Fig. 26)。

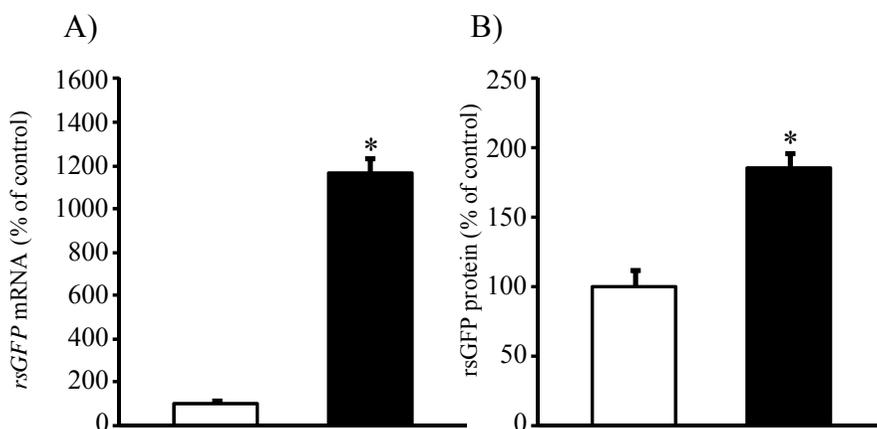


Fig. 23 Effects of Dox treatment in FR-pQBI25-H cells. (A) *rsGFP* mRNA, (B) rsGFP protein. □; control condition, ■; 0.1 μM Dox condition. Values estimate percentage of the control in each experiment and each bar represents mean \pm SEM (n = 5-7). *p < 0.01 vs. control.

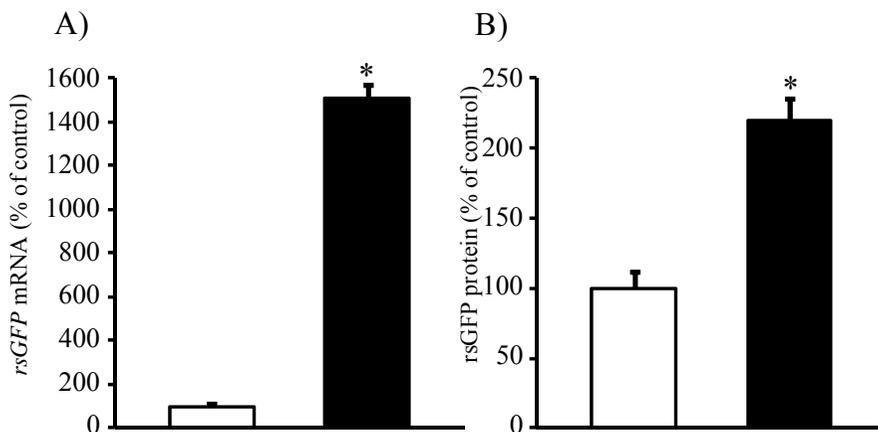


Fig. 24 Effects of PQ treatment in FR-pQBI25-H cells. (A) *rsGFP* mRNA, (B) *rsGFP* protein. □; control condition, ■; 5 μM PQ condition. Values estimate percentage of the control in each experiment and each bar represents mean \pm SEM (n = 5-7). *p < 0.01 vs. control.

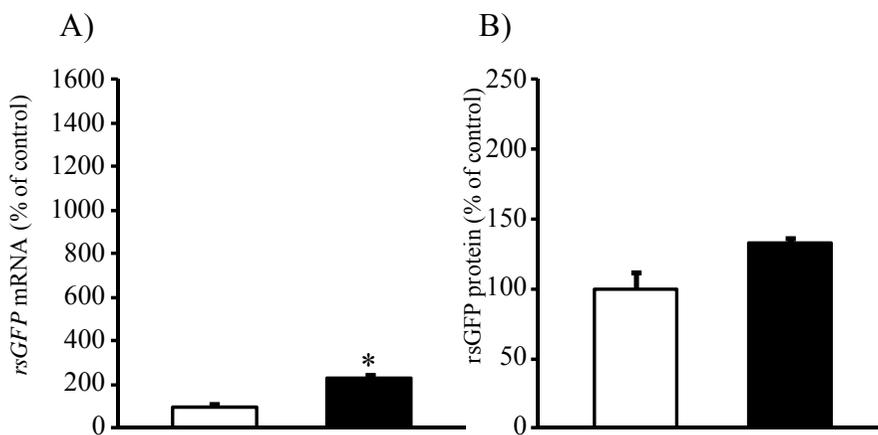


Fig. 25 Effects of 5-FU treatment in FR-pQBI25-H cells. (A) *rsGFP* mRNA, (B) *rsGFP* protein. □; control condition, ■; 10 μM 5-FU condition. Values estimate percentage of the control in each experiment and each bar represents mean \pm SEM (n = 4-7). *p < 0.01 vs. control.

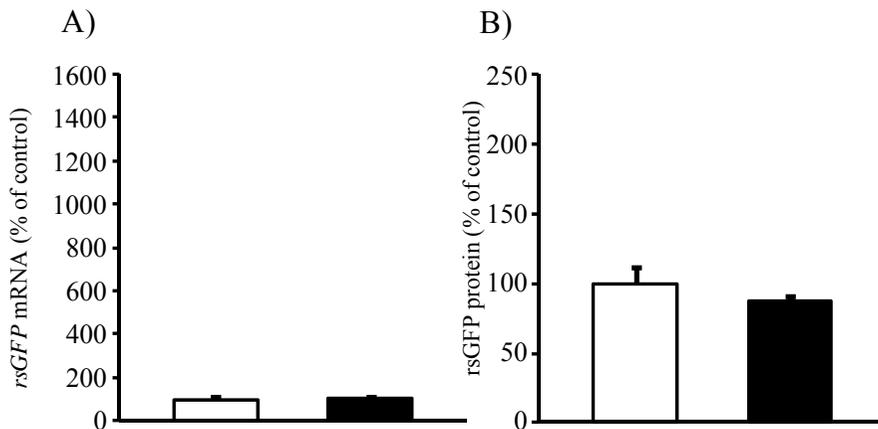


Fig. 26 Effects of MTX treatment in FR-pQBI25-H cells. (A) *rsGFP* mRNA, (B) *rsGFP* protein. □; control condition, ■; 20 nM MTX condition. Values estimate percentage of the control in each experiment and each bar represents mean \pm SEM (n = 5-7).

本節では、作用機序の異なる複数の抗悪性腫瘍薬を CMV プロモーター駆動性遺伝子導入細胞に負荷した際の、CMV プロモーター駆動性遺伝子発現量の変化について検討した。

第 1 編での結果と同様に、アンスラサイクリン系抗悪性腫瘍薬である Dox は、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現を誘導した。また、第 2 編での結果と同様に、PQ は、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現を誘導した。しかしながら、フッ化ピリミジン系核酸代謝阻害薬である 5-FU での検討では、CMV プロモーター駆動性遺伝子の mRNA 転写量において、control と比較して有意な増加を認めたものの、タンパク量においては、有意な変動が見られなかった。また、葉酸代謝阻害薬である MTX では、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現量に変化を及ぼさなかった。これらの結果から、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現は、特定の抗悪性腫瘍薬のみによって誘導されることが示された。すな

わち、抗悪性腫瘍薬本来の薬理作用である細胞に対する増殖抑制効果とは異なる作用機序に基づいていることが示唆された。また、Dox および 5-FU は、CMV プロモーター駆動性遺伝子の mRNA 転写量を増加させたが、その誘導強度は大きく異なり、Dox による誘導強度が 10 倍以上であったのに対して、5-FU のそれは 2 倍程度であった。さらにタンパク発現量においては、Dox によって有意な増加がみられたのに対し、5-FU では有意な増加がみられなかった。Wendling は、5-FU が、c-Jun/AP-1 シグナル伝達経路を刺激することを報告している⁵²⁾。5-FU は ROS 発生能を持たない抗悪性腫瘍薬であるため、5-FU による CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現誘導は ROS 以外の因子を介した AP-1 の活性化に関連していると考えられる。また、Dox による CMV プロモーター駆動性遺伝子の誘導強度と PQ によるそれがほぼ同程度であることから、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現が、これら薬物から従属的に発生する ROS を介して制御されていることが示唆された。しかしながら、本節の結果が示す通り、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現は、その mRNA 転写量を指標とした誘導効果とタンパク量を指標とした誘導効果の間に大きな差が認められた。真核細胞における種々遺伝子の発現制御過程では、転写過程がその大半を担っているとされているが、転写された mRNA はタンパク質と結合した形である messenger ribonucleoproteins (mRNP) として存在し、そのタンパク質の変化がその mRNA の翻訳調節に大きく影響していることが報告されている⁵³⁾。特に、卵母細胞をはじめとする生殖細胞では、その分化・増殖過程において当該 mRNA から翻訳されるタンパク質が必要となるときに備えて細胞質に mRNA を mRNP として安定に貯蔵

しており、翻訳が抑制された状態になっている。また、mRNA は細胞質中で翻訳可能な状態と翻訳が不可能な状態とを相互に移動することもできることが明らかにされ、さらに、この機能は生殖細胞のみならず、神経細胞や酵母においても報告されている⁵⁴⁻⁵⁵⁾。したがって、CMV プロモーター駆動性遺伝子導入細胞において、その mRNA 転写量を指標とした誘導効果とタンパク量を指標とした誘導効果の間に大きな差が認められた理由として、mRNP を介した翻訳調節過程の関与、あるいは細胞質中における mRNA あるいはタンパク質の安定性の変化などが考えられる。今回は、レポーターとして rsGFP を用いたため、rsGFP タンパク量は蛍光光度法を利用して測定した。この方法は、rsGFP タンパクが、490 nm 付近の励起光により蛍光を発する性質を利用したものであり、機能的な rsGFP レベルを測定するための有用な方法であると思われるが、今後、mRNA レベルとタンパクレベルでの差異を説明するためには、さらなる検討が必要と思われる。

以上のように、本節では、CMV プロモーター駆動性遺伝子導入細胞に対して、作用機序の異なる複数の抗悪性腫瘍薬を負荷した際の CMV プロモーター駆動性遺伝子発現量の変化について検討した。その結果、特定の抗悪性腫瘍薬のみが、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御過程に影響を及ぼすことが明らかとなり、その原因として ROS の関与が考えられた。これらの結果は、多剤併用療法が主流である現在のがん化学療法において、当該レジメンに含まれる薬剤の組み合わせから、CMV プロモーター駆動性遺伝子を用いた遺伝子治療の適応可否が予測できることを示していると思われる。しかしながら、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御過程に ROS が関与していることを直

接的に証明した報告はなく、本研究におけるこれまでの結果からも、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御に ROS が関与しているという推測しか得ることができない。そこで次節では、ROS 除去作用を有する free radical scavenger と抗悪性腫瘍薬の共負荷実験を行い、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御物質の解明を試みることにした。

第2節 抗悪性腫瘍薬による遺伝子発現誘導におよぼす共存 free radical scavenger の影響

第1節では、FR-pQBI25-H細胞に対して、種々の抗悪性腫瘍薬を負荷した際のCMVプロモーター駆動性遺伝子発現量の変化について検討した。ここでは、CMVプロモーター駆動性遺伝子の発現制御過程にどの程度ROSが関与しているかを明らかにするために、free radical scavengerであるN-acetyl cysteine (NAC)およびedaravone (Eda)と抗悪性腫瘍薬を共負荷した際のCMVプロモーター駆動性遺伝子の発現量の変化について検討することを目的とした (Fig. 27)。

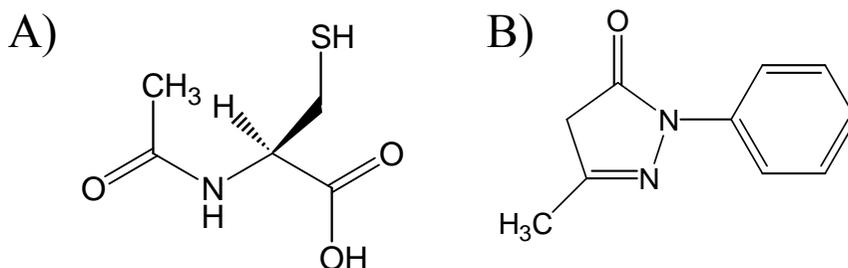


Fig. 27 Chemical structure of NAC (A) and Eda (B) (MW: 163.19, 174.20, respectively).

