

Improvement in radiosensitivity using small interfering RNA targeting p53R2 in esophageal squamous cell carcinoma

食道扁平上皮癌細胞において p53R2 を標的とした small interfering RNA を用いた放射線感受性増強効果の検討

横枕 直哉

【目的】

食道扁平上皮癌 (esophageal squamous cell carcinoma: ESCC) に対して化学放射線療法 (chemoradiation therapy: CRT) は最近広く行われている治療法の一つである。しかし、症例ごとに効果が様々であるため、治療前の CRT の感受性や耐性を含めた効果判定の予測が重要である。p53R2 は新規のリボヌクレオチド・リダクターゼ遺伝子であり、DNA 修復に必要なヌクレオチドを供給する。癌抑制遺伝子である p53 により発現が制御されており、放射線耐性と関連することが報告されている。一方、最近細胞に導入された RNA (small interfering RNA: siRNA) が標的遺伝子の mRNA を破壊することで発現を抑制する RNA 干渉という方法が発見され、*in vitro* での標的遺伝子の発現や機能を解析する方法としての重要な役割を担っている。今回、DNA 修復遺伝子である p53R2 をノックダウンするために、特異的 siRNA を作製し、ESCC 細胞株に導入することで、放射線感受性の改善が認められるかについて検討した。また、ESCC 39 症例の生検組織の p53R2 mRNA の発現と CRT の効果の関連性を検討した。

【材料および方法】

- 1) 対象: ヒト食道扁平上皮癌細胞株 (TE-6, TE-8, TE-9) および CRT 施行前の ESCC 39 症例の内視鏡下に得られた生検組織。
- 2) 方法: 食道扁平上皮癌細胞株の TE-6, TE-8, TE-9 に対し、放射線照射を行い、照射前後の p53 および p53R2 タンパク発現量を western blot 法で確認した。放射線照射量および p53R2 タンパク発現量と照射後生存率との関連性を検討した。次に TE-8 を親株として、p53R2 siRNA を lipofection 法で導入した TE-8/p53R2 siRNA 細胞株を作製し、照射前後での p53R2 タンパクおよび mRNA 発現量をそれぞれ western blot 法, RT-PCR 法で確認後、p53R2 タンパクの細胞内局在の変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、p53R2 siRNA 導入前後の両細胞株に対する放射線照射量と照射後生存率との関連性を検討した。さらに CRT 施行前の ESCC 生検組織を用い、p53R2 mRNA の発現を調べ CRT の効果と比較検討を行った。

【結果】

- 1) p53 タンパクの発現は全ての細胞株で放射線照射後に増加していた。また、p53R2 タンパクの発現は TE-6, TE-8, TE-9 の順で照射後に増加していた。照射後生存率は、照射量が増えるほど減少し、また p53R2 タンパク発現量が多いほど増加した (50%生存率の照射量は TE-6, TE-8, TE-9 で各々30Gy, 18.6Gy, 7.5Gy)。以上より、放射線感受性と DNA 修復遺伝子である p53R2 の関連性が認められた。
- 2) TE-8 及び TE-8/p53R2 siRNA 細胞株において、放射線照射後の p53R2 タンパクおよび p53R2 mRNA の発現は、いずれも siRNA 導入後に減少していた。また、p53R2 タンパクの細胞内局在について、TE-8 においては照射前後で細胞質から核内への移動を認めたが、TE-8/p53R2 siRNA では p53R2 タンパクの発現はほとんど認めなかった。さらに両細胞株の 50%生存率の照射量はそれぞれ 18Gy, 8.2Gy であったことより、p53R2 の発現を特異的 siRNA で抑制することで放射線感受性の増加を認めた。
- 3) CRT 施行前の ESCC 39 症例において、腫瘍部分の生検組織の p53R2 mRNA が低発現なものほど CRT 施行後の良好な治療効果が認められた ($p=0.003$)。

