



|              |                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | The combination of chemotherapy with HVJ-E containing Rad51 siRNA elicited diverse anti-tumor effects and synergistically suppressed melanoma                                                                      |
| Author(s)    | 清原, 英司                                                                                                                                                                                                             |
| Citation     | 大阪大学, 2011, 博士論文                                                                                                                                                                                                   |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                    |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/58966">https://hdl.handle.net/11094/58966</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">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="#">ご参照ください</a> 。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【23】

|               |                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | きよ はら えい じ<br>清 原 英 司                                                                                                                                                                                                      |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医学)                                                                                                                                                                                                                   |
| 学 位 記 番 号     | 第 2 4 9 6 9 号                                                                                                                                                                                                              |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 23 年 11 月 21 日                                                                                                                                                                                                         |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第1項該当<br>医学系研究科内科系臨床医学専攻                                                                                                                                                                                            |
| 学 位 論 文 名     | The combination of chemotherapy with HVJ-E containing Rad51<br>siRNA elicited diverse anti-tumor effects and synergistically<br>suppressed melanoma<br>(化学療法と Rad51 siRNA を封入した HVJ-E 併用療法による相乗効果に<br>よってメラノーマを抑制することができる) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 片 山 一 朗<br>(副査)<br>教 授 藤 堂 剛 教 授 野 口 眞 三 郎                                                                                                                                                                     |

## 論文内容の要旨

### 〔 目 的 〕

悪性黒色腫は難治性の悪性腫瘍であり、Dacarbazine (DTIC) をベースとした化学療法が試みられているが満足いく成績は得られていない。よってDTICの効果が高めることが望まれる。DTICは、DNAにおいてdouble strand breaks (DSBs) を形成してアポトーシスを誘導するが、悪性腫瘍で高発現しているDNA修復蛋白によりDSBsは速やかに修復されてしまう。今回、DNA修復経路であるHomologous Recombination (HR) のkey蛋白であるRad51が、DTICによるDSBsの修復に関与していることを見いだした。また、ベクターとして利用されてきたhemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E) 自体が抗腫瘍免疫を誘導することが報告されている。そこでRad51 siRNAを封入したHVJ-EとDTICを併用したchemoimmunotherapyによる抗腫瘍効果を検討した。

### 〔 方法ならびに成績 〕

主なDNAの修復経路としてRad51が働くHR pathwayとku70が働くnon-homologous recombination pathwayがある。マウスB16-F10細胞に対するDTIC投与後の動きをwestern blotで確認すると、Rad51は4時間後をピークに1.9倍上昇していたがku70に変動は見られなかった。免疫染色にてDTIC処理後にRad51とDSBsを表す $\gamma$ -H2AXのmerge像を認めた。よってDTICはF10 melanomaにおいてRad51を誘導し、DSBsを修復している可能性が示唆された。DTIC投与にてRad51 mRNAはdose-dependentに上昇するが、Rad51 siRNAをHVJ-Eに封入した細胞では有意に抑制された。この条件でRad51 siRNA導入細胞にDTICを投与すると72時間後まで $\gamma$ -H2AXの発現量が上昇していた。以上より、Rad51がノックダウンされた状態ではDSBsが修復されないため、DTIC投与後にDSBsが残存することが示された。

DTICへの感受性を評価するためにcolony formation assayを行った所、DTIC+Rad51 siRNA群で有意にcolony数は減少した。アポトーシスの評価としてFACSによるAnnexin Vの発現をみると、Rad51 siRNA投与群ではscramble siRNA投与群の2倍の濃度と同等の抗腫瘍効果を認めた。

C57/BL6マウスの背部に作成したF10腫瘍に対してRad51 siRNAを封入したHVJ-Eを2日おきに3回腫瘍内投与し、同時にDTICを5日間連続で腹腔内投与を行った。その結果、HVJ-Eを入れた群はすべて抗腫瘍効果を示し、Rad51 siRNA+DTIC群において最も抗腫瘍効果を認め、synergicな反応と考えられた。また、DTICは骨髄抑制をもたらすことが知られているが、同時にHVJ-Eを投与しても免疫賦活化能が保たれているかどうかを検討した。腫瘍内mRNAを解析した所、HVJ-E投与群ではDTICの有無に関わらずCD4、CD8の上昇を認めた。また、CTLの誘導を確認するために脾臓からリンパ球を回収してELISPOT assayを行った所、HVJ-E投与群でIFN- $\gamma$ の産生を腫瘍特異的に認めた。

### 〔 総 括 〕

Rad51 siRNA封入HVJ-Eと、DTICを併用することによって、悪性黒色腫への有効な治療となる可能性がある。HVJ-Eはベクターであり、抗がん剤併用においても抗腫瘍免疫が保たれることから、さまざまな封入物質を利用したchemoimmunotherapyが期待できる。

## 論文審査の結果の要旨

悪性黒色腫は難治性の悪性腫瘍であり、Dacarbazine (DTIC) はその治療で使用される最も有名なアルキル化剤であるのでDTICの効果が高めることが望まれる。DTICは、DNAの2重鎖切断double strand breaks (DSBs) を形成して細胞死を誘導するが、DNA修復蛋白によりDSBsは速やかに修復されてしまい、治療への抵抗性を示す一つの原因になっている。今回、DNA修復経路であるHomologous Recombinationのkey蛋白であるRad51が、DTICによるDSBsの修復に関与していることをB16-F10マウス細胞を用いて初めて見いだした。さらに、ベクターとして利用されているhemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E) 自体が免疫を賦活化して抗腫瘍効果を示

す報告がなされているため、Rad51を抑制するRNA (Rad51 siRNA) を封入したHVJ-EとDTICを併用したchemoimmunotherapy (化学療法と免疫療法の併用) の効果を検討した。Rad51 siRNAを封入したHVJ-Eをマウス背部のF10腫瘍内へ投与して同時にDTICの腹腔内投与を行った所、control siRNAを投与した群と比較して有意に腫瘍を抑制し、相乗効果を示した。DTICを同時投与した群においても、HVJ-Eと併用することで抗腫瘍免疫が誘導された。以上より、悪性黒色腫への有効な新規治療を見だし、HVJ-Eを利用することで化学療法と免疫療法を組み合わせたchemoimmunotherapyの可能性を示したことは学位論文に値するものとする。