

癌の遺伝子治療

田中紀章
岡山大学医学部第一外科

要旨

癌抑制遺伝子p53の突然変異や欠損による機能的異常は、多くのヒト癌で普遍的かつ高頻度に認められている。p53タンパク質の機能の一つとしては、細胞増殖に関するいろいろな遺伝子の発現制御を介した細胞周期の調節が考えられているが、その他に最近アポトーシスの誘導分子としても注目を浴びてきている。正常型p53遺伝子を有する胃癌、大腸癌では、術前化学療法や放射線療法で癌細胞のアポトーシスが誘導されたが、変異型p53を発現する腫瘍ではアポトーシスに陥った細胞はほとんど認められなかった。ヌードマウスの皮下に移植したp53遺伝子に異常を持つヒト肺癌腫瘍にリコンビナント・アデノウイルスベクターを用いて正常型p53遺伝子を導入すると、抗癌剤に対する感受性が劇的に増強し、シスプラチンの腹腔内投与により腫瘍内にアポトーシスによる広範囲な組織破壊が認められた。この正常型p53発現アデノウイルスベクターとDNA障害性抗癌剤を併用した遺伝子治療は、臨床的にヒト悪性腫瘍に応用可能と考えられる。

はじめに

最近の分子生物学的解析技術の著しい進歩により、癌の発生および進展において遺伝子レベルでの変化が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。遺伝性腫瘍疾患の解析によりいくつかの癌関連遺伝子が単離されたが、多くの自然発生の癌でも複数の遺伝子に異常が検出されており、多段階遺伝子異常と悪性化は相関すると考えられ¹⁾、この癌化の過程には、癌遺伝子と癌抑制遺伝子の二つの遺伝子ファミリーが関与している²⁾。

癌抑制遺伝子はその正常機能が脱落した時に細胞を癌化させるものであり、遺伝子転写、細胞分裂、およびDNAの修復などに働いている。多くの癌では、片方のアレルの癌抑制遺伝子が部分あるいは完全欠失し同時に対立遺伝子に点突然変異などの微小変異が生じることで、その癌抑制機能が不活化されている。癌抑制遺伝子の場合、機能消失のためには染色体両腕に何らかの異常が必要であり、劣性で作用している。

癌抑制遺伝子の変異や欠失により引き起こされた癌化の現象は、単一コピーの正常癌抑制遺伝子を移

入することにより修復可能であると考えられる³⁾。我々は、多くの癌でその異常が高頻度に認められる癌抑制遺伝子p53に着目し、リコンビナント・アデノウイルスベクターを用いて生体内の癌組織に直接in vivoで正常型p53遺伝子を導入する遺伝子治療を考えている。本稿では、p53の生理的機能について概観し、p53遺伝子発現アデノウイルスの機能と効果を紹介し臨床応用の可能性について言及する。

p53遺伝子の構造

p53遺伝子は第17番染色体の短腕上に存在し、11個のエクソンを持って393個のアミノ酸をコードしている。p53タンパク質の生物活性としては種々のDNAやタンパク質との結合による転写制御が知られている。その発見の契機となったSV40 large T-antigenとの複合体の形成、アデノウイルスE1領域やヒトパピローマウイルスE6・E7などのウイルスタンパク質との結合などの他にE2F1、MDM2、HSP70などの細胞内蛋白質との結合が報告されている⁴⁾。p53は大きく3つの部位からなる。1. p53の転写活性化を担うN末端領域(1~94番目のアミノ酸)、2. DNA結合ドメインとしてのコア領域(102~292番アミノ酸)、3. C末端領域(319~360番アミノ酸まで)の3領域である。第2のコア領域で野生型p53は後述の特異的DNA配列と結合して転写活性化を示す。第3のC末端領域は核への局在、四量体の形成、非特異的DNA損傷の認識などの多様な役割を有する。紫外線、放射線によってDNAに損傷が生じると、そのDNAが転写、複製される前にnucleotide excision repair反応によって修復されるが、この機能にp53が関与している。

p53遺伝子の異常は、多くの遺伝性および自然発生のヒト癌で認められており、その種類は大腸癌・肺癌・乳癌・白血病など多岐に渡っている。しかし、ほとんどの変異はコア領域の第130から第290アミノ酸配列領域で検出されており、四つの高度保存領域Ⅱ~Ⅴ(117-142、171-181、234-258、270-286)に限局している。正常型p53は変異型p53より優性であり、対立遺伝子の両アレルが同時に点突然変異などで不活化されるか、片方が欠失すると同時に他方に変異が出現することにより細胞は癌化される。変異型p53は正常型p53に比べて極めて長い代謝