【結論及び考察】

多くの癌で高頻度に変異が生じる癌抑制遺伝子 p53 は、細胞生存のための細胞周期制御、DNA 修復、また細胞死のためのアポトーシス制御、p53 機能制御等といった複数の標的遺伝子の発現制御を行っている。しかし、この相反する機能をどのように使い分けて損傷細胞の生死の運命を決定しているのかは未だ解明されていない。p53R2 は新規の p53 標的遺伝子で様々な DNA 損傷の際の DNA 合成に必要な dNTP 供給に重要な働きを持つ。食道癌の生検組織における p53R2 タンパク発現と CRT の効果が相関する報告があり、今回ヒト食道扁平上皮癌細胞株を用いて RNA 干渉という方法で放射線感受性と p53R2 との関連性を検討した。その結果、p53R2 タンパクを発現しているものほど放射線感受性が低く、p53R2 siRNA で発現を抑制すると放射線感受性は改善した。また、39 例の食道癌の生検組織における p53R2 mRNA の発現と CRT 効果を比較すると、低発現例は CRT の良好な治療効果が認められた。今回、p53R2 をノックダウンする目的で用いた RNA 干渉とは、21-23 塩基の 2 本鎖 RNA である siRNA を使用することにより遺伝子の抑制が可能な方法である。その標的タンパク発現の抑制作用は、濃度、持続時間、最大作用いずれにおいても従来のアンチセンス DNA よりも優れている。in vivo における標的部分への siRNA の輸送方法としてウイルスベクター法、ハイドロダイナミクス法、カチオンリポソーム法および局所投与等の報告があるが、臨床応用には安全性等の面で大きな課題が残されている。

今回、siRNA を用いて p53R2 をノックダウンすることにより食道扁平上皮癌細胞株における放射線感受性の改善が認められたことは、治療前奏功例の予測のみならず p53R2 陽性例で CRT 効果改善の一手段として期待されると考えられた。

論文審査の要旨

報告番号	医研第 666号	氏名	横枕 直哉
審査委員	主査	秋山 伸一	
	副査	中條 政敬	黒野 祐一

Improvement in radiosensitivity using small interfering RNA targeting p53R2 in esophageal squamous cell carcinoma

(食道扁平上皮癌細胞においてp53R2を標的とした

small interfering RNAを用いた放射線感受性増強効果の検討)

食道扁平上皮癌(esophageal squamous cell carcinoma:ESCC) に対して化学放射線療法(chemoradiation therapy:CRT)は最近広く行われている治療法の1つである。しかし、症例ごとに効果が様々であるため感受性や耐性を含めた効果判定の予測が重要である。p53R2は新規のリボヌクレオチド・リダクターゼ遺伝子であり、DNA修復に必要なヌクレオチドを供給する。癌抑制遺伝子p53により発現が制御され、放射線耐性と関連する報告がある。一方、細胞に導入されたRNA(small interfering RNA:siRNA)が標的遺伝子のmRNAを破壊することで発現を抑制するRNA干渉という方法が発見され、標的遺伝子の発現や機能を解析する方法としての重要な役割を担っている。今回、p53R2をノックダウンするために特異的siRNAを作製し、ESCC細胞株への導入と放射線感受性の改善効果について検討した。また、ESCC39症例の生検組織のp53R2 mRNAの発現とCRTの効果の関連性を検討した。

ESCC細胞株(TE-6,TE-8,TE-9)に対し放射線照射を行い、照射前後のp53およびp53R2タンパク発現量を確認し、照射量およびp53R2タンパク発現量と照射後生存率との関連性を検討した。次に、TE-8を親株としてp53R2 siRNAを導入した細胞株を作製し、照射前後でのp53R2タンパク、mRNA発現量およびp53R2の細胞内局在の変化を観察した。また、p53R2 siRNA導入前後の両細胞株に対する放射線照射量と照射後生存率との関連性を検討した。さらに、CRT施行前のESCC生検組織を用い、p53R2 mRNAの発現を調べCRTの効果と比較検討を行った。

