

Title	腫瘍選択的増殖型・弱毒化単純ヘルペスウイルス d12. CALP Δ RRによる難治性肉腫に対する新しい細胞標 的治療法の開発に関する研究
Author(s)	清水, 弦
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46402
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	清水 弦
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 20214 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	腫瘍選択的増殖型・弱毒化単純ヘルペスウイルス <i>d12</i> . CALP Δ RR による 難治性肉腫に対する新しい細胞標的治療法の開発に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 由良 義明 (副査) 教授 丹羽 均 助教授 中原 寛和 講師 平賀 徹

論文内容の要旨

【目的と意義】 悪性線維性組織球腫 (MFH) や筋上皮由来の唾液腺悪性腫瘍は、顎口腔領域に発生する難治性腫瘍である。これらの腫瘍では平滑筋のマーカーであるカルポニン遺伝子の発現が報告されている。カルポニンは、高橋らによって 1988 年に血管平滑筋から単離・精製された平滑筋の分化マーカーである。山村らはヒト由来の肉腫でカルポニン遺伝子が過剰発現していることを見出し (平滑筋肉腫の 60%以上、消化管ストローマ腫瘍 (GIST) の 30-40%、MFH など平滑筋以外の軟部肉腫の 32%、骨肉腫の 64%に発現)、分裂増殖する平滑筋細胞でのみ増殖可能な組み換え型弱毒化単純ヘルペスウイルス (HSV-1) *d12*. CALP を作製した。道澤らは、顎口腔領域の MFH に対する *d12*. CALP の抗腫瘍効果を明らかにした。*d12*. CALP はカルポニン陽性の腫瘍細胞を選択的に溶解するが、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子が挿入変異しているため抗ヘルペスウイルス剤であるガンシクロビル (GCV) やアシクロビル (ACV) でウイルスの増殖を抑制することが出来ない。TK 領域を温存することができれば、ウイルスの安全性を高めることができる。そこで TK 遺伝子を温存し、ウイルスの複製に必須の転写因子をコードするリボヌクレオチド還元酵素 (RR) 領域にウイルス感染細胞を同定するための *LacZ* とカルポニンプロモーターで発現力が制御される ICP4 遺伝子を挿入した。さらに外来遺伝子をカルポニンプロモーターの制御下に発現できるように改良した次世代増殖型・弱毒化 HSV-1 ウイルスの開発を試みた。

【材料と方法】 細胞はヒト平滑筋肉腫細胞株 SK-LMS-1、ヒト骨肉腫細胞株 OST、および ICP4 遺伝子を導入したアフリカミドリザル腎臓由来細胞 VeroE5 を用いた。RT-PCR 法は GAPDH およびカルポニンに対するプライマーを用い、培養細胞でのカルポニン mRNA の発現を検討した。ICP4 の発現は抗 ICP4 モノクローナル抗体 (Goodwin Institute) を用いて、イムノプロット法および免疫組織化学法で検討した。ウイルスの細胞傷害活性は、*in vitro* での single step growth assay にて、X-Gal 染色したプラーク数をカウントした。GCV による *in vitro* でのウイルス増殖の抑制効果は SK-LMS-1 細胞、VeroE5 細胞を用いて今回の新規開発ウイルス、TK 遺伝子を欠失する *d12*. CALP、および RR 遺伝子を欠失する hrR3 を検討した。また ACV によるウイルス増殖の *in vivo* での抑制効果は、ヌードマウス皮下に移植したヒト平滑筋肉腫に対し、肉腫 100 mm³ あたり 2×10⁷ pfu のウイルスを腫瘍内に直接注入し、ACV を 1 日当たり 30 mg/kg でマウス腹腔内に 7 日間連続して投与した。

【結果】 ヒトカルポニン遺伝子の平滑筋特異的なプロモーター領域を、HSV-1 ウイルスの前初期遺伝子であり複

製開始に必須の転写因子をコードする ICP4 遺伝子の上流に挿入し、さらにその上流に標識遺伝子 *LacZ* を含む相同組換えベクター pKX2 β G3/CALP-ICP4 を構築した。この DNA 断片を ICP4 欠失 HSV-1 変異体 *d120* の RR 遺伝子座 (UL39) に相同組み換え法を用いて挿入し、ICP4 と RR の二重欠失変異体を作製した。SK-LMS-1 細胞、VeroE5 細胞を用いて、*LacZ* の発現を指標にし、目的遺伝子を含む DNA 断片が UL39 領域に正しく挿入された HSV-1 変異体 *d12*. CALP Δ RR (Δ RR) を分離した。 Δ RR はカルボニンプロモーターによって ICP4 が合成され、感染細胞の増殖によって宿主側から RR が供給される場合にのみ増殖可能である。また、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子を温存し、カルボニンプロモーターの制御下に外来遺伝子を発現できるよう構築したものである。 Δ RR はカルボン陽性ヒト平滑筋腫細胞で *LacZ*、ICP4 をともに発現し、自己増殖による選択的細胞傷害活性を示した。また、 Δ RR の *in vitro* での複製は GCV の添加 (1 μ g/ml) により完全に抑制された。*In vivo* においても肉腫組織の *LacZ* 陽性領域の単位面積あたりの ICP4 発現細胞の数は ACV 投与群で減少していた。

【考察】 Δ RR はカルボニンを発現し増殖が盛んな肉腫細胞において、選択的な抗腫瘍効果を示す。また Δ RR は TK 遺伝子を内在するため GCV によって増殖が抑制され、治療終了後のウイルス感染細胞の除去が可能である。したがって顎口腔領域に発生する MFH、筋上皮由来唾液腺悪性腫瘍などのカルボン陽性悪性腫瘍への応用が期待される。また Δ RR は種々の治療遺伝子を搭載することも可能であり、サイトカインなどの治療遺伝子を搭載すれば、ウイルスによる腫瘍細胞の直接破壊効果に加え、治療の相乗効果も見込まれる。今後は、これまで治療法のなかったカルボニンを発現する悪性腫瘍に対する新しい細胞標的治療法として臨床応用を目指したい。

論文審査の結果の要旨

本研究は、カルボニンを発現する細胞で選択的に増殖し、チミジンキナーゼを温存した弱毒化単純ヘルペスウイルス *d12*. CALP Δ RR (Δ RR) を開発することを目的としたものである。

その結果、 Δ RR はカルボン陽性ヒト平滑筋腫細胞で選択的細胞障害活性を示し、抗ヘルペスウイルス薬に対して強い感受性を示すことが明らかとなった。

以上より、本研究は Δ RR による腫瘍溶解療法がカルボニンを発現する難治性腫瘍への新規治療法として期待できることを示すものであり、博士 (歯学) を授与するに値するものと認める。