まず、0.1, 1, 10 mM NAC および 0.1 mM Eda による CMV プロモーター駆動性遺伝子発現量への影響について検討した。しかしながら、1 mM 以上の NAC を負荷した場合には、培養液が黄色に変色した。これは、培養液の緩衝能以上の酸が負荷されたことを示しており、事実 1 mM 以上の NAC を負荷することで細胞の培養が困難となった。したがって、*in vitro* における NAC 負荷最高量は 0.1 mM であることが明らかとなり、以後の実験については

0.1 mM の NAC 存在下で実験を行った。すなわち、FR-pQBI25-H 細胞に 0.1 mM NAC あるいは Eda を 48 時間負荷し、RT-PCR 法にて *rsGFP* mRNA 転写量を、蛍光光度法にて rsGFP タンパク量を測定した。その結果、*rsGFP* mRNA 転写量および rsGFP タンパク量ともに、control と比較して有意な差は認められなかった (Fig. 28)。したがって、本実験系における NAC および Eda の濃度設定は妥当であり、抗悪性腫瘍薬との共負荷実験に問題がないことを確認した。

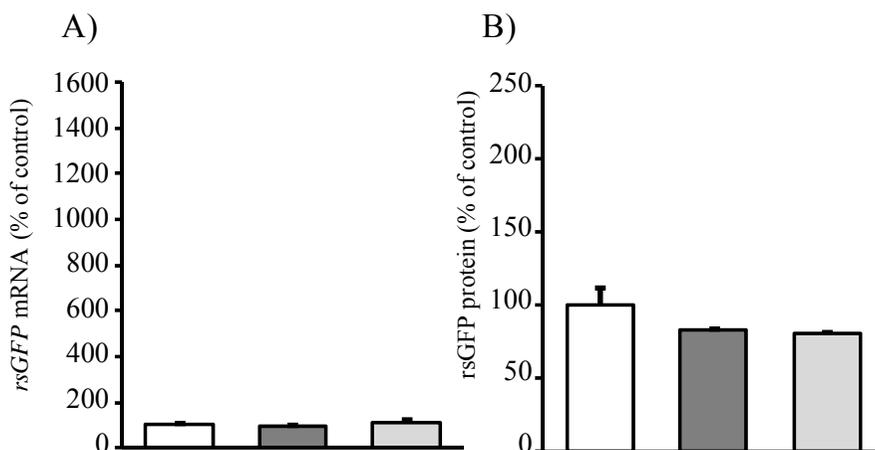


Fig. 28 Effects of scavenger treatment in FR-pQBI25-H cells. (A) *rsGFP* mRNA, (B) rsGFP protein. □; control condition, ■; 0.1 mM NAC condition, ▨; 0.1 mM Eda condition. Values estimate percentage of the control in each experiment and each bar represents mean \pm SEM (n = 4-7).

続いて、NAC あるいは Eda と抗悪性腫瘍薬の共負荷実験を行った。すなわち、FR-pQBI25-H 細胞を 24 時間プレインキュベーションした後、培地を交換し、最終濃度としていずれも 0.1 mM となるように NAC あるいは Eda を添加した。この 2 時間後に、最終濃度として 0.1 μ M Dox、5 μ M PQ、10 μ M 5-FU および 20 nM MTX となるように各抗悪性腫瘍薬を添加した。この 48 時間後に

細胞を回収し、RT-PCR 法にて *rsGFP* mRNA 転写量を、蛍光光度法にて rsGFP タンパク量を測定した。

その結果、Dox+NAC 共負荷群における rsGFP タンパク量は、Dox 単独負荷群と比較して有意に低下した (Fig. 29)。しかしながら、Dox+scavenger 共負荷群における *rsGFP* mRNA 転写量および rsGFP タンパク量は、control と比較して有意に高く、基礎発現レベルまでは低下しなかった (Fig. 29)。PQ+Eda 共負荷群における *rsGFP* mRNA 転写量および rsGFP タンパク量は、Dox 単独負荷群と比較して、有意に低下した (Fig. 30)。しかしながら、PQ+scavenger 共負荷群における *rsGFP* mRNA 転写量および rsGFP タンパク量は、control と比較して有意に高く、Dox と同様に基礎発現レベルまでは低下しなかった (Fig. 30)。

5-FU+scavenger 共負荷群では、control と比較して *rsGFP* mRNA 転写量が有意に高いものの、5-FU 単独負荷群と比較して差が認められなかった (Fig. 31)。また、rsGFP タンパク量は、5-FU 単独負荷群、5-FU+scavenger 共負荷群および control との間にも差が認められなかった (Fig. 31)。MTX+scavenger 共負荷群では、*rsGFP* mRNA 転写量および rsGFP タンパク量ともに、control と比較して有意な差は認められず、MTX 単独負荷群とも差がなかった (Fig. 32)。

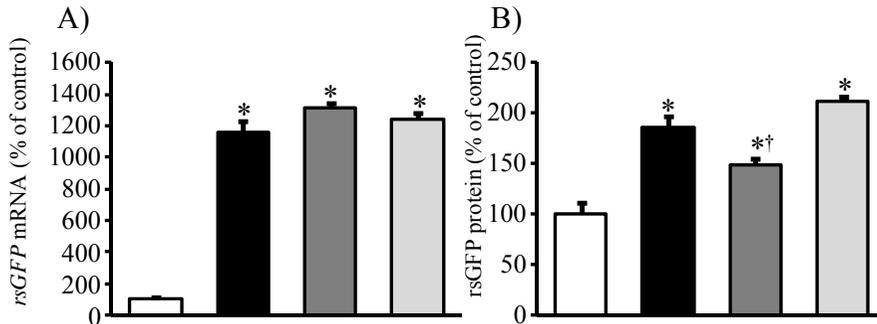


Fig. 29 Effects of Dox and scavenger co-treatment in FR-pQBI25-H cells. (A) *rsGFP* mRNA, (B) *rsGFP* protein. □; control condition, ■; 0.1 μM Dox condition, ▒; 0.1 μM Dox + 0.1 mM NAC condition, ◻; 0.1 μM Dox + 0.1 mM Eda condition. Values estimate percentage of the control in each experiment and each bar represents mean ± SEM (n = 4-7). *p < 0.01 vs. control, †p < 0.01 vs. Dox alone.

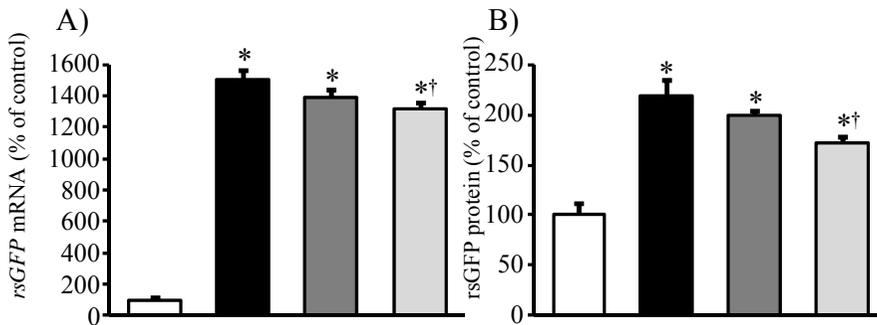


Fig. 30 Effects of PQ and scavenger co-treatment in FR-pQBI25-H cells. (A) *rsGFP* mRNA, (B) *rsGFP* protein. □; control condition, ■; 5 μM PQ condition, ▒; 5 μM PQ + 0.1 mM NAC condition, ◻; 5 μM PQ + 0.1 mM Eda condition. Values estimate percentage of the control in each experiment and each bar represents mean ± SEM (n = 4-7). *p < 0.01 vs. control, †p < 0.01 vs. PQ alone.

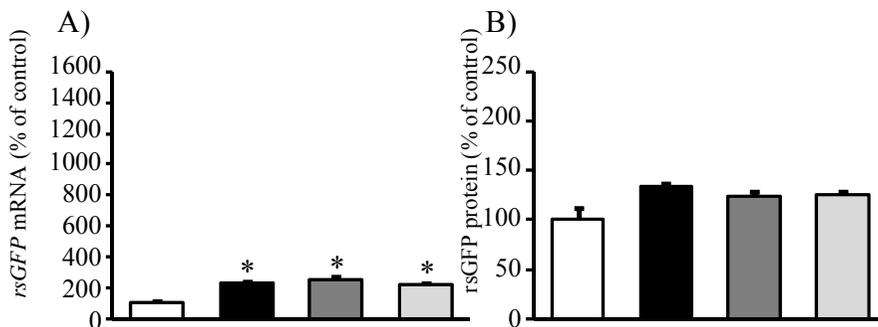


Fig. 31 Effects of 5-FU and scavenger co-treatment in FR-pQBI25-H cells. (A) *rsGFP* mRNA, (B) *rsGFP* protein. □; control condition, ■; 10 μM 5-FU condition, ▒; 10 μM 5-FU + 0.1 mM NAC condition, ◻; 10 μM 5-FU + 0.1 mM Eda condition. Values estimate percentage of the control in each experiment and each bar represents mean ± SEM (n=4-7). *p<0.01 vs. control.

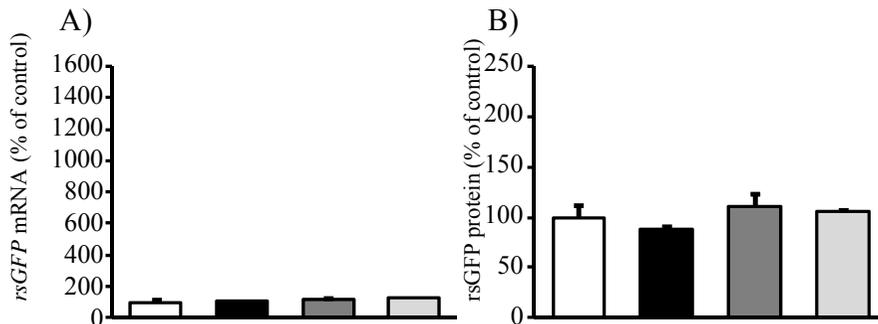


Fig. 32 Effects of MTX and scavenger co-treatment in FR-pQBI25-H cells. (A) *rsGFP* mRNA, (B) *rsGFP* protein. □; control condition, ■; 20 nM MTX condition, ▒; 20 nM MTX + 0.1 mM NAC condition, ◻; 20 nM MTX + 0.1 mM Eda condition. Values estimate percentage of the control in each experiment and each bar represents mean ± SEM (n=4-7).

