The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	A novel combination of suicide gene therapy and histone deacetylase inhibitor for treatment of malignant melanoma
Author(s)	山本, 誠司
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44450
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名　山本誠司（やまもと せいじ）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　17979　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2項該当

学位論文名　A novel combination of suicide gene therapy and histone deacetylase inhibitor for treatment of malignant melanoma
（癌自殺遺伝子治療とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の併用による悪性メラノーマに対する治療法）

論文審査委員　（主査）
教　授　金田　安史

（副査）
教　授　門田　守人　　教　授　野口眞三郎

論文内容の要旨

〔目　　的〕

遺伝子治療において、導入遺伝子の発現増強は大きな課題である。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によりクロマチンの立体構造が変化し、導入遺伝子の発現増強や転写活性の増強が起こることが知られている。今回我々は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（FR901228）を用いることにより、導入遺伝子の発現を増強し、導入した癌自殺遺伝子（HSV-tk）による抗腫瘍効果を増強することを目的とし、実験を行った。

〔方法ならびに成績〕

以下の実験においては、導入ベクターとして HVJ カチオニックリポソームを使用した。また使用細胞はマウスメラノーマ：B16F1 を使用。マウス皮下腫瘍モデル作製には、B16F1 細胞 500 万個をマウス C57BL6 体幹へ皮下接種し作成した。FR901228 は使用直前に PBS に溶解し、投与時は HVJ カチオニックリポソーム溶液と混合して使用した。

1　in vitro にて、FR901228 による導入遺伝子（LacZ gene）の発現を検討した。
結果：FR901228 使用により、有意な LacZ gene 発現の増強を見た。

2　in vivo にて FR901228 による導入遺伝子発現を検討した。
マウス皮下腫瘍モデルを作成し、1 週間後に luciferase 遺伝子及び各種濃度の FR901228 を直接腫瘍内注入し、(a) 24 時間後の luciferase 遺伝子の発現を検討した。また、(b)その後の遺伝子発現の経時的変化も同時に測定した。
結果：(a)FR901228 を併用することにより、luciferase 遺伝子発現は濃度依存的に発現増強した。(b)luciferase の発現増強効果は、3 日目以降では見られなかった。

3　in vivo にて、癌自殺遺伝子治療と FR901228 の併用によるアポトーシス効果を検討した。上記マウスモデルに、自殺遺伝子（HSV-tk）及び、FR901228 を同時に投与し、その後 prodrug：ganciclovir（GCV）を腹腔内投与した。3 日後に腫瘍を摘出。腫瘍組織を固定後、apoptag 染色にてアポトーシス細胞を同定した。

結果：癌自殺遺伝子治療と FR901228 の併用において、有意なアポトーシスの増強効果が見られた。

4 マウスメラノーマモデルにおいて、癌自殺遺伝子治療と FR901228 の併用による抗腫瘍効果を検討した。上記マウスメラノーマモデルに対し、HSV-tk 及び、FR901228 を直接腫瘍内へ投与し、その後 5 日間にわたり GCV を腹腔内投与した。その後 3 日おきに腫瘍径を測定した。
結果：癌自殺遺伝子治療と FR901228 の併用群では、有意な腫瘍径の縮小を認めた。癌自殺遺伝子治療単独群でも腫瘍径の縮小は認めたが、FR901228 単独投与では腫瘍の縮小効果は見られなかった。

5 マウスメラノーマ皮下接種モデルにて、生存率の検討を行った。
(a) 最初に、HSV-tk/GCV＋FR901228 及びその他の群の 1 回投与とその後 5 日間の腹腔内 GCV 投与にて生存率を検討した。
結果：癌自殺遺伝子治療単独群、癌自殺遺伝子治療＋FR901228 の治療群では、コントロール群に比べ有意な生存率の改善が見られた。癌自殺遺伝子治療＋FR901228 治療群は、癌自殺遺伝子治療単独群に比べ、生存率の改善傾向が見られたが有意差は無かった。FR901228 単独投与群では有意な生存率の延長は見られなかった。
(b) 生存率の延長効果が見られた癌自殺遺伝子治療＋FR901228 治療群、及び癌自殺遺伝子治療単独群の連続投与を行い、生存率の延長効果を検討した。
HSV-tk＋FR901228、HSV-tk は各 6 回ずつ注入され、この間 20 日間にわたり、GCV を腹腔内投与した。
結果：HSV-tk/GCV 単独投与群において、16 匹中 3 匹（19%）が完全寛解した。
HSV-tk/GCV＋FR901228 では、18 匹中 10 匹（56%）で腫瘍が完全寛解し、HSV-tk/GCV 単独投与群に比べ有意な生存率の延長が見られた。

〔 総　　括 〕
癌自殺遺伝子治療とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（FR901228）との併用にて、有意な抗腫瘍効果を認めた。FR901228 の効果により、導入遺伝子は有意な発現増強を認め、自殺遺伝子治療との併用においては癌細胞のアポトーシス誘導を効果的に増強した。マウスメラノーマモデルにおいては、この治療により、腫瘍径の有意な減少が見られ、このうち 18 匹中 10 匹のマウスでは完全寛解が見られた。
また、以上の結果より、既存の癌遺伝子治療と別の治療を組み合わせにより、より相乗効果の期待できる新たな癌治療開発の可能性があると思われる。

論文審査の結果の要旨

現在の癌遺伝子治療の問題点は、導入した遺伝子の発現が低いこと、および遺伝子導入されたにもかかわらずその発現が抑えられることである。FR901228 は、新しく見つかったヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であり、従来のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤をしのぐ遺伝子の発現増強効果が認められる。その遺伝子発現増強効果は、転写因子の活性化によるところが大きい。またその他の作用として、p21 を介したアポトーシス誘導効果が知られており、単独でも抗癌剤としての研究が進められている。
本研究では、この FR901228 を使用することにより、in vitro はもとより in vivo でも導入遺伝子の発現が特異的に増強することが示された。FR901228 と自殺遺伝子治療の併用群では、各々の単独投与に比べ、腫瘍細胞のアポトーシス誘導が増強した。実際の癌治療においても、自殺遺伝子治療と FR901228 の投与は強力な抗腫瘍効果を示した。マウスメラノーマ接種モデルでは、この両者の連続投与では 57%のマウスが完全寛解し、また、Th1 と癌抗体価の上昇といった抗腫瘍免疫の誘導も確認された。
これらの実験により、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（FR901228）を使用することで、実際の動物モデルでも導入遺伝子の発現が大きく増強し、現在の遺伝子治療の弱点を克服する可能性を示唆している。以上により本研究は学位授与に値するものと考えられる。