

氏 名（本籍）	もと 井 ふゆ ひこ 元 井 冬 彦
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 博 第 1 6 8 2 号
学位授与年月日	平 成 1 2 年 3 月 2 3 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）外科学系専攻
学位論文題目	Effective gene therapy for pancreatic cancer by cytokines mediated by restricted replication- competent adeno-virus. （制限増殖型アデノウイルスを用いた膵癌に対す る抗腫瘍サイトカイン導入遺伝子治療）
	（主 査）
論文審査委員	教授 松 野 正 紀 教授 貫 和 敏 博 教授 高 井 俊 行

論文内容要旨

背景 / 目的

E1B55K を発現しないアデノウイルスは、p53 機能異常のある細胞で効率良く増殖し、細胞を破壊する制限増殖型アデノウイルスである。この E1B55K 欠失変異アデノウイルスの膀胱癌に対する効果を実験的に確認し、このウイルスの治療効果を増強させるべく、他のベクターとの併用効果を検討する。

方 法

アデノウイルスの E1B55K を結失した変異アデノウイルス AxE1AdB を作成した。膀胱癌細胞に対するアデノウイルスの感染効率を調べるため、AxCAIacZ を Multiplicity of infection (MOI) を振って感染させ、X-gal 染色を行った。その上で、In vitro の殺細胞効果を検討するため、p53 変異を有する膀胱癌細胞及び野性型 p53 を有する悪性神経膠腫細胞株に対し、AxE1AdB を感染させ、感染 4、8 日後の生細胞数を計測した。また、感染 2 日後でウイルス感染膀胱癌細胞の免疫染色を行い、また感染 7 日後でウイルス力価を測定、In vitro におけるウイルス増殖の程度を評価した。

更に、AxE1AdB と非増殖型の AxCAIacZ、AxCAhIL2、AxClhIL12 とを共感染させ、遺伝子発現量を単独感染の場合と比較した (X-gal 染色、サイトカイン定量)。AxE1AdB との共感染による非増殖型ベクターの増殖をゲノムレベルで定量した (制限酵素切断断片のアガロースゲル電気泳動及びサザンブロット)。

In vivo における抗腫瘍効果を検討するため、SCID マウスの皮下に PANC-1 細胞を移植して皮下腫瘍モデルを作成し、接種 1 週間後 (腫瘍径 5 ~ 6 mm) より、AxE1AdB 単独及び、AxCAhIL2 との併用における、治療効果を検討した (皮下腫瘍径の経時的推移、治療開始 1 週間後の皮下腫瘍の HE 染色像及びウイルス抗原に対する免疫染色)。

結 果

アデノウイルスは膀胱癌細胞及び U87MG 細胞に効率良く感染し、MOI=100 で約 80% の細胞に LacZ の遺伝子発現が認められた (図 2)。AxE1AdB は、5 種の膀胱癌細胞株全てにおいて著明な殺細胞効果を認めた (図 3)。特に、PANC-1、SU.86.86 の 2 細胞株においてはその効果は著明で、MOI=10 でも感染 8 日後には、complete cell death となった。それに対し (野性型 p53 を有する) U87MG では、増殖抑制や細胞死は観察されなかった。また全ての膀胱癌細胞で

AxE1AdB は著明に増殖し、7 日後に感染ウイルスの約 100~3600 倍に達した (図 4 A)。それに対して U87MG ではウイルスの増殖は 15 倍にとどまった。AxE1AdB 感染膵癌細胞においては、ウイルスの増殖に必須なウイルス由来の Hexon 蛋白が著明に発現していた (図 4 B)。

PANC-1 細胞に対して AxE1AdB と AxCAIacZ を共感染させたところ、非増殖型ベクター (AxCAIacZ) の著明な二次感染と発現の増強が確認された (図 5)。IL2, IL12 を発現するベクターとの共感染では、各々単独感染の場合に比べ 110, 370 倍のサイトカイン発現量の増大を認めた (図 6 A, B)。又共感染により、非増殖型ベクターのゲノムも細胞内で、著明に増殖していた (図 7)。