本節では、これまで検討してきた CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御が、ROS を介しているのではないかとの視点に基づき、free radical scavenger である NAC および Eda と抗悪性腫瘍薬との共負荷実験を行った。

哺乳動物細胞の多くは、その細胞内に内因性抗酸化物質である glutathione が存在し、酸化還元の均衡へ寄与しているが、本検討で用いた NAC は、glutathione の前駆体としての機能を有している⁵⁶⁾。これに対して Eda は、直接的な free radical 除去作用を有する⁵⁷⁾。したがって、NAC 共存下では、細胞の内因性抗酸化作用が亢進し、Eda 共存下では、free radical の直接的除去作用が亢進するものと考えられる。

Fig. 29 および Fig. 30 に示す通り、Dox および PQ によって誘導された CMV プロモーター駆動性遺伝子は、Dox では NAC によって、PQ では Eda によってその発現誘導が抑制された。この結果は、Dox および PQ による CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現誘導に ROS が関与していることを示唆している。今回、free radical scavenger の種類によって差が現れたことは、Dox および PQ による ROS 発生機序や free radical scavenger の ROS 除去機構の違いに関連しているものと考えられるが、詳細については不明である。今後、free radical scavenger が細胞に対して量的および時間的にどのような影響を及ぼしているかについても検討する必要性があると考えられる。

また、CMV プロモーター駆動性遺伝子発現量は、free radical scavenger との共負荷によっても control と同程度までは低下しなかった。第 1 編および第 2 編では、Dox および PQ によって CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現が誘導され、さらにその発現誘導に AP-1 の関与が考えられることを示した。これは、CMV プロモーターに AP-1 結合部位である TRE が存在することに基づいているが、細胞内情報伝達過程における AP-1 の機能は、c-Fos および c-Jun のヘテロダイマーあるいは c-Jun のホモダイマー形成後

に、p38 MAPK などによりリン酸化されることで発揮される⁵⁸⁾。さらに、CMV プロモーターには、NFκB の結合 motif も存在しており、Dox による CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御に NFκB が関与しているという報告もある⁴⁰⁾。したがって、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御には、ROS を介した AP-1 前初期遺伝子の誘導のみならず、AP-1 のリン酸化過程の活性化や、NFκB の誘導など、多数の因子が複合的に関与していることが推察された。

また、5-FU によって誘導された *rsGFP* mRNA 転写量は、free radical scavenger の共負荷によって抑制されなかった。前節にて述べたように 5-FU は ROS 以外の因子を介して c-Jun/AP-1 シグナル伝達経路を刺激するため、free radical scavenger との共負荷によって変化が見られなかったものと考えられる。

第 1 編にて示した通り、CMV プロモーター駆動性遺伝子導入細胞に Dox を負荷し、その後 Dox 負荷を中止することにより CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現が低下することが明らかとなった。しかしながら、その発現レベルは基礎発現レベルよりは高い値を示した。また、ヒトにおける Dox 投与後の体内動態を眺めてみると、Dox は静脈内投与後急速に末梢組織に移行するため、γ 期における消失半減期は 25.8 時間と長い消失半減期を有する⁵⁹⁾。したがって、CMV プロモーター下流に Dox の副作用を防止しうるタンパク質の遺伝子を導入したベクターにて修飾した細胞を患者にあらかじめ移植しておき、Dox の投与によって有用タンパク質の発現を誘導するという本研究で提案している新規遺伝子治療を施すにあたり、Dox 投与によって有用タンパク質が過剰に発現してしまった場合には、Dox が長く体内に残存する性

質を有するために、Dox の負荷中止のみでは速やかにその発現量を低下させることは困難であると考えられる。このような場合、free radical scavenger の投与は、過剰発現した CMV プロモーター駆動性遺伝子を抑制するために有用な方法であると考えられる。ここで問題となるのは、free radical scavenger の投与が、Dox の本来有している抗悪性腫瘍作用と拮抗するか否かという点である。Dox の抗悪性腫瘍効果は、DNA 二重らせん構造への intercalation に基づいており、非可逆性の心毒性には、従属的に発生する ROS が関与されているといわれている²⁹⁾。さらに Ikegami らは、Eda がアンスラサイクリン系抗悪性腫瘍薬による心毒性を軽減し、さらに、白血病細胞である K652 細胞に対しての検討によって、Eda の共負荷がアンスラサイクリン系薬物の抗悪性腫瘍効果に影響を及ぼさないことを報告している⁶⁰⁾。以上のことから、free radical scavenger は、抗悪性腫瘍薬によって CMV プロモーター駆動性遺伝子が過剰発現した際に、抗悪性腫瘍薬の有する本来の抗悪性腫瘍効果を減弱することなく、その発現を抑制することができるという、いわゆるレスキューとして機能を発揮できるものと考えられる。

第3節 小括

FR-pQBI25-H 細胞に対して、異なる作用機序を有する抗悪性腫瘍薬を負荷した際に、特定の抗悪性腫瘍薬のみにて CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現誘導が起こることが明らかとなった。さらに、抗悪性腫瘍薬と free radical scavenger との共負荷実験により、一部の抗悪性腫瘍薬で誘導された CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現が抑制されることが明らかとなった。すなわち、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御には ROS が関与していることが示唆された。したがって、CMV プロモーターを有するベクターを用いた遺伝子治療において、抗悪性腫瘍薬と free radical scavenger を用いることで導入遺伝子のスイッチングが可能となることから、従来問題されてきた導入遺伝子の発現制御が可能になるものと考えられる。

第 4 編 アンストラサイクリン系抗悪性腫瘍薬による心毒性軽減を目的とした有用タンパク質の送達に関する基礎的検討⁴³⁾

第 1 章 遺伝子導入肺上皮細胞への活性酸素刺激による CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現挙動解析

アンストラサイクリン系抗悪性腫瘍薬である Dox は、その副作用として心毒性を引き起こす。この理由として、Dox によって従属的に発生する ROS が、心筋細胞のアポトーシスを引き起こすためと考えられている¹⁻²⁾。したがって、Dox 惹起性の心毒性に対して、ROS 除去作用を持つ free radical scavenger や SOD などが有望視されている。

一般に活性酸素と呼ばれるものは一重項酸素、superoxide anion、過酸化水素そしてヒドロキシルラジカルの 4 種類であり、強力な酸化作用を有することから、生体内における異物除去などに重要な役割を果たしている。しかしながら、これら活性酸素が過剰に生成されると酸化還元の不均衡が生じ、生体内高分子に対して毒性を示すようになる。活性酸素のうち、最も強力な酸化作用を有しているのはヒドロキシルラジカルであるが、存在量および半減期を考慮して生体内での活性が最も大きいものは superoxide anion である。通常これら活性酸素は、生体内に存在する種々 scavenger により除去されているが、そのなかで重要な役割を果たしているものの一つが superoxide dismutase (SOD) であり、この酵素は、superoxide anion を過酸化水素に変換する働きを有している⁶¹⁾。

前編までに著者は、CMV プロモーターを有するプラスミドベクターを細胞に導入し、Dox および PQ の負荷によって、AP-1 前初期遺伝子および CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現が誘導されることを見いだした。この結果は、Dox によって惹起される副作用を軽減する目的の遺伝子治療に応用することで、導入遺伝子の発現調節が可能であることを示唆している。そこで本編では、実際の Dox による心毒性の軽減を目指し、ROS 除去作用を有するヒト *Cu, Zn-SOD* cDNA および CMV プロモーターを持つプラスミドベクターを細胞に導入し、活性酸素毒性を負荷した際の導入遺伝子発現量の変化について検討した。また、活性酸素関連疾患への応用を考慮して、遺伝子導入細胞として肺上皮細胞を選択した。

第1節 PQ負荷によるCMVプロモーター駆動性遺伝子発現量の変化

まず、ラット肺上皮細胞（L2細胞、ATCC CCL 149）とL2細胞にCMVプロモーター下流にヒト *Cu, Zn-SOD* cDNA を有するベクターである pRc/CMV-SOD を導入した monoclonal (L2-pRc/CMV-SOD 細胞)の総 SOD 活性を比較したところ、L2-pRc/CMV-SOD 細胞のほうが 1.8 倍の総 SOD 活性を有していた (Fig. 33)。

続いて L2 および L2-pRc/CMV-SOD 細胞に対して、PQ を 24 時間負荷した際の、細胞内総 SOD 活性について検討した。その結果、遺伝子導入していない L2 細胞においては、PQ 負荷による総 SOD 活性の上昇は認められなかった。しかしながら L2-pRc/CMV-SOD 細胞では、PQ 負荷により総 SOD 活性が 1.4 倍増加した(Fig. 33)。

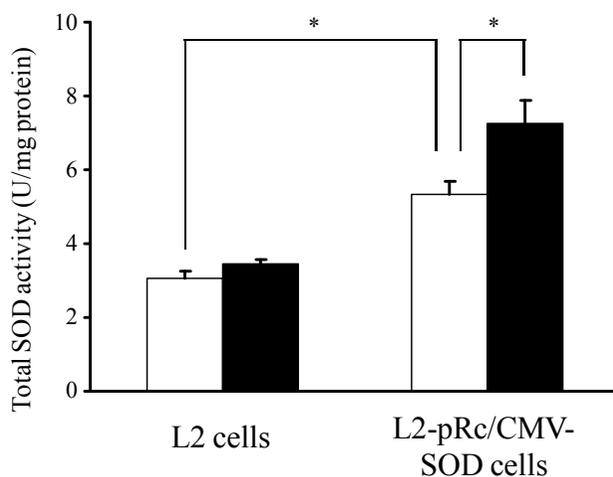


Fig. 33 Effects of PQ treatment on SOD activity in L2-pRc/CMV-SOD cells. □, control; ■, 100 μM PQ. Each bar represents mean ± SEM (n = 3-12). *p < 0.05.

生体内において SOD 活性を有する酵素としては、本研究で注目した Cu, Zn-SOD と Mn-SOD の二種類が存在する。大柳の方法で SOD 活性を測定すると、Cu, Zn-SOD 活性と Mn-SOD 活性の合計としての総 SOD 活性として測定される⁶²⁾。本実験に先立ち、この方法にシアン化カリウムを添加することにより Cu, Zn-SOD を阻害し、Mn-SOD の活性のみを測定したところ、総 SOD 活性に占める Mn-SOD 活性は 5%以下と極めて低いものであることを確認した。このことから、本実験で用いたホモジネート上清を用いる方法ではサイトソールに存在する酵素である Cu, Zn-SOD が主に回収されているものと考えられたため、今回は SOD 活性として総 SOD 活性を示した。

L2 細胞と L2-pRc/CMV-SOD 細胞の総 SOD 活性を測定したところ、L2 細胞に比較して L2-pRc/CMV-SOD 細胞において有意に高い活性値を示した。このことから、L2-pRc/CMV-SOD 細胞は、SOD を安定に発現している細胞であることが明らかとなった。さらに L2 および L2-pRc/CMV-SOD 細胞に対して、PQ を負荷した結果、SOD 遺伝子導入細胞である L2-pRc/CMV-SOD 細胞において有意な活性上昇が観察された。これは第 2 編で示した *rsGFP* mRNA 転写量の誘導と合致する結果であり、遺伝子導入細胞に対して ROS を負荷した際に、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現が誘導されることを示している。また、L2-pRc/CMV-SOD 細胞の総 SOD 活性から L2 細胞の有する総 SOD 活性を差し引くことで導入遺伝子由来の SOD 活性を見積もり、その誘導強度を計算すると約 2 倍であった。これは FR-pQBI25-H 細胞および FR-pQBI25-L 細胞での結果と同程度の誘導強度であり、CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現誘導が、細胞種およびレポーター遺伝子による