安定性を持っており、癌細胞においてp53タンパク質の発現レベルは著しく増強している。

正常型p53タンパク質の生理機能の一つとして、細胞周期のチェック・ポイントとしての作用がある。最近、p53遺伝子失損マウスの胸腺細胞を用いた実験系で、p53遺伝子が放射線やDNA障害性抗癌剤により誘導されるアポトーシスにおいて重要な因子となっていることが明らかになってきた⁶⁾⁷⁾。

転写因子としてのp53

p53は転写因子として多くの遺伝子発現を制御しており、その結合塩基配列は5'-RRRC(A/T)(T/A)GYYY-3'(Rはプリン、Yはピリミジン)と同定されている。このp53特異的結合配列(p53 responsive element:p53RE)には2分子のp53が結合し、4量体を形成する。p53は0~10bp離れてタンデムに並んだp53REにそれぞれ作用するとされている⁸⁾。正常なp53は、p21^{waf1/cip1}、gadd45、baxなどのp53REを持つプロモーターに対して転写を活性化し、それぞれの遺伝子発現を促進する⁹⁾¹⁰⁾。また、p53REを持たないc-jun、c-fos、c-myc、interleukin-6、Rb (retinoblastoma)、bcl-2などいくつかの遺伝子は、p53により転写が抑制されることが知られている¹¹⁾¹²⁾。

細胞周期の調節はp53の最初に明らかになった機能であり、下流に存在する関連遺伝子の相互関係が解明されつつある。放射線や薬剤によりDNAの損傷が生じると細胞内のp53の過剰発現が見られ、cyclin-dependent kinase (Cdk) 阻害蛋白質であるp21^{waf1/cip1}が活性化される¹³⁾。通常の細胞周期過程では、Rbのリン酸化によりRbと転写因子E2Fの結合が離れ、遊離したE2Fの働きでS期へと移行している。しかし、p21^{waf1/cip1}レベルの上昇は、Cdkファミリーの活性を阻害しRbのリン酸化を防ぐことで細胞周期のG₁期からS期への進行を停止させる¹⁴⁾。

p53により転写が抑制される遺伝子のうち細胞周期調節に関与する遺伝子として最も重要なものはPCNAである。p53により転写が活性化されるMDM2はp53に直接結合することによりp53の配列特異的転写活性化を阻害してネガティブ・フィードバックの役割を果たしている。

癌細胞に外来性に正常なp53遺伝子を導入しp53の過剰発現を来すことで、この細胞周期停止の現象を人工的に引き起こすことができる¹⁵⁾。しかし、肉眼的な固形腫瘍の治療を考えた場合、増殖抑制のみでは腫瘍縮小は期待できず、何らかの細胞障害活性が必要である。

