

Title	Eradication of Myc-overexpressing Small Cell Lung Cancer Cells Transfected with Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Gene Containing Myc-Max Response Elements
Author(s)	熊谷, 融
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40284">https://hdl.handle.net/11094/40284</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	くまがいのと 熊 谷 融
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 7 3 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 11 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	Eradication of Myc-overexpressing Small Cell Lung Cancer Cells Transfected with Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Gene Containing Myc-Max Response Elements (Myc-Max 蛋白の結合配列を構築した単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子導入による Myc 過剰発現の肺小細胞癌細胞に対する治療)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岸 本 忠 三 (副査) 教 授 田 中 亀 代 次 教 授 白 倉 良 太

## 論 文 内 容 の 要 旨

### (目 的)

従来の治療法では高頻度に再発し、治療抵抗性を獲得する肺小細胞癌 (SCLC) に対して、約80%の SCLC 症例で過剰発現する *myc* 遺伝子群に着目し、その遺伝子産物である Myc 蛋白の転写因子としての機能を利用した遺伝子治療の可能性を検討する。すなわち、Myc-Max ヘテロダイマーの結合配列をプロモーター上流に構築した単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子を SCLC 細胞に導入、Myc 依存性の遺伝子発現により HSV-TK を発現増強させた後、その基質となるガンシクロビル (GCV) を投与し、Myc 過剰発現 SCLC を選択的に死滅させる。

### (方法ならびに成績)

1. SCLC を含む複数の培養株における *myc* 遺伝子群の発現をノーザンプロット法を用いて検討した。SCLC 株 OC-10 は肺線維芽細胞 YF-1 の 21 倍の *c-myc* を発現していたが、胸膜中皮腫株 OC-(MT)37 での同遺伝子の発現は YF-1 と比較して 1.3 倍とほぼ同程度であった。一方、SCLC 株 OS2-R, OS1 はそれぞれ *L-*, *N-myc* を過剰発現していた。
2. オリジナルの HSV-TK 遺伝子のプロモーター領域は 3 個のドメインを有しており、最も上流側のドメインの欠失によりプロモーター活性は 5% に減弱することがすでに明らかにされている。SCLC における特異性を高めるため、この上流側のドメインを 4 個の Myc-Max ヘテロダイマーの結合配列に置換した hybrid HSV-TK 遺伝子を作製した。CAT アッセイでは、この hybrid HSV-TK 遺伝子のプロモーター領域は OC-10, OS2-R, OS1 いずれの SCLC 株においても SV40 のプロモーターと比較して強力な活性を示したのに対して、YF1 や OC-(MT)37 では SV40 のプロモーターの 3% 以下の活性を示すにとどまった。以上より hybrid HSV-TK 遺伝子のプロモーターは Myc 過剰発現 SCLC に特異的に働く可能性が示唆された。
3. hybrid HSV-TK 遺伝子をネオマイシン耐性遺伝子とともに OC-10, OS2-R, OC-(MT)37 に導入して、G418 を含む選択培地で限界希釈を繰り返すことにより、stable transformant のクローンを樹立した。OS1 に関してはクローン化が困難で、G418 抵抗細胞を用いた。これらの hybrid HSV-TK 遺伝子導入細胞の *in vitro* における GCV 感

受性を MTT アッセイで検討した。OC-10, OS2-R, OS1では, hybrid HSV-TK 遺伝子導入により, 親株と比較してそれぞれ250倍, 500倍, 22倍の感受性上昇が認められたのに対して, OC-(MT)37では2倍の上昇で, この結果は CAT アッセイの結果と相関した。

4. hybrid HSV-TK 遺伝子を導入した OC-10, OS2-R のクローンをヌードマウスに皮下移植して, *in vivo* の GCV 感受性を検討した。GCV は14日間連日, 腹腔内投与した。50 mg/kg/day の GCV 投与により, hybrid HSV-TK 遺伝子を導入した OC-10, および OS2-R の増殖は有意に抑制された。また, 増大した段階の腫瘍に対しても, 100 mg/kg/day の GCV 投与で退縮を認めた。

5. HSV-TK 遺伝子の導入により, 遺伝子の導入されていない周囲の癌細胞も同時に障害をうける bystander effect が存在するか検討した。hybrid HSV-TK 遺伝子を導入した OS2-R 細胞とその親株細胞を種々の割合で混合し, ニューマウスに皮下移植して, 50 mg/kg/day の GCV 投与を行った。HSV-TK 遺伝子が導入された細胞が75%存在すると, 腫瘍の増殖は親株のみを移植した場合と比べて90%の増殖抑制が認められ, bystander effect の存在が示唆された。

(総括) Myc-Max 蛋白の結合領域を構築した単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子を導入し, GCV 投与を行うことにより, Myc 過剰発現の肺小細胞癌細胞を選択的に障害する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

この研究は従来の治療法では満足な治療成績の得られない肺小細胞癌に対して腫瘍特異プロモーターを用いた新たな遺伝子治療の可能性を検討したものである。すなわち肺小細胞癌で高頻度に過剰発現し, 転写因子として機能する Myc 蛋白に着目し, Myc 蛋白の結合配列を構築した単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子 (Myc-TK gene) の肺小細胞癌に対する有用性について検討した。まず Myc-TK gene のプロモーター領域は Myc を過剰発現する肺小細胞癌で特異的に活性化される可能性を示した。さらに Myc-TK gene を導入した肺小細胞癌株において Myc 依存性に同遺伝子の過剰発現がみられることを証明し, その基質であるガンシクロビルを投与することにより, *in vitro* および *in vivo* において抗腫瘍効果が得られることを証明した。これらの結果より, Myc-TK gene を導入し, ガンシクロビル投与を行うことにより, Myc を過剰発現する肺小細胞癌を選択的に障害する遺伝子治療の可能性が示された。以上のことよりこの研究は学位に値すると思われる。