その結果、本研究においては以下の知見が明らかにされた。

- 1) p53タンパクの発現は全ての細胞株で放射線照射後に増加し、p53R2タンパクの発現はTE-6,TE-8,TE-9の順で照射後に増加していた。照射後生存率は照射量が増えるほど減少し、p53R2タンパク発現量が多いほど良好であった。以上より、放射線感受性とp53R2の負の関連性が認められた。
- 2) siRNA導入前後での細胞株において、放射線照射後のp53R2タンパクおよびp53R2 mRNAの発現はいずれも導入後に減少していた。また、p53R2タンパクの細胞内局在について、siRNA導入前は照射前後で細胞質から核内への移動を認めたが、siRNA導入後ではp53R2タンパクの発現はほとんど認めなかった。さらに、p53R2の発現を特異的siRNAで抑制することで放射線感受性の増加を認めた。
- 3) CRT施行前のESCC39症例において、腫瘍部分の生検組織のp53R2 mRNAが低発現なものほどCRT施行後の良好な治療効果が認められた(P=0.003)。

多くの癌で高頻度に変異が生じるp53は細胞周期、DNA修復、アポトーシスといった複数の遺伝子の発現制御を行っているが、その選択は未だ解明されていない。p53R2はp53の下流遺伝子の1つであり、DNA損傷時の修復に重要な働きを持つ。

本研究は、ESCC細胞株を用いた実験からは、①p53R2発現と放射線感受性の負の関連性、②siRNAを用いたp53R2のノックダウンによる放射線感受性の改善を、また腫瘍の生検組織では③p53R2 mRNAの低発現とCRTの良好な治療効果を明らかにした。P53R2mRNAの測定による治療奏功例の治療前予測のみならず、p53R2陽性例でのCRT効果改善の一手段として期待できる点で興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研 第 666 号	氏名	横枕 直哉
審査委員	主査	秋山 伸一	
	副査	中條 政敬	黒野 祐一

主査および副査の3名は、平成20年3月31日、学位請求者 横枕直哉 君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に関連事項について試問を行った。具体的には以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) 一般的にp53は癌抑制遺伝子として考えられているが、p53R2は放射線抵抗因子として考えて良いか？
 回答) p53のみでは放射線治療との関連が明白でないが、p53R2を加えることでより感受性が明確となるため、p53R2は放射線抵抗因子と考えられる。

質問 2) 放射線照射を行うとp53R2の発現が亢進しているが、その意義は？
 回答) 放射線照射によるDNA損傷が生じると、p53の下流遺伝子であるp53R2が誘導されてDNAの修復が行われるため、p53R2の発現が亢進する。

質問 3) p53R2 siRNAをトランスフェクションしたあとに放射線照射を行い実験しているが、トランスフェクション自体での毒性はないか？
 回答) トランスフェクション後の放射線照射の有無で比較検討は行っていないが、コントロールのsiRNAを導入し、放射線照射を行った群と、トランスフェクションを行わずに放射線照射を行った群の照射後生存率はほとんど変わらなかったため、細胞毒性は無視できると思われる。

質問 4) 将来、siRNAを用いた遺伝子治療は臨床に応用できる可能性はあるか？
 回答) siRNAを用いた標的遺伝子の発現抑制は、動物実験レベルでも行われており有効な結果が得られているため、実際に臨床に応用できる可能性は十分にあると思われるが、siRNAの投与方法に関しては、安全性等の面で大きな課題が残されている。

質問 5) 将来、臨床に応用するとき投与方法はどうするか？
 回答) 現時点で報告されているsiRNAの投与方法は、ウイルスベクター法、ハイドロダイナミクス法、カチオニックリポソーム法による局所投与方法があるが、安全性や投与方法に関して、実用化は今のところまだ難しいと思われる。

質問 6) リポソームを使って*in vivo*で実験している報告があるが、どのような投与方法か？
 回答) カチオニックリポソームとsiRNAとの複合体を作製し、癌モデルマウスに静脈内投与方法を採用している。この方法で強い抗腫瘍作用を認めたと報告されている。

質問 7) 実験に使用した放射線は単回照射、分割照射のどちらか？
 回答) 今回の放射線投与はいずれも単回照射である。

質問 8) p53が発現している方が予後は良いのか？
 回答) p53タンパクは半減期が非常に短いため、免疫染色の判定で陰性がwild type p53、陽性がmutant p53となる。したがって、p53の発現陰性例、すなわちwild type p53の症例は変異がないため、生存率良好な結果となる。

