

## 成松政治論文内容の要旨

### 主論文

#### Therapeutic Usefulness of Wild-Type p53 Gene Introduction

#### in a p53-Null Anaplastic Thyroid Carcinoma Cell Line

( p53 を発現しない甲状腺未分化癌における p53 遺伝子導入の治療的有用性 )

成松政治、永山雄二、秋野公造、安田晶子、山本敏憲、Yang Ting- Ting,

大津留晶、難波裕幸、山下俊一、綾部公懿、丹羽正美

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 83:3668-3672, 1998

長崎大学大学院医学研究科外科系専攻

( 指導教授 : 永安 武 教授 )

### [ 緒言 ]

腫瘍抑制遺伝子である p53 は放射線や抗癌剤などによる DNA 損傷後の細胞周期停止やアポトーシス誘導に重要な働きをしている。よって p53 の異常は癌化に深く関与し、実際 p53 は癌において最も高頻度に異常がみられる遺伝子である。さらに最近では p53 は細胞増殖抑制やアポトーシスの誘導以外に放射線や抗癌剤に対する感受性亢進、血管新生抑制効果〔血管新生促進因子である血管内皮増殖因子 ( VEGF ) 発現抑制、及び血管新生抑制因子である thrombospondin-1(TSP1)発現亢進〕も有することが報告されている。

甲状腺癌は病理学的に分化癌と未分化癌に大別され、p53 遺伝子異常は未分化型で 70~85%、分化型で 0~9%と報告されている。よって p53 遺伝子異常は甲状腺癌の分化型から未分化型への転換・進展の速さ・予後の悪さに関与していると考えられる。p53 に異常を持つ癌への正常 p53 遺伝子を導入する遺伝子治療の有用性が動物実験やヒトでの臨床応用で報告されており、我々も以前正常 p53 遺伝子導入の p53 を発現していない甲状腺癌細胞株(FRO)に及ぼす影響を検討し、アポトーシスではなく細胞周期 G1 停止を伴う細胞増殖抑制効果を見いだした。よって本研究ではさらなる p53 遺伝子導入の効果を検討するため、甲状腺未分化癌細胞株での p53 遺伝子発現の放射線や抗癌剤に対する感受性、血管新生に及ぼす影響を検討した。

### [ 材料と方法 ]

用いた細胞 ; p53 を発現していない甲状腺未分化癌細胞株 FRO と温度感受性変異 p53 遺伝子 ( p53Val138 ) を安定発現している tsFRO 細胞を用いた。p53-Val138 は 37 °C では変異型、32 °C では正常型の構造を呈する p53 である。

**細胞増殖・傷害試験**；これらの細胞を 37 ° 或いは 32 ° で培養し、抗癌剤（cisplatin, 5-fluorouracil, doxorubicin）放射線の細胞増殖に及ぼす影響を clonogenic assay、MTT 法、色素排除法により検討した。

**Northern blot 解析**；total RNA を抽出し、25 µg を既報の方法にそって Northern blot に供した。VEGF, TSP1, cyclophilin cDNA をプローベとして用いた。

**Immunoblot 解析**；細胞培養液を濃縮後、20 µl を既報の方法にそって抗 TSP1 抗体による Immunoblot に供した。

**In vitro 血管内皮細胞遊走試験**；牛動脈内皮細胞と Boyden chamber を用い、細胞培養上清の内皮細胞遊走に及ぼす影響を検討した。

### 【結果】

まず FRO 細と tsFRO 細胞の 37 ° と 32 ° での増殖を比較検討した。それぞれの 37 ° での細胞倍加時間は  $21.5 \pm 3.4$  (mean  $\pm$  SD, n = 3)  $23.2 \pm 3.6$  時間と同程度であったが、32 ° では  $36.0 \pm 10.6$ 、 $62.4 \pm 3.4$  時間と tsFRO で有意な細胞増殖抑制がみられた。次に抗癌剤に対する感受性の変化を検討したが、我々が用いた 3 種の抗癌剤（cisplatin, 5-fluorouracil, doxorubicin）では変化は認められなかった。一方放射線に対する感受性は tsFRO において 32 ° で亢進した。血管新生に関しては 32 ° では FRO と tsFRO 間で VEGF mRNA は差はなかったが、TSP1 mRNA 及び蛋白は tsFRO で約 2.5 倍ほど低下した。しかし 32 ° での FRO と tsFRO の細胞培養上清液を用いた in vitro 血管内皮細胞遊走試験は有意な差を示さなかった。

### 【結論】

本研究で我々は、p53 を発現していない甲状腺未分化癌細胞株 FRO の対する正常 p53 遺伝子治療は、以前報告した細胞増殖抑制効果のみでなく、放射線感受性亢進も誘導する事を示した。したがってこの p53 遺伝子治療と放射線療法の併用は臨床上有用であることが示唆される。

ただし、他の癌細胞で報告されている抗癌剤感受性亢進作用は見いだせなかった。この理由は現在不明であるが、今後他の抗癌剤との併用や異なる p53 発現量での検討が必要であろう。

また血管新生に関しては、以前の報告と異なり p53 は VEGF の発現には影響せず、TSP1 の発現を低下させた。この結果は in vivo で血管新生亢進を誘導する可能性を示唆しており、これは甲状腺未分化癌の p53 遺伝子治療では不利な効果となる。しかし in vitro での血管内皮遊走試験で有意な差がなかったため、今後 in vivo での検討が必要である。