p53遺伝子導入によるアポトーシス誘導

アポトーシス(プログラム細胞死)はネクローシス(壊死)とは異なる細胞死の形態で、特異的なDNAの断片化を特徴とする生体内における生理的細胞除去

の過程である。DNA損傷により細胞周期が停止した時点で通常DNA損傷の修復が試みられる。前述のとおりp53はこのDNA修復に関与するが、それが不可能な場合、その細胞はアポトーシスに陥り生体内から除去される。このアポトーシスの過程にも正常なp53機能が関与しており、DNA損傷以外にもc-mycの過剰発現や血清、成長因子の除去などのストレスにより誘発されるアポトーシスはp53依存性であるとされている。実際に、正常なp53遺伝子を外来的に導入することで、多くの癌細胞でアポトーシス細胞死が観察される¹⁶⁾¹⁷⁾。最近著者らは、p21^{waf1/cip1}遺伝子導入でG₁期に停止したヒト培養癌細胞にさらにp53遺伝子を導入すると直後より顕著なアポトーシスが認められ、この系においてはp53によるアポトーシスがp21によるG₁期停止より優位に作用することを報告した¹⁸⁾。さらに、p53によりG₁期に停止する大腸癌細胞とアポトーシスを生じる大腸癌細胞を融合させると、p53遺伝子発現によりアポトーシスが認められ、p53依存性アポトーシスは細胞周期停止より優位であったという報告もある¹⁹⁾。すなわち、ある種の癌細胞においてはp53遺伝子は強力なアポトーシス・インデューサーとして機能する。

しかし、どのようにアポトーシスを誘導しているかという細胞内でのメカニズムについてはまだ不明な点が多い。p53はアポトーシスを誘導するbax遺伝子を活性化し¹⁰⁾、逆にアポトーシスを抑えるbcl-2遺伝子の転写を抑制する¹²⁾。これらの遺伝子産物は相互に結合し、BaxとBcl-2がヘテロダイマーを形成するとアポトーシスは抑制され、Baxがホモダイマーを作るとアポトーシスを誘導するように作用する。また、p53はアポトーシスのシグナル伝達に重要なFas/Apo-1分子の発現を増強する²⁰⁾。しかし、多くのヒト培養癌細胞を用いたp53遺伝子導入実験において、アポトーシスの発生とこれらの分子の発現レベルとは必ずしも相関しておらず、p53を介したアポトーシスの誘導機構は単一のものではないと考えられる。

p53遺伝子変異による化学療法および放射線療法に対する抵抗性

p53遺伝子も前述の如くアポトーシスの経路に影響を与えており、その異常はアポトーシス耐性の機構の一つと考えられている。最近、p53遺伝子欠損マウスから得た線維芽細胞をアデノウイルスE1とras癌遺伝子で癌化させヌードマウスに移植した腫瘍は抗癌剤や放射線に感受性を示さないが、p53遺伝子を持つ正常マウスの線維芽細胞から誘導された腫瘍では顕著な治療効果が認めらるという報告がなされた²¹⁾²²⁾。また、我々もp53遺伝子のアポトーシス感受性への関与を検討するために、術前化学療法あるいは放射線療法を施した胃癌および大腸癌の手

術標本を *in situ* でアポトーシスを確認できる terminal deoxy-nucleotidyl transferase-mediated nick end labeling (TUNEL)²³⁾ にて検索した。正常型p53遺伝子を持つ腫瘍ではアポトーシスを呈した癌細胞が多く認められたが、変異型p53を発現する腫瘍ではアポトーシスに陥った細胞はほとんど見られなかった。したがって、臨床の癌においてもp53遺伝子の異常は抗癌剤耐性に重要な役割を果たしており、正常型p53遺伝子を導入することで抗癌剤の感受性、すなわちアポトーシス感受性を誘導することができると期待される。

p53遺伝子導入のためのアデノウイルスベクター

遺伝子を、ターゲットとなる細胞に効率良く導入するベクターとして最もよく用いられているのは、マウス由来のレトロウイルス・ベクターである。米国で行われているほとんどの遺伝子治療の臨床プロトコルはこのシステムを使用しているが、このベクターの短所としては高力価のウイルスを得ることが困難なこと、活発に増殖している細胞にしか感染できないことなどがあげられる。そこで近年、高力価のものが得られ、非増殖性細胞にも感染可能なアデノウイルスベクターが脚光を浴びるようになってきた。我々は、生体内で増殖できないように修飾されたアデノウイルスベクターを用いて、正常型p53遺伝子発現アデノウイルスを作成した²⁴⁾²⁵⁾。サイトメガロウイルス・プロモーターおよびp53cDNAをシャトル・ベクターであるpXCJL1のXbaI/ClaI制限酵素切断部位に挿入し、アデノウイルス5型のゲノムを持つpJM17とともにAdE1A移入ヒト胎児腎臓細胞293にトランスフェクトした。cytopathic effect (CPE)を示す293細胞の培養上清を集め、293細胞内でのリコンビネーションによりp53遺伝子がアデノウイルスベクター内に組み込まれたことをpolymerase chain reactions (PCR)にて確認し、その上清をウイルス液として実験に用いた。