SCID マウス皮下腫瘍 (PANC-1) に対し、AxE1AdB を単独投与したところ著明な増殖抑制効果を認め、更に AxCAhIL2 と併用して投与したところ、腫瘍の完全退縮を認めた (図 8 A)。治療開始 1 週間後の皮下腫瘍では、AxE1AdB 単独投与でウイルス増殖とそれにより細胞がところどころ抜け落ちている像が観察されたのに対し、AxCAhIL2 + AxE1AdB 併用治療群では著明な炎症反応により全体の腫瘍構造が破壊されている像が認められた (図 8 B)。

考 察

今回の検討で、この変異ウイルスは、ヒト膵癌細胞に対して強い殺細胞効果を持ち、SCID マウス皮下腫瘍においても抗腫瘍効果を持っていることが明らかになった。更に p53 機能異常を有する細胞効率良く増殖するという特性を生かし、ウイルスベクターとの併用を検討した。制限増殖型ウイルスの感染によりウイルスの増殖に必須な E1A 蛋白が腫瘍細胞内で発現すると、同一細胞に共感染した非増殖型ウイルスベクターも細胞内で増殖することができるようになる。ウイルスゲノムの複製により、遺伝子を発現するカセットの領域のコピー数も数千倍にも達すると考えられる。その結果遺伝子導入効率の高いとされる既存のベクターを遥かに凌ぐ遺伝子発現が認められた。この方法を用いて抗腫瘍効果を有する遺伝子を発現するベクターを用いれば、これまでに得られなかった効果が認められる。この方法により非常に強い遺伝子発現が得られるため、膵癌などの固形腫瘍に対する遺伝子治療が可能になると考えられる。

審査結果の要旨

膵臓癌は予後不良の難治性消化器系悪性腫瘍であり、集学的治療が試みられているが、その治療成績は満足行くものではない。一方で近年の遺伝子工学的手法の発達に伴い、膵癌に種々の遺伝子異常が報告されてきており、この遺伝子異常を標的とした治療が確立されれば、有効な治療法として期待できる。本研究は、膵癌をはじめ悪性腫瘍全般において高頻度に異常を認める癌抑制遺伝子 p53 を標的とした新しい治療の試みとして、p53 機能異常のある腫瘍細胞で効率良く増殖し、破壊する変異型アデノウイルス (E1B55K 欠失アデノウイルス ; AxE1AdB) を用いた遺伝子治療の可能性を検討したものである。

AxE1AdB は p53 異常を持つ膵癌細胞に効率良く感染して増殖し、5 種の膵癌細胞株全てにおいて著明な殺細胞効果を認めた。また PANC-1 膵癌細胞に対して AxE1AdB とレポーター遺伝子 (LacZ) を発現する非増殖型ベクター (AxCALacZ) を共感染させたところ、AxCALacZ の著明な二次感染と発現の増強が確認された。同様に IL-2, IL-12 を発現するベクターとの共感染では、各々単独感染の場合に比べ 110, 370 倍のサイトカイン発現量の増大を認めた。SCID マウス皮下腫瘍に対し、AxE1AdB を単独投与したところ著明な増殖抑制効果を認め、更に AxCAhIL2 と併用して投与したところ、腫瘍の完全退縮を認めた。

今回の検討で、この変異ウイルスは、ヒト膵癌細胞に対して強い殺細胞効果を持ち、SCID マウス皮下腫瘍においても抗腫瘍効果を持っていることが明らかになった。更に p53 機能異常を有する細胞効率良く増殖するという特性を生かしたウイルスベクターとの併用効果の検討では、このウイルスがヘルパーウイルスとして働き、既存のベクターを遥かに凌ぐ遺伝子発現が認められ、その治療効果が増強された。この方法により非常に強い遺伝子発現が得られるため、膵癌などの固形腫瘍に対する遺伝子治療が可能になると考えられる。

以上から本研究は、増殖型ウイルスによる直接効果のみならずヘルパーウイルスとして感染効率増強を示した点で独創的であり、優れて学位に値するものである。