

論 文 要 旨

論 文 題 目

Molecular targeting of neuroblastoma with a novel p16INK4a transporter system

(神経芽細胞腫に対する新規輸送体タンパクを用いた p16INK4a 導入による分子標的治療について)

関西医科大学脳神経外科学講座
(指導: 浅井昭雄 教授)

川 口 琢 也

論文要旨

【研究目的】

神経芽細胞腫 (neuroblastoma 以下 NB) は胎生期の神経冠より発生する腫瘍で、我が国の小児悪性腫瘍のなかで、白血病に次いで発生頻度が高く、また小児固形悪性腫瘍のなかでは最も頻度が高い。そうした中、遺伝子検索も行われ、MYCN 遺伝子の遺伝子増幅、ALK 変異、p16Ink4a 蛋白質の欠損などが報告されているが、創薬には至っていない。

近年、細胞内へのドラッグデリバリーシステムとして有効で安全なツールとして、protein transduction domain systems(以下 PTDs)が注目されている。PTDs は生きた細胞の細胞膜を通過できるため、細胞内分子を標的とした機能性タンパクやペプチドを細胞に導入するのに有用であると考えられる。我々の研究チームが開発した細胞内に導入するシステムとして、PTDs と機能性ペプチド、あるいはタンパクを直接結合したシステムではなく、機能性ペプチドとそれらを細胞内に導入するための運搬を担うペプチドを別々に合成し、溶液上で混合することで両者を付着させ、その複合体で細胞内へ機能性ペプチドを導入するシステムがある。この論文では、神経芽細胞腫を対象として、p16Ink4a の最小機能性ペプチドを輸送体タンパクである Wr-T を用いて導入し、その抗腫瘍効果について評価した。

【研究方法】

まず NB cell について、p16, CDK4, CDK6, Cyclin D, pRb の発現を western blotting および PCR にて確認した。ついで、腫瘍抑制の機構を flow cytometry を用いて分析した。最終的に、*vitro* および *vivo*(mice を使用)にて p16INK4a+Wr-T を投与することで、NB cell の抑制効果があることを確認した。

【結果】

今回使用した 5 種類の NB cell で、p16 発現タンパク質は欠損が確認された。更にその主要抑制機構は、FITC-Anexin V と Propidium Iodide による染色で検証した結果、12 時間後の Annexin V 陽性、PI 陰性の割合は、Control 群で、2.1% Wr-T 群で 3.6% r9-p16 MIS peptide 群で 5.8% Wr-T/r9-p16 MIS peptide mix 群で 17.9%でありアポトーシスによる細胞死と考えられる。

また投与 24 時間後の細胞死の割合は、Control 群で、3.4% Wr-T 群で、6.8%、r9-p16 MIS peptide 群で 12%、Wr-T/r9-p16 MIS peptide mix 群で 81.3%であり r9-p16 MIS peptide 群でやや上昇するも、明らかに Wr-T/r9-p16 MIS peptide mix 群で高値を示し、Wr-T による r9-p16 MIS peptide の導入効率の上昇が示された。

Vitro では、Control 群と比較して、96 時間の段階で、p16 単独投与群が 15.1%~40.4%であったのに対して、p16INK4a+Wr-T 群では 79.6%~91.7%の腫瘍抑制効果を示した。

また *Vitro* でも、Control 群と比較して、14 日目の段階で、p16 単独投与群が 16%の腫瘍抑制効果を示したのに対して、p16INK4a+Wr-T 群では 75.6%の腫瘍抑制効

果を示した。

【考察】

細胞癌化の基本機構として、p53 経路があげられる。その経路のうち、p16INK4a は癌細胞の約 50%に失活が確認されている。つまりは、p16INK4a を導入することが可能であれば、多くの癌細胞の抑制しうる可能性を秘めている。しかし過去の文献からも導入効率が悪く、細胞癌化を抑制することが困難であった。そうした中 Wr-T を用いることで、その導入効率を大幅に上げることで細胞癌化の大幅な抑制が確認された。また、導入に当たり、生体内に元々存在する p16INK4a を用いているため、mice では、臓器、血液障害は確認されていない。これらを踏まえて、Wr-T を用いた機能性ペプチド、今回の論文では、p16INK4a を使用、の導入は、創薬に繋がる実用的システムであると考えられた。

今後、機能性ペプチドと PTDs として使用した Wr-T の分子レベルで結合様式の確認、細胞内での離散様式の検討が必要と考えまる。また、Wr-T を用いることで複数の機能性ペプチドを導入することも可能であり、多くの腫瘍系に適応することも可能と考える。