



Title	Suicide Gene Therapy and Bystander Killing Effect for Gynecologic Cancer Cells Using Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase
Author(s)	國重, 一郎
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42986">https://hdl.handle.net/11094/42986</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	國 重 一 郎
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 8 8 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 6 月 30 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	Suicide Gene Therapy and Bystander Killing Effect for Gynecologic Cancer Cells Using Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase (婦人科癌細胞株に対するヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子を用いた自殺遺伝子治療と Bystander Killing 効果の検討)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 村 田 雄二 (副査) 教 授 濱 岡 利之 教 授 門 田 守人

### 論 文 内 容 の 要 旨

〈目的〉 癌の遺伝子治療で最も有用視されているものの一つが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子 (HSV-tk) とガンシクロビル (GCV) を用いた自殺遺伝子治療である。GCV はウイルス由来のチミジンキナーゼによってのみ 3 リン酸化され、DNA 合成阻害作用を獲得する。この過程は哺乳類由来細胞のチミジンキナーゼによっては成されず、GCV はウイルス感染細胞に対して選択的に致死作用を有する。この HSV-tk/GCV システムを用いると、特異的に HSV-tk 感染腫瘍細胞の増殖を抑制させることが可能である。さらにこのシステムでは、HSV-tk 導入細胞のみならず周囲の非導入細胞も GCV によって増殖が抑制される。この現象は bystander effect と呼ばれ、様々な腫瘍細胞を使った系で確認されている。本研究の目的は以下の 4 点である。(1) HSV-tk 導入婦人科癌細胞株の GCV 感受性を *in vitro* で検討する。(2) 婦人科癌細胞株に対する HSV-tk/GCV システムにおける bystander effect の有無、及び腫瘍細胞増殖抑制効果が得られる HSV-tk 導入率を *in vitro* で検討する。(3) 子宮頸部腺癌細胞に対する HSV-tk/GCV システムの有用性、及び bystander effect の有無を SCID mouse を用いて *in vivo* で検討する。(4) Bystander effect のメカニズムに関して有力な説の一つが gap junction 説であり、3 リン酸化された GCV が gap junction を介して HSV-tk 導入細胞から非導入細胞へ作用すると考えられている。Gap junction を構成する蛋白質、コネキンをコードする遺伝子 (Cx) の発現を enhance することにより bystander effect が増強するかどうかを絨毛細胞株を用いて検討する。

〈方法〉 (1) 子宮頸部腺癌及び子宮体部腺癌細胞株に HSV-tk をリポフェクション法を用いて導入する。10<sup>5</sup> 個の HSV-tk 導入細胞、或は非導入細胞を様々な濃度 (1~100  $\mu$ g/ml) の GCV 下で 8 日間培養する。細胞数を trypan blue exclusion 法を用いて count し、GCV に対する感受性を評価する。なお、導入された HSV-tk の発現は Northern blotting 法にて確認する。(2) 10<sup>5</sup> 個の HSV-tk 非導入子宮頸部腺癌細胞、子宮体部腺癌細胞 (Target cell) とそれに対して様々な割合の HSV-tk 導入細胞 (Effector cell) を 10  $\mu$ g/ml の GCV 下で 8 日間、混合培養する。混合培養の比率、即ち T : Eratio は 1 : 1 ~ 32 : 1 までとする。コントロール (10<sup>5</sup> 個の HSV-tk 非導入細胞のみを 10  $\mu$ g/ml の GCV 下で 8 日間培養したもの) に対する細胞の生存率を trypan blue exclusion 法を用いて算定し bystander effect の有無

