

Title	カルボニンプロモーターをもつ条件つき複製可能型単純ヘルペスウイルスベクターを用いた口腔悪性線維性組織球腫に対する遺伝子治療法の開発
Author(s)	道澤, 雅裕
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/43995">http://hdl.handle.net/11094/43995</a>
DOI	
rights	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

氏名	道 澤 雅 裕
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 17741 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	カルポニンプロモーターをもつ条件つき複製可能型単純ヘルペスウイルスベクターを用いた口腔悪性線維性組織球腫に対する遺伝子治療法の開発
論文審査委員	(主査) 教授 由良 義明 (副査) 教授 伊集院直邦 教授 吉田 篤 助教授 川端 重忠

#### 論文内容の要旨

【目的】カルポニンは生体内では平滑筋特異的に発現しており、平滑筋の分化マーカーとして用いられてきた。最近では、軟部肉腫として頻度が高く遠隔転移を生じやすい悪性線維性組織球腫 (MFH) において、その発現が確認されている。一方、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) の変異体を用い、感染によって腫瘍細胞を破壊する研究が脳腫瘍を中心に進められてきた。その過程で、カルポニンプロモーターをもつ複製可能型 HSV-1 ベクターが開発され、カルポニンを発現する平滑筋肉腫細胞や骨肉腫細胞を選択的に破壊することが示されている。しかし、現在まで MFH に対する HSV-1 ベクターの効果を検討した報告はみられていない。そこで、本研究では、口腔軟部肉腫に対する新規の標的遺伝子治療法をめざして、口腔由来 MFH 細胞におけるカルポニンの発現とカルポニンプロモーターを組み込んだ細胞選択的複製可能型 HSV-1 ベクターの抗腫瘍効果につき検討を行った。

#### 【材料と方法】

1. ベクターとして、カルポニンプロモーターを組み込んだ細胞選択的複製可能型 HSV-1 ベクター *d12.CALP* を用いた。
2. 細胞として、ヒト口腔 MFH 由来 MFH-ino、Bu99、MF-SH、MFH-AI と大腿原発 MFH の肺転移細胞株 MFH-1 および顎下腺腺癌細胞株 HSG を用いた。
3. *in vitro* における *d12.CALP* ベクターの細胞傷害活性を測定するため、細胞に *d12.CALP* ベクターを感染多重度 (MOI) 0.01 で感染させ、72 時間後にベクターに組み込まれた *LacZ* 遺伝子の発現を検出するため X-gal 染色を行い、染色陽性のプラーク数をカウントした。
4. *d12.CALP* ベクターの複製能を知るため、*d12.CALP* ベクターを MOI=0.1 で感染させ、産生されたウイルスを回収した。これを希釈してカルポニンプロモーターによって制御される HSV 初期転写因子 ICP4 を発現する VeroE5 細胞に感染させ、形成された X-gal 染色陽性プラーク数をカウントした。
5. ノードマウス背部皮下移植 MFH-AI 腫瘍に、*d12.CALP* ベクターあるいはバッファーを腫瘍内に注入し、経時的に腫瘍体積を求めた。
6. 自然肺転移腫瘍を形成させるため、ノードマウスに MFH-AI を皮下接種した。尾静脈より *d12.CALP* ベクター

を注入し、21日後に肺を摘出しX-gal染色を行った。

7. 移植腫瘍組織におけるカルボニン、Ki67、ICP4の発現を免疫組織化学染色法にて検出した。

8. *d12.CALP* ベクター感染細胞におけるICP4の発現をイムノブロット法で検出した。

9. 細胞におけるカルボニン mRNA は、RT-PCR 法にて検出した。

10. 腫瘍、各種臓器に存在する *d12.CALP* ベクターDNA を、*LacZ* 遺伝子のプライマーを用いた PCR 法にて検出した。

#### 【結果】

1. RT-PCR 法にて検討した結果、MFH 細胞のすべてにカルボニン mRNA の発現を認めたが、唾液腺腺癌由来の HSG では認めなかった。

2. MOI=0.01 で *d12.CALP* ベクターを感染させたところ、MFH-ino、Bu99、MFH-AI、MFH-I で細胞傷害活性を示すプラークが形成された。カルボニン発現の低い MF-SH とカルボニン発現のない HSG ではプラークは認められなかった。

3. *d12.CALP* ベクターはカルボニン mRNA 発現の低い MF-SH と比較して発現の高い MFH-ino で、約 20 倍高い複製能を示した。また、ICP4 蛋白とカルボニン mRNA の発現においても相関性が認められた。

4. ノドマウス背部に移植した MFH-AI 腫瘍に対して *d12.CALP* ベクターを注入したところ、対照群と比較して腫瘍増殖は有意に抑制された。また、腫瘍内に X-gal 染色陽性反応と ICP4 の発現が確認された。

5. ノドマウスに MFH-AI 細胞を皮下投与することにより、肺転移を形成する自然肺転移系を確立した。*d12.CALP* ベクターを尾静脈より投与し 21 日目の肺腫瘍組織から DNA を抽出し、*LacZ* 遺伝子のプライマーを用いて PCR を行った結果、ベクターDNA が検出された。他臓器から *d12.CALP* ベクターDNA が検出されることはなかった。

#### 【考察と結論】

ヒト口腔 MFH 細胞株におけるカルボニン遺伝子の発現を明らかにした。さらに *d12.CALP* ベクターが、ヒト口腔 MFH に対して *in vitro* および *in vivo* において抗腫瘍効果を示すことをはじめて明らかにした。また MFH の自然肺転移モデルを確立し、静脈内投与した *d12.CALP* ベクターが肺転移腫瘍に到達し腫瘍選択的に複製する所見を得た。これらの結果より、本ベクターが MFH の原発病変だけでなく肺転移の治療にも有用であることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、カルボニンプロモーターを組み込んだ細胞選択的複製可能型単純ヘルペスウイルス 1 型ベクター *d12.CALP* の悪性線維性組織球腫 (MFH) に対する抗腫瘍効果について検討したものである。

その結果、ヒト口腔 MFH 細胞株におけるカルボニン遺伝子の発現を明らかにし、*d12.CALP* ベクターが、このカルボニン遺伝子を発現しているヒト口腔 MFH 由来細胞に対して *in vitro* および *in vivo* において抗腫瘍効果を示すことをはじめて明らかにした。さらに MFH のマウス自然肺転移モデルを確立し、静脈内投与した *d12.CALP* ベクターが肺転移腫瘍に到達し腫瘍選択的に複製する所見を得た。このことより、本ベクターが MFH の原発病変だけでなく肺転移の治療にも有用であることが示唆された。

以上の結果は、口腔の難治性肉腫に対する新規治療法開発にあたって極めて重要な知見を与えるものであり、博士(歯学)の称号を与えるに値するものと認める。