

|              |   |
|--------------|---|
| 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">〈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           | 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<br>(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)<br>教 授 村 田 雄 二<br>(副査)<br>教 授 瀨 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 をリポフェクチ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 μg/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 μg/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 μg/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<sup>6</sup>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<sup>6</sup>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<sup>5</sup>個のTarget cellとEffector cellを10 μg/mlのGCV、及び様々な濃度の8-bromo-cAMP(10 μM～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 μM～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。2×10<sup>5</sup>のTarget cellとEffector cellを混合培養し、500 μM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 μg/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日目までにはほぼ消失した。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 μM、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考えられる。