



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Selective expression of foreign genes in glioma cells : Use of the mouse myelin basic protein gene promoter to direct toxic gene expression     |
| Author(s)    | 宮尾, 泰慶                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1994, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/38736">https://hdl.handle.net/11094/38736</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |                                                                                                                                                                                                      |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 宮 尾 泰 慶                                                                                                                                                                                              |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                                            |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 1 0 6 9 号                                                                                                                                                                                        |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 6 年 2 月 1 日                                                                                                                                                                                      |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第2項該当                                                                                                                                                                                         |
| 学 位 論 文 名     | Selective expression of foreign genes in glioma cells:<br>Use of the mouse myelin basic protein gene promoter to<br>direct toxic gene expression<br>(悪性グリオーマに対する特異的遺伝子治療の基礎的研究)<br>(主査)<br>教 授 早 川 徹 |
| 論 文 審 査 委 員   | (副査)<br>教 授 濱 岡 利 之      教 授 岸 本 忠 三                                                                                                                                                                 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目 的】

最近、悪性グリオーマに対して、レトロウイルスを用いた遺伝子治療が提唱され、米国 NIH では臨床応用 (phase I) も開始されたと伝えられている。今回、正常分裂細胞を傷害することのない、より安全な遺伝子治療を目指す目的で、レトロウイルスベクターに組み込んだヘルペス単純ウイルスのチミジンキナーゼ (HTK) 遺伝子をグリオーマ細胞でのみ特異的に発現させる系を開発し、ガンシクロビル (GCV) の投与によりグリオーマ細胞を選択的に傷害する試みを行った。

### 【方 法】

グリオーマ細胞で特異的に発現する遺伝子プロモーターの候補として、グリア特異的遺伝子であるクリア線維性酸性蛋白 (GFAP)、ミエリン塩基性蛋白 (MBP)、そしてミエリンプロテオリピッド蛋白 (PLP) 遺伝子の各プロモーター領域を *lacZ* 遺伝子の upstream に組み込んだレトロウイルスベクターを作製した。これら各レトロウイルスベクターを、リン酸カルシウム法を用いてパッケージング細胞である Psi-2 細胞に導入し、48時間培養後 G418を0.2mg/ml となるように添加し、ネオマイシン耐性株を選択した。ウイルス活性の高い Psi-2 細胞クローンの培養上清をウイルス粒子含有液として 8  $\mu$ g/ml のポリブレインとともにマウス培養グリオーマ細胞 (RSV-M) に加え、さらに48時間培養後に X-gal による青色呈色反応を行い、 $\beta$ -galactosidase を検出することにより *lacZ* 遺伝子発現を検討した。コントロールのベクターとして、*lacZ* 遺伝子をモロニーマウス白血病ウイルス (MoMLV) の long terminal repeat (LTR) で制御する BAG ベクターを用いた。次に、HTK 遺伝子を MBP プロモーターで制御するレトロウイルスベクターを作製し、このウイルスをグリオーマ細胞、線維芽細胞 (NIH-3T3)、及びリンパ腫細胞 (A20-2J) に感染させ、G418で HTK 遺伝子導入細胞を選択した。これら各選択細胞を  $2 \times 10^4$ /well となるように96well 平底プレートにまき、GCV を最終 0, 15, 30, 60, 125, 250, 500, 1000nM の各濃度になるよう加え、72時間培養を行った。細胞固定後、クリスタルバイオレットで染色を行い、540nm の吸光度で GCV の細胞傷害性を評価した。

## 【結 果】

BAG レトロウイルスベクターは、上記 3 種の各培養細胞において 20-30% の青色呈色細胞を認め、細胞特異性のない強いプロモーター活性を示した。一方、グリア特異的遺伝子プロモーターを組み込んだ各レトロウイルスは、グリオーマ細胞に *lacZ* 遺伝子を発現させることができたのに対して、グリオーマ以外の各対照細胞においては *lacZ* 遺伝子をほとんど発現させなかった。また、グリオーマ細胞における *lacZ* 遺伝子の導入発現効率は、MBP プロモーターを用いた場合 20-25% で、GFAP および PLP プロモーターを用いた場合より 5-10 倍強く、BAG ベクターの LTR プロモーターと同等の強さを示した。そこで、HTK 遺伝子を MBP プロモーターで制御するレトロウイルスを各培養細胞に感染させ、その GCV 感受性を調べた。線維芽細胞やリンパ腫細胞では 90% 以上の生存率を示す 250 nM の GCV 濃度でもグリオーマ細胞の生存率は 20% 以下であり、HTK 遺伝子導入グリオーマ細胞のみが GCV に対して強い感受性を示した。すなわち、MBP プロモーターで HTK 遺伝子を制御したレトロウイルスベクターを用いることにより、正常分裂細胞に影響を与えない低濃度の GCV で、グリオーマ細胞を特異的にかつ効率よく傷害できるという安全な遺伝子治療の可能性が示唆された。

## 【総 括】

グリア特異的プロモーターで HTK 遺伝子を制御するレトロウイルスベクターを各種培養細胞に導入し、GCV で治療を行ったところ、グリオーマ細胞のみ特異的に傷害できることが示された。なかでも、MBP プロモーターを選択することにより、殺細胞の効率と特異性を高めることが可能であり、悪性グリオーマに対するより安全で効果的な遺伝子治療の可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、悪性グリオーマに対するレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療に関する基礎的研究である。レトロウイルスベクターを用いて分裂細胞に殺細胞遺伝子を導入する手法は、正常分裂細胞の乏しい中枢神経系に発生する悪性グリオーマには適した方法といえる。ここではさらに、ミエリン塩基性蛋白 (MBP) 遺伝子のプロモーターで殺細胞遺伝子を制御し、グリオーマ細胞のみを特異的に傷害する系を開発した。本研究は、悪性グリオーマに対する安全で効率のよい遺伝子治療の開発に寄与し、学位の授与に値すると思われる。