影響を受けないものと考察された。第1編および第3編にて示したように、DoxによってCMVプロモーター駆動性遺伝子の発現制御が可能であることが示され、本編にて実際にSOD遺伝子導入細胞へのROS負荷によって、SOD活性の誘導が確認されたことから、CMVプロモーター駆動性ベクターは、Dox惹起性の心毒性軽減を目的とした遺伝子治療において、有用性が高いものと考えられる。また、SOD遺伝子をG-CSF遺伝子に置き換えることで、Dox惹起性の骨髄抑制に対する遺伝子治療への応用も期待できる。

さらにこれらの結果は、活性酸素関連疾患に対する遺伝子治療への応用も可能と思われる。実際に、凍傷モデルラットおよびカラゲニン惹起性炎症モデルラットに対して、CMVプロモーター駆動性トトCu, Zn-SOD遺伝子送達の有用性が報告されている⁶³⁻⁶⁴)。特に、SOD遺伝子導入肺由来細胞へのROSの負荷によってSOD遺伝子発現量が誘導されるということは、呼吸窮迫症候群に対しての遺伝子治療における発現制御という点について有用であることを示している。さらに、その遺伝子導入細胞を変更することによって呼吸窮迫症候群のみならず、種々炎症性疾患あるいは虚血—再灌流障害などの活性酸素関連疾患に対する遺伝子治療への応用も可能と思われる。すなわち、CMVプロモーター下流にROS除去作用を有するSOD遺伝子などを導入したベクターで細胞に遺伝子修飾を施し、その細胞を移植することで、局所あるいは全身にて発生したROSによって発現誘導が起こり、病態の回復に伴いその発現を抑制することも可能と思われる。また、第2編にてPQ濃度依存的に導入遺伝子発現の誘導強度が増加したことを鑑みると、活性酸素関連疾患の重症度に応じて導

入遺伝子の発現制御ができる可能性も示唆している。

以上のように、CMV プロモーター駆動性遺伝子導入細胞は、Dox 惹起性副作用に対する遺伝子治療のみならず活性酸素関連疾患に対する遺伝子治療における導入遺伝子の発現制御について有用性が高いものと考えられる。

第2節 小括

FR-pQBI25-H 細胞および FR-pQBI25-L 細胞と同様に、実際に ROS 除去作用を持つ *SOD* 遺伝子を導入した L2-pRc/CMV-SOD 細胞においても、PQ 負荷によって CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現が誘導されることが明らかとなった。これらの結果は、CMV プロモーター駆動性遺伝子導入細胞を用いた遺伝子治療において、生体内で発生する ROS により導入遺伝子の発現が誘導されるという、導入遺伝子の発現制御を可能とするものであると考えられる。したがって、CMV プロモーター駆動性ベクターは、Dox 惹起性の心毒性を軽減するための遺伝子治療あるいは活性酸素の関与する疾患に対する遺伝子治療に対して有用性が高いものと考察された。

結 論

近年における遺伝子工学技術、細胞工学技術の発展により、遺伝子治療あるいは再生医療といった新規治療法が提案され、難治性疾患に対しての新たな治療法が実現されるまでになってきている。このうち、遺伝子治療は、これまで薬剤学的諸問題を抱えているために臨床応用が困難であったペプチドあるいはタンパク性医薬品の新規薬物送達法として、その有用性が高く評価されている。しかしながら、現在の遺伝子治療における問題点の一つである、導入遺伝子の発現調節については、未だ解決されていない。

そこで本研究では、真核細胞発現系として汎用され、その配列中に AP-1 結合部位である TRE が存在する CMV プロモーターに着目した。また、Dox 惹起性副作用や種々炎症性疾患、虚血一再灌流障害をはじめとする多くの疾患との関連性が指摘されている ROS によって、AP-1 が誘導されることに注目した。そこで著者は、CMV プロモーター駆動性遺伝子導入細胞を樹立し、その遺伝子発現制御過程における ROS および AP-1 との関連性について検討することで、以下に示す知見を得た。

- ① アンスラサイクリン系抗悪性腫瘍薬である Dox を FR-pQBI25-H 細胞に負荷することで、*c-fos*, *c-jun* mRNA 転写量と *rsGFP* mRNA 転写量および *rsGFP* タンパク量が増加した。
- ② FR-pQBI25-H 細胞に Dox 負荷したのち、負荷を中止することで、*c-fos*, *c-jun* mRNA 転写量と *rsGFP* mRNA 転写量および *rsGFP* タンパク量の増加が抑制された。

- ③ HepG2-pEGFP 細胞に Dox を負荷することで、EGFP タンパク量が増加した。
- ④ ROS 発生系として汎用される PQ を、FR-pQBI25-L 細胞に負荷することで、*c-fos*, *c-jun* mRNA 転写量と *rsGFP* mRNA 転写量および *rsGFP* タンパク量の増加が認められた。さらに、*c-fos* mRNA 転写量と *rsGFP* mRNA 転写量の間に関連関係が認められた。
- ⑤ FR-pQBI25-H 細胞に種々の抗悪性腫瘍薬を負荷すると、特定の抗悪性腫瘍薬のみにて *rsGFP* mRNA 転写量および *rsGFP* タンパク量が増加した。
- ⑥ FR-pQBI25-H 細胞に Dox あるいは PQ と free radical scavenger を共負荷することで、*rsGFP* mRNA 転写量および *rsGFP* タンパク量の増加が抑制された。
- ⑦ CMV プロモーター駆動性ヒト *Cu, Zn-SOD* 遺伝子を導入した細胞を構築し、PQ を負荷した結果、SOD 活性の上昇が認められた。

以上の結果から、CMV プロモーターを用いた遺伝子治療において、遺伝子導入後の発現制御過程に AP-1 が関与しており、かつその原因として薬物から従属的に発生する ROS が AP-1 発現誘導を介して CMV プロモーター駆動性遺伝子の発現制御に一部関連していることが明らかとなった。

これまでも遺伝子治療の問題点の一つである導入遺伝子の発現制御に関しては、多くの検討がなされてきた。しかしながら、これまでにおけるこの問題点に対するアプローチは、ある薬物に特異的に応答するプロモーター下流に目的遺伝子を組み込み、移

植後あるいは遺伝子導入後にその薬物を投与することによって、導入遺伝子の発現制御を目指すものであった。すなわち、目的遺伝子上流に副腎皮質ホルモン応答性プロモーターやテトラサイクリン応答性プロモーターを組み込んだベクターを用い、遺伝子導入後にこれら薬物を追加投与することで目的遺伝子の発現制御を可能とするものであった⁶⁵⁻⁶⁶。これらの検討は、従来までの問題点である目的遺伝子の発現制御を可能とする方法を提供するものである。しかしながら、この手法における最大の問題点は、導入遺伝子の発現を制御するために、本来必要のない薬物を投与する必要性が生じ、この薬物によって新たな副作用が発現する可能性が否定できない点である。

これに対して本研究結果は、従来までの薬物応答性プロモーターを用いた遺伝子発現制御とは大きく異なる。すなわち、導入遺伝子の発現を制御するために薬物を投与するのではなく、対象疾患に必要な薬物が投与された際に、その薬物の主たる薬理作用に干渉することなく、その薬物から生成される副反応物（従属的に発生する ROS）を利用することで、導入遺伝子の発現制御を可能とするものである。第1編で示すように、アンストラサイクリン系抗悪性腫瘍薬惹起性の副作用を予防あるいは軽減し得る有用タンパク質をコードする遺伝子を目的遺伝子として導入し、がん化学療法の施行に先立って患者体内へ移植しておくことで、アンストラサイクリン系抗悪性腫瘍薬の投与によって導入遺伝子の発現が誘導され、血中濃度の低下に伴ってその発現が抑制されるといった発現制御が可能であると考えられる。また、第2編で示すように、ROS 発生能を有する薬物の濃度に依存して、CMV プロモーター駆動性遺伝子発現の誘導強度が増加したことから、目的遺

伝子として活性酸素関連疾患に有用なタンパク質をコードする遺伝子を導入することで、これら疾患の重症度に応じた導入遺伝子の発現制御が可能であることを示唆している。さらに、第3編で示すように、抗悪性腫瘍薬の投与によって、導入遺伝子が過剰発現してしまった場合には、**free radical scavenger** を追加投与することにより、その発現を抑制することができることも示唆している。最後に第4編では、レポーター遺伝子をヒト *Cu, Zn-SOD* 遺伝子に置き換えた場合も、ROS の負荷によって **CMV** プロモーター駆動性遺伝子の発現が誘導されることを明らかとした。このように、本研究によって、**CMV** プロモーター駆動性遺伝子の発現制御過程の一部が明らかとなり、**Dox** により導入遺伝子の発現制御が可能であることが示唆された。特に本研究結果は、薬物から従属的に発生する物質によって導入遺伝子の発現を制御するという、従来までの方法と異なる新たなストラテジーを提案するものである。

したがって、本研究結果は、がん化学療法を施行する患者に対して、抗悪性腫瘍薬による副作用の回避を目的とする遺伝子治療における導入遺伝子の発現制御について、基礎的知見および重要な情報をもたらすものであると考えられる。

謝 辞

終わりに臨み、本研究を行うにあたり、終始懇切な御指導ならびに御鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科 小林大介教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、本研究を行うにあたり、終始御指導ならびに御鞭撻を賜りました姫路獨協大学薬学部 駒田富佐夫教授ならびに城西大学薬学部 齋藤侑也前招聘教授に深謝の意を表します。

また、本論文の作成にあたり、御指導ならびに御校閲と御教示を賜りました副査城西大学大学院薬学研究科 川嶋洋一教授、日比野康英教授に深く感謝いたします。

さらに、本研究に際し、終始御指導と御協力を賜りました姫路獨協大学薬学部長 奥村勝彦教授、京都薬科大学 西口工司教授、東京薬科大学薬学部 内野克喜教授、神戸大学医学部 平井みどり教授、神戸薬科大学 八木敬子講師に心から感謝の意を表します。

さらに、本研究に際し、御助言ならびに御激励を賜りました城西大学薬学部 大嶋繁准教授、根本英一助手に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究に際し、御協力を賜りましたトクホン株式会社 砂友一氏、NTT 東日本関東病院薬剤部 田邊直人氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行にあたり、多くの励ましの言葉をいただいた家族に感謝します。

主論文目録

本学位論文内容は、下記の発表論文による。

1. Atsushi Kinoshita, Daisuke Kobayashi, Yukiya Saitoh, Naoto Tanabe, Katsuyoshi Uchino, Kohshi Nishiguchi, Katsuhiko Okumura and Fusao Komada. Regulation of exogenous gene expression by superoxide. *Pharm. Res.* **23**: 2536-2541, 2006
2. Atsushi Kinoshita, Daisuke Kobayashi, Yasuhide Hibino, Tomokazu Isago, Katsuyoshi Uchino, Keiko Yagi, Midori Hirai, Yukiya Saitoh and Fusao Komada. Regulation of CMV promoter-driven exogenous gene expression with doxorubicin in genetically modified cells. *J. Pharm. Pharmacol.* **60**: 1659-1665, 2008
3. Atsushi Kinoshita, Daisuke Kobayashi, Yukiya Saitoh and Fusao Komada. Effects of anticancer agents and scavengers on CMV-promoter-driven exogenous gene expression in genetically modified cells. *J. Pharm. Pharmacol.* **61**: 527-531, 2009