を検討する。(3)  $10^6$  個の HSV-tk 導入子宮頸部腺癌細胞、或は非導入細胞を 5～6 週齢のメスの SCID mouse の背後に皮下注射する。一週間後、腫瘍の形成を確認後、GCV を 25 mg/kg の割合で 14 日間連続腹腔内投与する。コントロール群には生理的食塩水を同量投与する GCV ないしは生食投与開始より 21 日間、毎日腫瘍のサイズを計測し、HSV-tk 導入細胞の GCV に対する感受性を *in vivo* で検討する。さらに(2)で述べた Target cell と Effector cell を SCID mouse に混注し腫瘍の形成を確認後、同じプロトコルで GCV を投与し *in vivo* における bystander effect の有無を検討する。なお Target cell は  $10^6$  個とし T:E ratio は 1:1～16:1 までとする。(4) Cx の発現が確認されている絨毛癌細胞株に HSV-tk をリポフェクチン法を用いて導入する。(2)のプロトコルに従って bystander effect の有無を確認後、cAMP の agonist である 8-bromo-cAMP を 1 mM 添加し、bystander effect が増強するかどうかを検討する。さらに  $10^5$  個の Target cell と Effector cell を  $10 \mu\text{g/ml}$  の GCV、及び様々な濃度の 8-bromo-cAMP ( $10 \mu\text{M}$ ～1 mM) 下で 6 日間混合培養し、8-bromo-cAMP が bystander effect を増強するかどうかを検討する。8-bromo-cAMP が絨毛癌細胞株の gap junction に与える影響に関しては、Target cell 及び Effector cell を  $10 \mu\text{M}$ ～1 mM の 8-bromo-cAMP で 3 日間 treat 後、Cx cDNA を用いた Northern Blotting 法にて検討する。さらに gap junctional intercellular communication の程度を蛍光物質である Lucifer yellow dye transfer assay で検討する。 $2 \times 10^5$  の Target cell と Effector cell を混合培養し、 $500 \mu\text{M}$  ないしは 1 mM の 8-bromo-cAMP で treat 後、Lucifer yellow を scrape loading 法で細胞内に取り込ませ、拡散の程度を蛍光顕微鏡で検討する。

〈結果〉(1) HSV-tk 導入子宮頸部腺癌、体部腺癌細胞とも濃度依存性に GCV 感受性を認めた。非導入細胞は GCV 感受性を認めなかった。 $10 \mu\text{g/ml}$  の GCV で 4 日間、treat した結果、HSV-tk 導入細胞は非導入細胞に比べて、子宮頸部腺癌細胞の場合 7.3%、体部腺癌細胞の場合 10.2% まで細胞増殖が抑制された。(2) T:E ratio が 1:1 の場合、コントロールに比べて子宮頸部腺癌細胞の場合 3%、体部腺癌細胞の場合 8% まで細胞増殖が抑制され、bystander effect の存在が確認された。Bystander effect は両細胞群とも T:E ratio が 32:1 まで認められた。(3) HSV-tk 導入子宮頸部腺癌細胞を皮下注射された SCID mouse に形成された腫瘍は GCV に感受性があり、GCV 治療開始後 15 日目までにほぼ消失した。Bystander effect は T:E ratio が 16:1 まで認められたが、治療開始時の腫瘍サイズより縮小を認めたのは、HSV-tk の導入率が 20% 以上の時であった。(4) 絨毛癌細胞の場合、T:E ratio が 8:1 の時まで bystander effect が確認された。1 mM の 8-bromo-cAMP で T:E ratio が 2:1 の時まで bystander effect は増強された。T:E ratio が 1:1 の場合、 $500 \mu\text{M}$ 、1 mM の 8-bromo-cAMP で bystander effect は有意に増強した。8-bromo-cAMP の treat で Cx gene の発現は最大、HSV-tk 導入絨毛癌細胞で 7.2 倍、非導入細胞で 8.2 倍まで増強した。さらに、Target cell と Effector cell を 1:1 で混合培養した場合、8-bromo-cAMP は Lucifer yellow の取り込みを最大 4.2 倍増強させた。

〈総括〉 婦人科癌細胞株においても HSV-tk/GCV システムは有効であり、絨毛癌細胞株においては、gap junction を enhance することにより bystander effect は増強された。本研究により婦人科癌に対する HSV-tk を用いた遺伝子治療のための基礎的データが集積された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子 (HSV-tk) とガンシクロビル (GCV) を用いた自殺遺伝子治療の子宮悪性腫瘍への有効性を証明した最初の報告である。HSV-tk を導入された子宮頸部腺癌、子宮体癌、絨毛癌細胞株の GCV に対する感受性だけでなく、それぞれの細胞株において、遺伝子導入細胞のみならず周囲の非導入細胞も GCV によって増殖が抑制されるという Bystander Killing 効果の存在も明らかにしている。さらに子宮頸部腺癌細胞株に関しては、SCID マウスを用いて同様のことを *in vivo* においても証明し、臨床応用の可能性を示唆している。一方、Bystander Killing 効果のメカニズムを分子生物学的手法を用いて検討している。8-bromo-cAMP が絨毛癌細胞における Bystander Killing 効果を増強させることを示すと同時に、絨毛癌細胞の Gap junction の遺伝子発現及び、

機能そのものを増加させることを証明している。これはすなわち、遺伝子導入細胞から非導入細胞へ Gap junction を介して活性化された GCV が移行するという Bystander Killing 効果の Gap junction 説の一つの根拠となりうる。以上本研究内容は独創的であり、その結果はすべて新しい知見である。本研究は、近年注目されている癌の遺伝子治療の婦人科領域への臨床応用への一助となることが期待され、学位の授与に値すると思われる。