質問 9) 放射線照射によって誘導されるp53R2は抑制可能か？
 回答) 今回の実験では、p53R2 siRNAを導入した細胞において放射線照射後のp53R2の発現が抑制されているのが確認できたので、放射線照射によって誘導されるp53R2の抑制も可能と考えられる。しかし、今回は単回照射のみの実験であるため、臨床での有効性を評価するためには、分割照射での確認が必要と思われる。

質問 10) p53R2の発現に関して、p53依存性と非依存性の経路があるか？
 回答) p53R2はp53の下流遺伝子として、また通常の細胞分裂時のDNA複製の際に誘導されるR2と非常に相同性を持っているためp53R2と呼ばれている。今回の実験で使用したp53 mutantの細胞であるTE-6においてもp53R2が誘導されていることから、p53非依存性の経路が存在すると考えられる。また、実際にp53ファミリーであるp73依存性のp53R2の発現も確認されている。

質問 1 1) 放射線照射前に発現しているp53R2と、照射後に誘導されるp53R2の発現機構は同じか？

回答) p53R2はDNA損傷時にp53を介して誘導されてくるため、放射線照射前の発現の意義に関しては不明であるが、実験操作上の細胞に対する何らかのストレスが影響しているのかもしれない。

質問 1 2) 放射線以外、例えば抗癌剤等でもp53R2が上昇するか？

回答) p53R2はDNA損傷時に誘導されてくるため、放射線以外でもDNA損傷を起こしうるものではp53R2は上昇する。実際に抗癌剤投与時のp53R2発現の上昇も確認されている。

質問 1 3) p53R2の発現は転移と相関があるか？

回答) 食道癌切除222症例に関しては、p53R2単独ではリンパ節転移、遠隔転移との相関が認められた。

質問 1 4) 無作為試験での手術単独群とCRT後手術群では治療範囲は同じか？

回答) 同じ治療が可能であるように症例が層別化された。したがって、リンパ節郭清範囲および放射線照射範囲は同じである。

質問 1 5) Table Iでは治療前のp53R2 mRNAの発現を調べているが、CRT後の発現は調べているか？

回答) 今回対象にした食道扁平上皮癌39症例に対しては、治療前の生検組織においてのみp53R2 mRNAの発現を調べた。

質問 1 6) p53R2の陽性例、陰性例の評価基準は？

回答) p53R2の免疫染色を行い、腫瘍部分の10%以上で発現を認めた場合を陽性、10%以下の発現で陰性と評価した。文献的にも同様な方法が行われている。

質問 1 7) 放射線照射でp53R2が誘導されているが、p21といった他のp53の下流遺伝子についてはどうか？

回答) 今回の実験では、p53のその他の下流遺伝子については調べていない。今後、調べる必要があると思われる。

質問 1 8) TE-8以外の細胞株でもp53R2 siRNA導入を行ったか？

回答) TE-6、TE-9の細胞株でも行ったが、siRNAの導入効率が不良であったこと、およびTE-8のみp53がwild typeであったことより、TE-8のみの実験とした。

質問 1 9) p53R2は機能的に核に集積することが重要か？

回答) DNAが損傷されるとp53が活性化され、その下流遺伝子であるp53R2が誘導されるが、その際p53R2は細胞質から核内に移動しDNA修復へと働く。今回の実験でも放射線照射後のp53R2は核内に集積していることが共焦点レーザー顕微鏡を用いて確認されている。

質問 2 0) p53R2の発現誘導機構に関してp53以外の経路はどのようなものがあるか？

回答) p53ファミリーであるp73によっても、p53R2は誘導発現されることが確認されている。

質問 2 1) p53が機能していない場合、p73が機能するとのことだが、p53が機能していてもp73が機能することもあるのでは？

回答) p53がmutant等により機能しない時は、p53ファミリーであるp73が機能することが報告されているが、今回のp53R2の誘導以外にも細胞周期調節、アポトーシスといったp53によって誘導される遺伝子の発現も確認されている。しかし、p53が機能している際のp73の働きに関しては明らかにされていない。

質問 2 2) 3つのcell lineは同じ症例から採取したものか？

回答) いずれのcell lineも別々の症例から採取したものである。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力と識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。