実験の部

第1編 第1章 実験の部

1. 実験材料

Dox は、協和発酵株式会社より供与を受けた。アンピシリンは、和光純薬工業から購入した。LB 培地の原料である乾燥酵母エキス D-3 は日本製薬社製を、tryptone は DIFCO 社製を、塩化ナトリウムは和光純薬工業社製を購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) は日本製薬より購入し、Geneticin (G418) は GIBCO BRL より購入した。PCR および RT-PCR に用いたプライマーは、サワディー・テクノロジーに合成を依頼した (Table 1)。その他の試薬は、市販特級品を使用した。

Table 1 The nucleotide sequences of primers for amplification of *c-fos*, *c-jun* and *rsGFP* cDNA

Primers	Nucleotide sequences
c-fos-F	5'-CCTGTCAACACACAGGACTT-3'
c-fos-R	5'-AGGTCCACATCTGGCACAGA-3'
c-jun-F	5'-GCTTCTCTAGTGCTCCGTAA-3'
c-jun-R	5'-TCTAGGAGTCGTCAGAATCC-3'
rsGFP-F	5'-AAAAAAGCTTATGGCTAGCAAAGGAGAAGAA-3'
rsGFP-R	5'-AATCTAGATCAGTTGTACAGTTCATCCAT-3'

2. 細胞培養

FR 細胞は、大日本製薬より購入した。FR 細胞の培養は、37°C、5% CO₂ 存在下、10% fetal bovine serum (FBS ; ICN Biomedicals 社製)、penicillin (50 U/mL)、ならびに streptomycin (50 µg/mL) を添加した DMEM にて行った。培養は、朝日ライフサイエンス社製の

ミニ CO₂ インキュベータ 4020 型にて行った。

3. プラスミドベクター

pQBI25 は、宝酒造より購入した。*E. coli* への形質転換は、*E. coli* competent cell HB101 (宝酒造) 50 μ L に対して pQBI25 1 μ g を加え、熱ショックを与えることで行った。その後、菌液を 50 μ g/mL アンピシリンを含有する LB 寒天培地上に播種し、37°Cにて 16 時間培養後に出現したコロニーから菌を採取し、形質転換細胞とした。その後、50 μ g/mL アンピシリンを含有する LB 培地に形質転換細胞を接種し、37°Cにて 16 時間振とう培養を行ったのちに菌体を回収し、Qiafilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen)を用いてプラスミドの精製を行った。操作は、キットに添付されたプロトコルに従った。得られたプラスミドの確認には、PCR 法を用いた。PCR 用反応溶液は、Table 2 に示すように TaKaRa TaqTM (宝酒造) を用いて調整した。反応は MJ Research 社製の MiniCycler にて行った。反応条件は Table 3 に示す温度サイクルで行った。

Table 2 Reaction mixture for amplifying DNA templates by PCR

Component	Volume (μ L)	Final concentration
TaKaRa Taq TM DNA polymerase	0.5	2.5 Units/100 μ L
10x PCR buffer (Mg ²⁺ free)*	10	1x
25mM MgCl ₂	6	1.5 mM
dNTP mixture (2.5mM each)	8	200 μ M each
Primer (sense)	1	1 μ M
Primer (anti-sense)	1	1 μ M
DNA template	each (1 μ g)	1 μ g/100 μ L
Sterilized distilled water	up to 100	

* 500mM KCl 100mM Tris-HCl (pH 8.3)

Table 3 Temperature cycling for amplification of DNA templates by PCR

Temperature (°C)	Time (min)	Cycle
94	3	1
94	1	40
60	1	
72	1	
72	5	1

4. 遺伝子導入および遺伝子導入皮膚線維芽細胞の調製

FR 細胞への遺伝子導入は、GenomeONE-Neo (石原産業)を用いて行った。処理はすべてマイクロテストチューブにて行った。操作は、石原産業社にて推奨されている方法に従った。すなわち、マイクロテストチューブに HVJ envelope (HVJ-E) を採取し、DNA (20 µg pQBI25)および封入剤を加え、遠心 (10,000×g、4°C、5 分間) 後、導入エンハンサーを添加したものを HVJ-E vector 懸濁液とした。予め前日に 35 mm culture dish に 1.0×10^5 個の FR 細胞を播種しておき、HVJ-E vector 懸濁液を細胞培養表面に滴下して、CO₂ インキュベータにて 24 時間インキュベーションした。その後、10% FBS、penicillin (50 U/mL)、ならびに streptomycin (50 µg/mL)を添加した DMEM (3 mL)に置換し、2.に示した方法に従い培養した。48 時間後、G418 (400 µg/mL)を添加して選択培養を開始した。2 週間培養後、culture dish に出現したコロニーをカップ法にて選別採取し、G418 耐性細胞の monoclonal clone を得た。ここで得られた monoclonal clone を FR-pQBI25-H 細胞とした。

5. mRNA 転写量測定

mRNA 転写量の測定は、RT-PCR 法を用いた。細胞からの全 RNA の抽出には、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用し、操作はキットに添付されたプロトコルに従った。調整した全 RNA の 0.5 あるいは 1 μg を RT-PCR に供し、RT-PCR 反応液は QIAGEN One Step RT-PCR kit を用いて調整した (Table 4)。温度サイクルは、Table 5-8 に示す条件に従った。反応は MJ Research 社製の MiniCycler にて行った。

増幅した DNA 断片は 2 %アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色により確認した。得たバンドの density は画像処理プログラム Adobe Photoshop (Ver. 4.0) および画像解析プログラム NIH image (Ver. 1.60) にて測定し、optical density (*c-fos* mRNA/ β -actin mRNA、*c-jun* mRNA/ β -actin mRNA および *rsGFP* mRNA/ β -actin mRNA) を求めることで、*c-fos*、*c-jun* および *rsGFP* mRNA 転写量とした。なお、本実験に先立ち、template として用いる総 RNA 量を変化させて RT-PCR を行い、電気泳動後に得られたバンドの density を測定した結果、測定対象の mRNA に基づく cDNA が定量的に増幅されていることを確認した。

Table 4 Reaction mixture for amplifying *c-fos*, *c-jun*, *rsGFP* and *β -actin* mRNA by RT-PCR

Component	Volume (μ L)	Final concentration
5 x QIAGEN One Step RT-PCR Buffer	10	1x
dNTP mixture (10 mM each)	2	400 μ M each
Primer (sense)	1	1 μ M
Primer (anti-sense)	1	1 μ M
QIAGEN One Step RT-PCR Enzyme Mix	2	—
Sample (total RNA)	0.5 μ g (<i>c-fos</i>)	0.5 μ g/50 μ L
	1.0 μ g (<i>c-jun</i>)	1.0 μ g/50 μ L
	1.0 μ g (<i>rsGFP</i>)	1.0 μ g/50 μ L
	1.0 μ g (<i>β-actin</i>)	1.0 μ g/50 μ L
RNase free water	up to 50 μ L	

Table 5 Temperature cycling for amplification of *c-fos* mRNA by RT-PCR

Temperature ($^{\circ}$ C)	Time (min)	Cycle
50	35	1
95	15	1
94	1] 40
62	0.33	
72	1	
72	10	1

Table 6 Temperature cycling for amplification of *c-jun* mRNA by RT-PCR

Temperature (°C)	Time (min)	Cycle
50	35	1
95	15	1
94	1] 40
55	0.5	
72	1.5	
72	10	1

Table 7 Temperature cycling for amplification of *rsGFP* mRNA by RT-PCR

Temperature (°C)	Time (min)	Cycle
50	35	1
95	15	1
94	1] 30
60	1	
72	1	
72	10	1

Table 8 Temperature cycling for amplification of β -actin mRNA by RT-PCR

Temperature (°C)	Time (min)	Cycle
50	35	1
95	15	1
94	1] 40
64	0.33	
72	1	
72	10	1

6. rsGFP タンパク発現量測定

回収した細胞を phosphate buffered saline (PBS)にて洗浄し、0.1% Tween 20 溶液で再懸濁後、凍結融解を繰り返すことにより細胞を破壊した。これを 14,000 rpm、10 分間遠心し、得られた上清を試料とした。

上清中の rsGFP タンパク量は、蛍光光度計 (ex: 490 nm、em: 510 nm) にて測定した。すなわち、recombinant GFP (宝酒造) を標準とした検量線から試料中の rsGFP タンパク量を見積もり、さらに試料中の総タンパク質にて補正し、rsGFP 量/総タンパク質量比で表した。総タンパク質の測定には、Bio-Rad DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories)を用いた。

7. 遺伝子導入皮膚線維芽細胞に対する Dox 負荷実験および Dox 負荷中止実験

FR-pQBI25-H 細胞に対する Dox 負荷実験 (experiment 1) は、

100 mm culture dish にて行った。すなわち、 2.2×10^6 cells の FR-pQBI25-H 細胞を culture dish に播種し、24 時間培養後、培地を 10 % FBS、penicillin (50 U/mL) および streptomycin (50 μ g/mL) を添加した DMEM (6 mL) に置換し、Dox を最終濃度として 0.1 μ M となるように添加した。この 24、48、72 時間後に Dox を含む培地を交換し、96 時間後まで培養した。Dox 負荷開始後から 24、48、72 および 96 時間後に細胞を回収した (Fig. 6)。

FR-pQBI25-H 細胞に対する Dox 負荷中止実験 (experiment 2) も、100 mm culture dish にて行った。すなわち、 2.2×10^6 cells の FR-pQBI25-H 細胞を culture dish に播種し、24 時間培養後、培地を 10 % FBS、penicillin (50 U/mL) および streptomycin (50 μ g/mL) を添加した DMEM (6 mL) に置換し、Dox を最終濃度として 0.1 μ M となるように添加した。この 24 時間後に Dox を含む培地を交換し、48 時間後に Dox を含まない培地に置換し、72 時間後にも培地 (Dox 不含) を交換し、96 時間後まで培養した。Dox 負荷開始後から 72 および 96 時間後に細胞を回収した (Fig. 6)。

回収した細胞から全 RNA を抽出し、RT-PCR 法により *c-fos*、*c-jun* および *rsGFP* mRNA 転写量を測定した。また、細胞質中の *rsGFP* タンパク量を測定した。

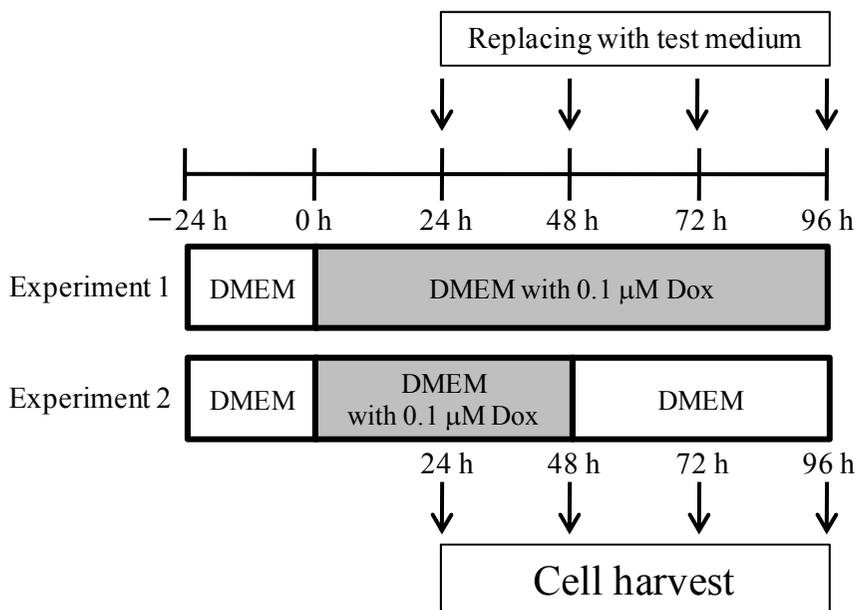


Fig. 6 Experimental model of Dox exposure and cessation of Dox exposure

8. 統計学的処理

数値はすべて平均(mean)±標準誤差(standard error of mean: SEM)にて表した。2 群間の統計学的解析は Student's *t*-test を用いた。3 群以上の統計学的解析には分散分析を用い、有意差のあるものについてはさらに *post hoc* test として Fischer's *post hoc* least significant difference (PLSD)の方法を用いて多重比較を行い、2 群間の有意差を検定した。有意水準 α は、0.05 とした。