p53遺伝子導入による抗癌剤感受性の誘導

正常型p53遺伝子を持つH226細胞はシスプラチンやエトポシドなどの抗癌剤に感受性があり、24時間処理後はほとんどの細胞がアポトーシスに陥っている。しかし、p53遺伝子を欠失しているH358細胞はシスプラチン抵抗性で、24時間処理しても細胞は増殖を続けた。また、正常型p53遺伝子を導入することである種の細胞ではアポトーシスが誘導されることが報告されているが²⁶⁾²⁷⁾、H358細胞ではp53遺伝子の発現のみではアポトーシスは認められなかった。

単層培養H358細胞に正常型p53遺伝子発現アデノウイルスを感染させ、その後シスプラチンで24時間処理したところ、直後から細胞数の著しい減少が見

られ、ゲノムDNAのアガロース電気泳動でアポトーシスに特異的なDNAの断片化が認められた。

さらに、p53遺伝子導入によるシスプラチン感受性の誘導が *in vivo* でも可能かどうかヌードマウスを用いた実験を行った。H358細胞を4週齢雌のヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍径が約5mmとなる30日後よりp53アデノウイルスを腫瘍内に局注し、同時にシスプラチンを腹腔内に投与した。これを連続3日間繰り返して、腫瘍径の変化を観察した。p53アデノウイルス単独投与でも腫瘍増殖の軽度抑制が認められたが、シスプラチンの同時投与により腫瘍の部分的退縮が見られ、腫瘍径は他のどの治療群より有意に小さく保たれていた。組織学的検討では、同時投与群ではウイルスの局注部位に広範な組織破壊が見られ、TUNEL染色陽性の細胞が周辺の癌組織との境界に多数存在した。

バイスタンダー効果

アデノウイルスベクターに先行した正常型p53遺伝子発現レトロウイルスベクター (ITRp53A)の臨床試験の初期9例の解析結果はすでに報告されている²⁸⁾。臨床例で認められた局所的な腫瘍縮小効果は、レトロウイルスベクターの *in vivo* での遺伝子導入効率から予測される以上のものであり、遺伝子導入された細胞がその近傍の遺伝子導入されなかった細胞に影響を与える、いわゆる“バイスタンダー効果”の関与が示唆される。単純ヘルペス・チミジンキナーゼ遺伝子を用いた自殺遺伝子治療では、バイスタンダー効果が認められるという報告が多いが、その他の *in vivo* 遺伝子治療ではまだほとんどその存在が証明されていない。筆者らは、現在、p53の標的遺伝子の中で血管新生に関する遺伝子群に注目して基礎研究を行っている。

固形腫瘍が増殖するためには腫瘍組織への血液供給のための新しい毛細血管の形成が不可欠であり、血管新生能を獲得した癌細胞が近傍の既存血管から新生血管を誘導することで増殖が開始される。最近、線維芽細胞においてはp53は血管新生抑制因子である thrombospondin-1 (TSP-1)の発現を増強し²⁹⁾、また癌細胞ではvascular endothelial growth factor (VEGF)のプロモーター活性を抑えることでVEGF mRNAレベルを下げる事が確認された³⁰⁾。これらの結果は、正常なp53遺伝子導入で血管新生関連遺伝子の発現を修飾し、血管新生を阻害することで腫瘍増殖を抑制できる可能性を示唆している。筆者らの実験でも、p53遺伝子に変異を持つヒト非小細胞肺癌細胞へアデノウイルスベクターにより正常なp53遺伝子を導入することで、VEGFの蛋白質レベルが著しく減少した。 *in vivo* 遺伝子導入を考えた場合、p53遺伝子が導入された癌細胞からの血管新生因子の分泌が減弱すれば、パラクリン機構で近傍の

