

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 悪性グリオーマの浸潤様式の解析と in vivo 遺伝子導入系の開発  |
| Author(s)    | 山田, 正信  |
| Citation     | 大阪大学, 1994, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/39406">https://hdl.handle.net/11094/39406</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

|               |  |
|---------------|--|
| 氏 名           | 山 田 正 信                                      |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 ( 医 学 )                                  |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 1 5 6 6 号                                |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 6 年 1 0 月 5 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     | 悪性グリオーマの浸潤様式の解析と in vivo 遺伝子導入系の開発           |
| 論文審査委員        | (主査)<br>教授 早川 徹<br>(副査)<br>教授 濱岡 利之 教授 三木 直正 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目 的】

悪性グリオーマの治療成績は、集学的治療に拘らず不良である。治療の困難性はその浸潤性増殖によると考えられる。そこで、グリオーマ細胞のDNAにマーカー遺伝子を標識することにより、複雑なグリオーマ細胞の脳内進展様式を細胞レベルで検討すると共に、初期治療後に再発する浸潤グリオーマに対する遺伝子療法についての基礎的検討を行った。

### 【方法ならびに成績】

- 1) LacZ 遺伝子導入グリオーマ細胞株の樹立：マウスグリオーマ細胞株である RSV-M グリオーマ細胞をレトロウイルス BAG ベクターを含むウイルス上清と共に約4時間培養することにより E.Coli lacZ 遺伝子を導入した。その後、Fluorescein-di-β-galactopyranoside (FDG) を用いた生細胞染色を行い、FACS により、β-galactosidase (β-gal) 陽性細胞をソーティングし、lacZ 遺伝子保有細胞株である RSV-M/BAG を樹立した。
- 2) 悪性グリオーマ脳内浸潤形式の解析： $10^5$  cells/ $2 \mu$ l の RSV-M/BAG 細胞浮遊液を緩徐 ( $0.5 \mu$ l/min) に C3H/HeN マウスの線状体部に移植し、3, 7, 10日目にマウス脳を取り出し、X-gal 反応により β-gal 陽性細胞の脳内浸潤形式を検討した。脳内移植3日目には、β-gal 陽性のグリオーマ細胞が既に移植部位より遠隔部に遊走していた。移植7日目には脳梁、線状体部及び脳室内に腫瘍塊を形成するとともに、脳梁内神経軸索や血管周囲腔に沿って頭蓋内を広範囲に進展する所見を認めた。さらに、移植10日目には、頭蓋内に巨大な腫瘍塊を形成し、一部死亡する動物も認められた。
- 3) 腫瘍移植モデルへの遺伝子導入：悪性グリオーマの腫瘍摘出腔モデルと、グリオーマ細胞を経皮的に大槽内へ移植することにより作製した髄腔内播腫モデルを用いた in vivo 遺伝子導入の可能性について検討した。

腫瘍モデル作製3-4日後にレトロウイルス上清を  $8 \mu$ g/ml の polybrene と共に腫瘍摘出腔内またはマウス大槽内へ注入した。その結果、髄腔内に播腫したグリオーマ細胞に対して約20% という高い遺伝子移入効率を得られた。また、脳実質細胞や血管内皮細胞といった正常脳組織細胞には全く導入されなかった。さらに、カルボシアニン系蛍光色素である Dil 及び DiO で RSV-M 細胞を標識し、Dil 標識細胞の移植後3日目に DiO 標識細胞を同一

部位に再移植し、初回移植後7日目両標識細胞の分布を共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。3日後に投与した DiO 標識細胞は、最初に移植した DiI 標識細胞の分布領域に進展する傾向が認められた。この結果、浸潤性グリオーマ細胞に対し、目的とする遺伝子を運ぶ担体として同種グリオーマ細胞を利用できる可能性が示唆された。

#### 【総括】

髄腔内播種モデルにおいては、高い効率でレトロウイルスによる選択的遺伝子導入が可能であった。この結果は、脳内という特殊環境下においても腫瘍特異的に遺伝子導入が可能であることを示唆した。また、レトロウイルスベクターを用いて標識遺伝子を導入したグリオーマ細胞の *in vivo* 移植モデルでは、極めて初期の段階より広範囲に腫瘍細胞の脳内浸潤が生じていることが判明した。また、局所に投与したグリオーマ細胞が、既にグリオーマ細胞の浸潤を受けている部位へ分布する傾向があることも明らかにされた。この実験結果は、再発の原因となる浸潤グリオーマ細胞に効率よく遺伝子を導入するために、目的の遺伝子を導入する為のウイルス産生細胞としてグリオーマ細胞を利用できる可能性を示唆した。

### 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療法に関する基礎的研究であり、悪性グリオーマの予後不良の原因である浸潤性、播種性増殖に対して遺伝子療法の有効性を明らかにしようとしたものである。まず、グリオーマ細胞の DNA にマーカー遺伝子を標識することにより広範囲の脳内進展様式を細胞レベルで明らかにし、悪性グリオーマに対する遺伝子療法の合理性を明らかにした。また、髄腔内播種モデルを用いてレトロウイルスを用いた高率なグリオーマ細胞特異的遺伝子導入が可能であることを示し、レトロウイルスを用いた遺伝子療法の *in vivo* 実験系を開発した。これらの結果は、医療困難な悪性グリオーマに対する遺伝子治療の有効性を明らかにしたもので、臨床応用の開発に寄与するところ大であり、学位の授与に値すると考えられる。