第1編 第2章 実験の部

1. 実験材料

Dox は、和光純薬工業から購入した。その他の試薬は、市販特級品を使用した。

2. 細胞培養

HepG2 細胞は、理化学研究所より購入した。HepG2 細胞の培養は、37°C、5% CO₂ 存在下、10% FBS (ICN Biomedicals 社製)、penicillin (50 U/mL)、ならびに streptomycin (50 µg/mL) を添加した DMEM にて行った。培養は、和研薬社製のミニ CO₂ インキュベータ 9300-E 型にて行った。

3. プラスミドベクター

pEGFP-N1 は、姫路獨協大学薬学部通山由美教授から供与を受けた。

4. 遺伝子導入および遺伝子導入肝細胞の調製

HepG2 細胞への遺伝子導入は、Bio-Rad 社製の GenePulser を用いて行った。前処理はすべてマイクロテストチューブにて行った。すなわち、マイクロテストチューブに 1.0×10^6 個の HepG2 細胞をとり、cytomix (120 mM KCl, 0.15 mM CaCl₂, 10 mM K₂PO₄/KH₂PO₄ pH 7.6, 25 mM HEPES pH 7.6, 2 mM EGTA pH 7.6, 5 mM MgCl₂) にて洗浄後、cytomix に再懸濁し、最終濃度が 2 mM ATP および 5 mM glutathione となるようにこれら試薬を加えたのちに、electroporation 用キュベットに移した。そこに cytomix に溶解した pEGFP-N1 5 µg を加え、350 V、975 µF の条件で細胞に対して電

気パルスを与えた。その後キュベットを氷上で1時間静置し、10% FBS、penicillin (50 U/mL)、ならびに streptomycin (50 µg/mL)を添加した DMEM を含む culture dish に細胞を播種し、第1編第1章実験の部 2.に示した方法に従い培養した。48 時間後、G418 (400 µg/mL)を添加して選択培養を開始した。2 週間培養後、culture dish に出現したコロニーをカップ法にて選別採取し、G418 耐性細胞の monoclonal を得た。ここで得られた monoclonal を HepG2-pEGFP 細胞とした。

5. EGFP タンパク発現量測定

EGFP タンパク量の測定は、第1編 第1章 実験の部に示した方法で行った。

6. 遺伝子導入肝細胞に対する Dox 負荷実験

HepG2-pEGFP 細胞に対する Dox 負荷は、100 mm culture dish に行った。すなわち、 1.0×10^6 cells の HepG2-pEGFP 細胞を culture dish に播種し、24 時間培養後、培地を 10 % FBS、penicillin (50 U/mL)および streptomycin (50 µg/mL)を添加した DMEM (10 mL)に置換し、Dox (最終濃度 0.1 µM)を添加した。この48時間後、細胞を回収し、細胞質中の EGFP タンパク量を測定した。

7.統計学的処理

数値はすべて平均(mean)±標準誤差(SEM)にて表した。統計学的解析は Student's *t*-test を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

第2編 第1章 実験の部

1. 実験材料

PQ は SIGMA から購入した。LB 培地の原料、DMEM、Geneticin および *c-fos*、*c-jun* および *rsGFP* の RT-PCR に用いたプライマーは、第1編、第1章実験の部 1. に示したものをを用いた。*β-actin* の RT-PCR には、XADR20 (sense) および XADR17 (anti-sense) (いずれもフナコシ) を用いた。その他の試薬は市販特級品を使用した。

2. 細胞培養

FR 細胞は、第1編、第1章実験の部 2. に示したものをを用いた。細胞培養は、第1編、第1章実験の部 2. に示した方法に従った。

3. プラスミドベクター

プラスミドベクターは、第1編第1章実験の部 3. に示したものをを用いた。*E. coli* への形質転換およびプラスミドベクターの精製は、第1編第1章実験の部 3. に示した方法に従った。

4. 遺伝子導入および遺伝子導入皮膚線維芽細胞の調製

FR 細胞への遺伝子導入は、TransFast™ (Promega) を用いて行った。処理はすべてポリプロピレンチューブにて行った。操作は、Promega 社にて推奨されている方法に従って行った。すなわち、ポリプロピレンチューブに penicillin (50 U/mL)、ならびに streptomycin (50 μg/mL) を添加した DMEM (2 mL) を入れ、その中に DNA (5 μg pQBI25) および TransFast™ を加え軽く混合して室

温にて 15 分放置したものを DNA-TransFast™ 複合体溶液とした。予め前日に 60 mm culture dish に 1.3×10^6 個の FR 細胞を播種しておき、培地を除去した後に DNA-TransFast™ 複合体溶液を細胞培養表面に滴下して、CO₂ インキュベータにて 1 時間インキュベーションした。その後、10% FBS、penicillin (50 U/mL)、ならびに streptomycin (50 µg/mL) を添加した DMEM (4 mL) を culture dish に重層し、第 1 編第 1 章実験の部 2. の記載に従い培養した。48 時間後、G418 (400 µg/mL) を添加して選択培養を開始した。2 週間培養後、culture dish に出現したコロニーをカップ法にて選別採取し、G418 耐性細胞の monoclonal を得た。ここで得られた monoclonal を FR-pQBI25-L 細胞とした。

5. mRNA 転写量測定

mRNA 転写量の測定は、RT-PCR 法を用いた。細胞からの全 RNA の抽出には、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用し、操作はキットに添付されたプロトコルに従って行った。

c-fos および *c-jun* mRNA の増幅には、調整した全 RNA の 5 µg を供し、Ready-To-Go™ You-Prime First-Strand Beads (Amersham) を用いて逆転写反応溶液 (Table 9) を調整した後、Table 10 に示す温度サイクルにて逆転写反応を行った。次に、この反応液を PCR 反応溶液 (Table 11) へ加えた後、*c-fos* および *c-jun* cDNA について PCR を行った。*c-fos* および *c-jun* cDNA の PCR には Table 1 に示すプライマーを用い、温度サイクルは Table 12 に示す条件に従った。

rsGFP および *β-actin* mRNA の増幅には、調整した全 RNA の 1 µg を RT-PCR に供し、RT-PCR 反応液は Ready-To-Go™ RT-PCR beads

(Amersham)を用いて調整した。すなわち、beads の入ったチューブに適量の DEPC-treated water を加え、氷上にて 5 分間放置して溶解させた後、1 μg に相当する全 RNA および pd(T)₁₂₋₁₈ を加え (Table 13)、逆転写反応を行った (Table 14, 15)。次に、*rsGFP* の反応液に Table 1 に示す Primer を、 *β -actin* の反応液には XAHR20 (sense) および XAHR17 (anti-sense) (いずれもフナコシ) を加え、Table 14 および Table 15 に示す温度サイクルで PCR を行った。反応は MJ Research 社製の MiniCycler にて行った。

増幅した DNA 断片は 2 %アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色により確認した。得たバンドの density は画像処理プログラム Adobe Photoshop (Ver. 4.0) および画像解析プログラム NIH image (Ver. 1.60) にて測定し、optical density (*c-fos* mRNA/ *β -actin* mRNA、*c-jun* mRNA/ *β -actin* mRNA および *rsGFP* mRNA/ *β -actin* mRNA) を求めることで、*c-fos*、*c-jun* および *rsGFP* mRNA 転写量とした。なお、本実験に先立ち、template として用いる総 RNA 量を変化させて RT-PCR を行い、電気泳動後に得られたバンドの density を測定した結果、測定対象の mRNA に基づく cDNA が定量的に増幅されていることを確認した。

Table 9 Reaction mixture for reverse transcription

Component	Volume (μL)	Final concentration
Sample (total RNA)	each (5 μg)	5 μg /33 μL
DEPC-treated water	up to 30	
<i>Post Heating</i>		
pd(T) ₁₂₋₁₈	1	0.5 μg /33 μL
DEPC-treated water	2	

Table 10 Temperature cycling for reverse transcription

Temperature (°C)	Time (min)	Cycle
65	10	1
On ice	2	1
<u>Add <i>pd(T)</i>₁₂₋₁₈</u>		
37	60	1
95	5	1

Table 11 Reaction mixture for amplifying *c-fos* and *c-jun* cDNA templates by PCR

Component	Volume (μL)	Final concentration
TaKaRa Taq™ DNA polymerase	0.5	2.5 Units/100 μL
10x PCR buffer (Mg ²⁺ free)*	10	1x
25mM MgCl ₂	6	1.5 mM
dNTP mixture (2.5mM each)	8	200 μM each
Primer (sense)	1	1 μM
Primer (anti-sense)	1	1 μM
DNA template (RT product)	3.3**	0.5 μg/100 μL
Sterilized distilled water	up to 100	

* 500mM KCl 100mM Tris-HCl (pH 8.3)

** equivalent to 0.5 μg total RNA

Table 12 Temperature cycling for amplification of *c-fos* and *c-jun* cDNA by PCR

Temperature (°C)	Time (min)	Cycle
94	3	1
94	1] 40
58	1.5	
72	1.5	

Table 13 Reaction mixture for amplification of *rsGFP* and *β-actin* cDNA by RT-PCR

Component	Volume (μL)	Final concentration
pd(T) ₁₂₋₁₈	1	0.5 μg/ 50 μL
Sample (total RNA)	each (1 μg)	1 μg/ 50 μL
DEPC-treated water	up to 48	
<i>Post RT</i>		
Primer (sense)	1	1 μM
Primer (anti-sense)	1	1 μM

Table 14 Temperature cycling for amplification of *rsGFP* cDNA by RT-PCR

Temperature (°C)	Time (min)	Cycle
42	30	1
95	1	1
<i>Add primers</i>		
94	3	1
94	1] 40
60	1	
72	1	
72	5	1

Table 15 Temperature cycling for amplification of β -actin cDNA by RT-PCR

Temperature (°C)	Time (min)	Cycle
42	30	1
95	1	1
<u>Add primers</u>		
94	2	1
94	0.5] 40
64	0.5	
72	1.5	

6. rsGFP タンパク発現量測定

rsGFP タンパク発現量は、第 1 編、第 1 章実験の部 6. に示した方法に従った。総タンパク質の測定には、Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories) を用いた。

7. 遺伝子導入皮膚線維芽細胞に対する PQ 負荷実験

FR-pQBI25-L 細胞に対する活性酸素毒性の負荷は、60 mm culture dish にて行った。すなわち、 1.3×10^6 cells の FR-pQBI25-L 細胞を culture dish に播種し、24 時間培養後、培地を 10 % FBS、penicillin (50 U/mL) および streptomycin (50 μ g/mL) を添加した DMEM (6 mL) に置換し、PQ (最終濃度として 5, 20 および 50 μ M) を添加した。この 24 時間後、細胞を回収した。回収した細胞から全 RNA を抽出し、RT-PCR 法により *c-fos*、*c-jun* および *rsGFP* mRNA 転写量を測定した。また、細胞質中の rsGFP タンパク量を