遺伝子導入されなかった癌細胞にも影響を与え、バイスタンダー効果が期待される。今後、このメカニズムを検討することで、腫瘍を構成する100%の癌細胞への遺伝子導入は困難であるという現在のベクターの限界を改善する方法を開発できるかもしれない。

p53遺伝子の癌遺伝子治療への応用

以上の知見や前述の基礎実験結果をもとに、我々は正常型p53遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いて抗癌剤耐性を克服する遺伝子治療の臨床プロトコルを提案している。対象はp53遺伝子に異常を持つ肺癌であり、内視鏡的にp53アデノウイルスを腫瘍内に局注、さらにシスプラチンの全身投与を併用する。腫瘍の部分的退縮が見られ、切除不能の癌が切除可能となれば術前補助療法として有効であると考えられる。

文 献

- 1) Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767, 1990.
- 2) Spandidos DA, Anderson MLM: Oncogenes and onco-suppressor genes: their involvement in cancer. *J Pathol* 157: 1-10, 1989.
- 3) Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T, et al: A retroviral wild-type p53 expression vector penetrates human lung cancer spheroids and inhibits growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 53: 4129-4133, 1993.
- 4) Fujiwara T, Cai D-W, Mukhopadhyay T, et al: Therapeutic effect of a retroviral wild-type p53 expression vector in an orthotopic lung cancer model. *J Natl Cancer Inst* 86: 1458-1462, 1994.
- 5) Levine AJ, Momand J, Finlay CA: The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351: 453-456, 1991.
- 6) Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, et al: p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362: 847-849, 1993.
- 7) Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, et al: Thymocyte apoptosis induced by p53 dependent and independent pathways. *Nature* 362: 849-852, 1993.
- 8) El-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, et al: Definition of consensus binding site for p53. *Nature Genet* 1: 45, 1992.
- 9) Harris CC: Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 88: 1442, 1996.
- 10) Miyashita T, Reed JC: Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80: 293, 1995.
- 11) Ginsberg D, Mechta F, Yanif M, et al: Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9979, 1991.
- 12) Miyashita T, Krajewski S, Krajewski M, et al: Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9: 1799, 1994.
- 13) El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al: WAF1, a potent mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817, 1993.
- 14) Harper JE, Adami GR, Wei N, et al: The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G₁ cyclin dependent kinases. *Cell* 75: 805, 1993.
- 15) Fujiwara T, Mukhopadhyay T, Cai DW, et al: Retroviral-mediated transduction of p53 gene increases TGF- β expression in a human glioblastoma cell line. *Int J Cancer* 56: 834, 1994.
- 16) Shaw P, Bovey R, Tardy S, et al: Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4495, 1992.
- 17) Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T, et al: A retroviral wild-type p53 expression vector penetrates human lung cancer spheroids and inhibits growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 53: 4129, 1993.
- 18) Kagawa S, Fujiwara T, Hizuta A, et al: p53 expression overcomes p21^{WAF1/CIP1}-mediated G₁ arrest and induces apoptosis in human cancer cells. *Oncogene* (in press), 1997.
- 19) Polyak K, Waldman T, He T-C, et al: Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes & Dev* 10: 1945, 1996.
- 20) Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, et al: Wild-type human p53 and a temperature sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* 15: 3032, 1995.
- 21) Lowe SA, Ruley HE, Jacks T, et al: p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anti cancer agents. *Cell* 74: 957-967, 1993.
- 22) Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, et al: p53

- status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 266: 807-810, 1994.
- 23) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501, 1992.
- 24) Zhang W-W, Fang X, Mazur W, et al: High-efficiency gene transfer and high-level expression of wild-type p53 in human lung cancer cells mediated by recombinant adenovirus. *Cancer Gene Ther* 1: 1-10, 1994.
- 25) Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay, et al: Induction of chemosensitivity in human lung cancer cells in vivo by adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene. *Cancer Res* 54: 2287-2291, 1994.
- 26) Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Rotem J, et al: Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352: 345-347, 1991.
- 27) Shaw P, Bovey R, Tardy S, et al: Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4495-4499, 1992.
- 28) Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, et al: Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nature Med* 2: 985, 1996.
- 29) Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, et al: Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265, 1582-1584, 1994.
- 30) Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP: Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* 55: 6161, 1995.