測定した。

8.統計学的処理

数値はすべて平均(mean)±標準誤差(SEM)にて表した。2群間の統計学的解析は Student's *t*-test を用いた。3群以上の統計学的解析には分散分析を用い、有意差のあるものについてはさらに *post hoc test* として Fischer's PLSD の方法を用いて多重比較を行い、2群間の有意差を検定した。相関性の解析には Pearson の相関係数を用いた。有意水準 α は、0.05 とした。

第3編 第1章 実験の部

1. 実験材料

Dox、MTX、5-FU、PQ、NAC、Eda、DMEM は和光純薬工業から購入した。RT-PCR に用いたプライマーは、オペロンバイオテクノロジーに合成を依頼した (Table 16)。その他の試薬は市販特級品を使用した。

Table 16 The nucleotide sequences of primers for amplification of *rsGFP* and β -*actin* cDNA

Primers	Nucleotide sequences
rsGFP-F	5'-AAAAAAAGCTTATGGCTAGCAAAGGAGAAGAA-3'
rsGFP-R	5'-AATCTAGATCAGTTGTACAGTTCATCCAT-3'
β -actin-F	5'-ACCCACACTGTGCCCATCTA-3'
β -actin-R	5'-CGGAACCGCTCATTGCC-3'

2. 細胞培養

FR-pQBI25-H 細胞は、第1編第1章実験の部4.で樹立したものをを用いた。FR-pQBI25-H 細胞の培養は、37°C、5% CO₂ 存在下、10% FBS (MP Biomedicals 社製)、penicillin (50 U/mL)、ならびに streptomycin (50 μ g/mL) を添加した DMEM にて行った。培養は、和研薬社製のミニ CO₂ インキュベータ 9300-E 型にて行った。

3. mRNA 転写量測定

mRNA 転写量の測定は、RT-PCR 法を用いた。細胞からの全 RNA の抽出には、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用し、操作はキットに添付されたプロトコルに従った。調整した全 RNA の 0.125 ある

いは0.25 μg を RT-PCR に供し、RT-PCR 反応液は QIAGEN One Step RT-PCR kit を用いて調整した (Table 17)。温度サイクルは、Table 18-19 に示す条件に従った。反応は Thermo Scientific 社製の Thermal cycler PxE にて行った。

増幅した DNA 断片は 2 %アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色により確認した。染色したゲルは、ルミノイメージアナライザ LAS-3000 (富士フィルム) にて撮影した。得られたバンドの density は画像処理プログラム Multi Gauge (富士フィルム) にて測定し、optical density (*rsGFP* mRNA/ *β -actin* mRNA) を求めることで、*rsGFP* mRNA 転写量とした。なお、本実験に先立ち、template として用いる総 RNA 量を変化させて RT-PCR を行い、電気泳動後に得られたバンドの density を測定した結果、測定対象の mRNA に基づく cDNA が定量的に増幅されていることを確認した。

Table 17 Reaction mixture for amplifying *rsGFP* and *β -actin* mRNA by RT-PCR

Component	Volume (μL)	Final concentration
5 x QIAGEN One Step RT-PCR Buffer	5	1x
dNTP mixture (10 mM each)	1	400 μM each
Primer (sense)	0.25	1 μM
Primer (anti-sense)	0.25	1 μM
QIAGEN One Step RT-PCR Enzyme Mix	1	—
Sample (total RNA)	0.25 μg (<i>rsGFP</i>)	0.25 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$
	0.125 μg (<i>β-actin</i>)	0.125 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$
RNase free water	up to 25 μL	

Table 18 Temperature cycling for amplification of *rsGFP* mRNA by RT-PCR

Temperature (°C)	Time (min)	Cycle
50	35	1
95	15	1
94	1] 28
60	1	
72	1	
72	10	1

Table 19 Temperature cycling for amplification of β -actin mRNA by RT-PCR

Temperature (°C)	Time (min)	Cycle
50	35	1
95	15	1
94	1] 22
64	0.33	
72	1	
72	10	1

4. rsGFP タンパク発現量測定

rsGFP タンパク量の測定は、第 1 編 第 1 章 実験の部 6. に示した方法で行った。

5. 遺伝子導入皮膚線維芽細胞に対する抗悪性腫瘍薬負荷および

free radical scavenger 共負荷実験

FR-pQBI25-H 細胞に対する抗悪性腫瘍薬負荷実験は、100 mm culture dish にて行った。すなわち、 1.0×10^6 cells の FR-pQBI25-H 細胞を culture dish に播種し、24 時間培養後、培地を 10 % FBS、penicillin (50 U/mL) および streptomycin (50 $\mu\text{g/mL}$) を添加した DMEM (10 mL) に置換し、最終濃度として 0.1 μM Dox、5 μM PQ、10 μM 5-FU および 20 nM MTX となるようにそれぞれ添加した。この 48 時間後に細胞を回収した。

FR-pQBI25-H 細胞に対する抗悪性腫瘍薬および free radical scavenger 共負荷実験は、100 mm culture dish にて行った。すなわち、 1.0×10^6 cells の FR-pQBI25 細胞を culture dish に播種し、24 時間培養後、培地を 10 % FBS、penicillin (50 U/mL) および streptomycin (50 $\mu\text{g/mL}$) を添加した DMEM (10 mL) に置換し、最終濃度としていずれも 0.1 mM となるように NAC あるいは Eda を添加した。NAC あるいは Eda 添加 2 時間後、最終濃度として 0.1 μM Dox、5 μM PQ、10 μM 5-FU および 20 nM MTX となるようにそれぞれ添加した。この 48 時間後に細胞を回収した。

回収した細胞から全 RNA を抽出し、RT-PCR 法により *rsGFP* mRNA 転写量を測定した。また、細胞質中の *rsGFP* タンパク量を測定した。

6.統計学的処理

数値はすべて平均(mean)±標準誤差(SEM)にて表した。統計学的解析には分散分析を用い、有意差のあるものについてはさらに *post hoc test* として Fischer's PLSD の方法を用いて多重比較を行い、2 群間の有意差を検定した。有意水準 α は、0.01 とした。

第4編 第1章 実験の部

1. 実験材料

Ham's F12 nutrient medium は Flow Laboratories 社より購入した。PQ は第2編第1章実験の部 1.に記載したものをを用いた。その他の試薬は市販特級品を使用した。

2. 細胞培養

L2 細胞および L2-pRc/CMV-SOD 細胞は、神戸大学医学部附属病院薬剤部より供与を受けた。L2 および L2-pRc/CMV-SOD 細胞の培養は、5% CO₂ の存在下、10% FBS、penicillin (50 U/mL)、ならびに streptomycin (50 µg/mL) を添加した Ham's F12 nutrient medium にて行った。

3. 総 SOD 活性測定

回収した細胞を PBS にて洗浄し、精製水で再懸濁後、凍結融解を繰り返すことにより細胞を破壊した。これを 14,000 rpm、10 分間遠心し、得られた上清を試料とした。

試料中の総 SOD 活性は大柳の亜硝酸法に従い測定した⁶²⁾。活性値は、試料中の総タンパク質にて補正した。総タンパク質の測定には、Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories) を用いた。

4. 遺伝子導入肺上皮細胞に対する PQ 負荷実験

L2 および L2-pRc/CMV-SOD 細胞に対する活性酸素毒性の負荷は、35 mm culture dish にて行った。すなわち、 2.0×10^5 cells の L2 および L2-pRc/CMV-SOD 細胞を culture dish に播種し、24 時間

培養後、10 % FBS、penicillin (50 U/mL)、ならびに streptomycin (50 μ g/mL)を添加した Ham's F12 nutrient medium に置換し、PQ を最終濃度として 100 μ M となるように添加した。この 24 時間後、細胞を回収し、総 SOD 活性を測定した。

5.統計学的処理

数値はすべて平均(mean)±標準誤差(SEM)にて表した。統計学的解析は分散分析を用いて行い、有意差のあるものについてはさらに *post hoc test* として Fischer's PLSD の方法を用いて多重比較を行い、2 群間の有意差を検定した。有意水準 α は、0.05 とした。

引用文献

- 1) J. Zhang, J. R. Clark Jr., E. H. Herman, V. J. Ferrans. Doxorubicin-induced apoptosis in spontaneously hypertensive rats: differential effects in heart, kidney and intestine, and inhibition by ICRF-187. *J. Mol. Cell Cardiol.* **28**: 1931–1943, 1996.
- 2) H. Ito, T. Shimojo, H. Fujisaki, M. Tamamori, S. Ishiyama, S. Adachi, S. Abe, F. Marumo, M. Hiroe. Thermal preconditioning protects rat cardiac muscle cells from doxorubicin- induced apoptosis. *Life Sci.* **64**: 755–761, 1999.
- 3) W. F. Anderson, R. M. Blaese, K. Culver. The ADA human gene therapy clinical protocol: Points to Consider response with clinical protocol. *Hum. Gene. Ther.* **1**: 331-362, 1990.
- 4) R. M. Blaese, K. W. Culver, A. D. Miller, C. S. Carter, T. Fleisher, M. Clerici, G. Shearer, L. Chang, Y. Chiang, P. Tolstoshev, J. J. Greenblatt, S. A. Rosenberg, H. Klein, M. Berger, C. A. Mullen, W. J. Ramsey, L. Muul, R. A. Morgan, W. F. Anderson. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* **270**: 475-480, 1995.
- 5) C. A. Mullen, K. Snitzer, K. W. Culver, R. A. Morgan, W. F. Anderson, R. M. Blaese. Molecular analysis of T lymphocyte-directed gene therapy for adenosine deaminase deficiency: long-term expression *in vivo* of genes introduced with a retroviral vector. *Hum. Gene. Ther.* **7**: 1123-1129, 1996.
- 6) M. Onodera, T. Ariga, N. Kawamura, I. Kobayashi, M. Ohtsu, M. Yamada, A. Tame, H. Furuta, M. Okano, S. Matsumoto, H. Kotani,

- G. J. McGarrity, R. M. Blaese, Y. Sakiyama. Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *Blood* **91**: 30-36, 1998.
- 7) J. S. Weber, J. C. Yang, S. L. Topalian, D. J. Schwartzentruber, D. E. White, S. A. Rosenberg. The use of interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **10**:33-40, 1992.
 - 8) S. Kagawa, T. Fujiwara, N. Tanaka. Clinical study of adenoviral mediated p53 gene therapy for non-small cell lung cancer in Japan. *Gan To Kagaku Ryoho* **30**:193-197, 2003.
 - 9) D. M. Harvey, C. T. Caskey. Inducible control of gene expression: prospects for gene therapy. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**: 512–518, 1998.
 - 10) S. E. Raper, N. Chirmule, F. S. Lee, N. A. Wivel, A. Bagg, G. P. Gao, J. M. Wilson, M. L. Batshaw. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* **80**: 148-58, 2003.
 - 11) T. Curran. FOS and JUN: oncogenic transcriptional factors. *Tohoku J. Exp. Med.* **168**: 169-174, 1992.
 - 12) D. Forrest, T. Curran. Crossed signals: oncogenesis transcriptionalfactors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2**: 19-27, 1992.
 - 13) W. Lee, P. Mitchell, R. Tjian. Purified transcriotional factor AP-1 interacts with TPA inducible elements. *Cell* **49**:741-752, 1987.
 - 14) M. C. Hollander, A. J. Fornace Jr. Induction of fos RNA by

- DNA-damaging agents. *Cancer Res.* **49**: 1687-1692, 1989.
- 15) M. Buscher, H. J. Rahmsdorf, M. Liftin, M. Karin, P. Herrlich. Activation of the c-fos gene by UV and phorbol ester: different signal transduction pathways converge to the same enhancer element. *Oncogene* **3**: 301-311, 1988.
 - 16) M. Djavaheri-Mergny, J. L. Mergny, F. Bertrand, R. Santus, C. Maziere, L. Dubertret, J. C. Maziere. Ultraviolet-A induces activation of AP-1 in cultured human keratinocytes. *FEBS Lett.* **384**: 92-96, 1996.
 - 17) N. H. Heintz, Y. M. Janssen, B. T. Mossman. Persistent induction of c-fos and c-jun expression by asbestos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 3299-3303, 1993.
 - 18) A. Puga, D. W. Nebert, F. Carrier. Dioxin induces expression of c-fos and c-jun proto-oncogenes and large increase in transcription factor AP-1. *DNA Cell Biol.* **11**: 269-281, 1992.
 - 19) S. Srinivasan, M. E. Hatley, D. T. Bolick, L. A. Palmer, D. Edelstein, M. Brownlee, C. C. Hedrick. Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. *Diabetologia* **47**: 1727-1734, 2004.
 - 20) J. Springer, D. Pleimes, F. R. Scholz, A. Fischer. Substance P mediates AP-1 induction in A549 cells via reactive oxygen species. *Regul. Pept.* **124**: 99-103, 2005.
 - 21) M. H. Kim, H. S. Cho, M. Jung, M. H. Hong, S. K. Lee, B. A. Shin, B. W. Ahn, Y. D. Jung. Extracellular signal-regulated kinase and AP-1 pathways are involved in reactive oxygen species-induced

- urokinase plasminogen activator receptor expression in human gastric cancer cells. *Int. J. Oncol.* **26**: 1669-1674, 2005.
- 22) A. Kinoshita, D. Kobayashi, Y. Hibino, T. Isago, K. Uchino, K. Yagi, M. Hirai, Y. Saitoh, F. Komada. Regulation of CMV promoter-driven exogenous gene expression with doxorubicin in genetically modified cells. *J. Pharm. Pharmacol.* **60**: 1659-1665, 2008.
- 23) A. D. Miller. Human gene therapy comes of age. *Nature* **357**: 455-460, 1992.
- 24) T. D. Palmer, G. J. Rosman, W. R. Osborne, A. D. Miller. Genetically modified skin fibroblasts persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**: 1330-1334, 1991.
- 25) G. G. Krueger, J. R. Morgan, C. M. Jorgensen, L. Schmidt, H. L. Li, M. K. Kwan, S. T. Boyce, H. S. Wiley, J. Kaplan, M. J. Petersen. Genetically modified skin to treat disease: potential and limitations. *J. Invest. Dermatol.* **103**: 76S-84S, 1994.
- 26) R. T. Skeel 編、古江尚、塚越茂、佐々木常雄、浦部晶夫、中根実訳、“癌化学療法ハンドブック第5版” メディカル・サイエンス・インターナショナル、東京
- 27) M. Ogura. Adriamycin (doxorubicin). *Gan To Kagaku Ryoho* **28**: 1331-1338, 2001.
- 28) M. E. Billingham, J. W. Mason, M. R. Bristow, J. R. Daniels. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat. Rep.* **62**: 865-872, 1978.
- 29) J. H. Doroshow, K. J. Davies. Redox cycling of anthracyclines by

- cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *J. Biol. Chem.* **261**: 3068–3074, 1986.
- 30) R. T. Dorr. Cytoprotective agents for anthracyclines. *Semin. Oncol.* **23**: 23–34, 1996.
- 31) B. Avalosse, F. Dupont, A. Burny. Gene therapy for cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **7**: 94-100, 1995.
- 32) Y. Kaneda, T. Nakajima, T. Nishikawa, S. Yamamoto, H. Ikegami, N. Suzuki, H. Nakamura, R. Morishita, H. Kotani. Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system. *Mol. Ther.* **6**: 219-26, 2002.
- 33) Y. Kaneda. New vector innovation for drug delivery: development of fusogenic non-viral particles. *Curr. Drug Targets.* **4**: 599-602, 2003.
- 34) M. Shimamura, R. Morishita, M. Endoh, K. Oshima, M. Aoki, S. Waguri, Y. Uchiyama, Y. Kaneda. HVJ-envelope vector for gene transfer into central nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**: 464-471, 2003.
- 35) M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805, 1994.
- 36) R. Heim, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien. Improved green fluorescence. *Nature* **373**: 663-664, 1995.
- 37) J. C. Lewis, S. Daunert. Dual detection of peptides in a fluorescence binding assay by employing genetically fused GFP and BFP mutants. *Anal. Chem.* **71**, 4321-4327, 1999.

- 38) R. Heim, D. C. Prasher, R. Y. Tsien. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 12501-12504, 1994.
- 39) X. Li, D. Chen, S. Yin, Y. Meng, H. Yang, K. R. Landis-Piwowar, Y. Li, F. H. Sarkar, G. P. Reddy, Q. P. Dou, S. Sheng. Maspin augments proteasome inhibitor-induced apoptosis in prostate cancer cells. *J. Cell Physiol.* **212**: 298–306, 2007.
- 40) K. I. Kim, J. H. Kang, J. K. Chung, Y. J. Lee, J. M. Jeong, D. S. Lee, M. C. Lee. Doxorubicin enhances the expression of transgene under control of the CMV promoter in anaplastic thyroid carcinoma cells. *J. Nucl. Med.* **48**: 1553–1561, 2007.
- 41) K. Kawai, K. Tani, N. Yamashita, S. Tomikawa, M. Eriguchi, M. Fujime, K. Okumura, T. Kakizoe, S. Clift, D. Ando, R. Mulligan, A. Yamauchi, M. Noguchi, S. Asano, H. Akaza. Advanced renal cell carcinoma treated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene therapy: a clinical course of the first Japanese experience. *Int. J. Urol.* **9**: 462-466, 2002.
- 42) B. P. Cormack, R. H. Valdivia, S. Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-38, 1996.
- 43) A. Kinoshita, D. Kobayashi, Y. Saitoh, N. Tanabe, K. Uchino, K. Nishiguchi, K. Okumura, F. Komada. Regulation of exogenous gene expression by superoxide. *Pharm. Res.* **23**: 2536-2541, 2006.
- 44) X. Li, A. Y. Sun. Paraquat induced activation of transcription factor AP-1 and apoptosis in PC12 cells. *J. Neural Transm.* **106**: 1-21, 1999.

- 45) P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**: 7413-7417, 1987.
- 46) R. Chiu, W. J. Boyle, J. Meek, T. Smeal, T. Hunter, M. Karin. The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* **54**: 541-552, 1988.
- 47) T. Hai, T. Curran. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**: 3720-3724, 1991.
- 48) P. Angel, M. Imagawa, R. Chiu, B. Stein, R. J. Imbra, H. J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich, M. Karin. Phorbol esterinducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* **49**: 729-739, 1987.
- 49) W. Lee, P. Mitchell, R. Tajian. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA inducible elements. *Cell* **49**: 741-752, 1987.
- 50) A. Kinoshita, D. Kobayashi, Y. Saitoh, F. Komada. Effects of anticancer agents and scavengers on CMV-promoter-driven exogenous gene expression in genetically modified cells. *J. Pharm. Pharmacol.* **61**: 527-531, 2009.
- 51) J. H. Goldie, A. J. Coldman, G. A. Gudauskas. Rationale for the use of alternating non-cross-resistant chemotherapy. *Cancer Treat. Rep.* **66**: 439-449, 1982.
- 52) J. Wendling, A. Marchand, A. Mauviel, F. Verrecchia. 5-Fluorouracil blocks transforming growth factor- β -induced α 2 type I collagen gene (*COL1A2*) expression in human fibroblasts via

- c-Jun NH2-terminal kinase/activator protein-1 activation. *Mol. Pharmacol.* **64**: 707-713, 2003.
- 53) K. J. Tanaka, K. Ogawa, M. Takagi, N. Imamoto, K. Matsumoto, M. Tsujimoto. RAP55, a Cytoplasmic mRNP Component, Represses Translation in *Xenopus* Oocytes. *J. Biol. Chem.* **281**: 40096-40106, 2006.
- 54) K. C. Martin. Local protein synthesis during axon guidance and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**: 305-310, 2004.
- 55) M. Brengues, D. Teixeira, R. Parker. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* **310**: 486-489, 2005.
- 56) M.E. Anderson, J. L. Luo. Glutathione therapy: from prodrugs to genes. *Semin. Liver Dis.* **18**: 415-424, 1998.
- 57) A. Mizuno, K. Umemura, M. Nakashima. Inhibitory effect of MCI-186, a free radical scavenger, on cerebral ischemia following rat middle cerebral artery occlusion. *Gen. Pharmacol.* **30**: 575-578, 1998.
- 58) M. Karin. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **270**: 16483-16486, 1995.
- 59) K. Mross, P. Maessen, W. J. Van Der Vijgh, H. Gall, E. Boven, H. M. Pinedo. Pharmacokinetics and metabolism of epidoxorubicin and doxorubicin in humans. *J. Clin. Oncol.* **6**: 517-526, 1988.
- 60) E. Ikegami, R. Fukazawa, M. Kanbe, M. Watanabe, M. Abe, M. Watanabe, M. Kamisago, M. Hajikano, Y. Katsube, S. Ogawa. Edaravone, a potent free radical scavenger, prevents anthracycline-induced myocardial cell death. *Circ. J.* **71**:

1815-1820, 2007.

- 61) 中野稔、浅田浩二、大柳善彦編、(1989)、“活性酸素—生物での生成・消去・作用の分子機構” 共立出版、東京
- 62) Y. Oyanagui. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* **142**: 290-296, 1984.
- 63) K. Okumura, K. Nishiguchi, Y. Tanigawara, S. Mori, S. Iwakawa, F. Komada, Enhanced anti-inflammatory effects of Cu, Zn-superoxide dismutase delivered by genetically modified skin fibroblasts *in vitro* and *in vivo*. *Pharm. Res.*, **14**: 1223-1227, 1997.
- 64) K. Nishiguchi, F. Komada, Y. Tanigawara, S. Mori, S. Iwakawa, K. Okumura, Effects of Cu, Zn-superoxide dismutase delivered by genetically modified skin fibroblasts on cold-induced skin edema in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **21**: 1379-1381, 1998.
- 65) T. Inazawa, T. Tanabe, H. Yamada, T. Nakaoka, Y. Hashimoto, T. Yamasaki, H. Kotaki, K. Tani, S. Asano, N. Yamashita. Glucocorticoid-regulated expression of exogenous human growth hormone gene in rats. *Mol. Ther.* **4**: 267-272, 2001.
- 66) S. Goverdhan, M. Puntel, W. Xiong, J. M. Zirger, C. Barcia, J. F. Curtin, E. B. Soffer, S. Mondkar, G. D. King, J. Hu, S. A. Sciascia, M. Candolfi, D. S. Greengold, P. R. Lowenstein, and M. G. Castro. Regulatable Gene Expression Systems for Gene Therapy Applications: Progress and Future Challenges. *Mol. Ther.* **12**: 189-211, 2005.

本学位論文の審査は、城西大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 城西大学大学院薬学研究科教授 薬学博士 小林 大介

副査 城西大学大学院薬学研究科教授 薬学博士 川嶋 洋一

副査 城西大学大学院薬学研究科教授 薬学博士 日比野 康英