The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	改変型アデノウイルスベクターを用いたメラノーマ遺伝子治療の最適化に関する研究
Author(s)	岡田, 裕香
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/858
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【7】

氏　　名	岡　田　裕　香（おか　だ　ゆ　か）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　18161　号
学位授与年月日	平成15年9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	**改変型アデノウイルスベクターを用いたメラノーマ遺伝子治療の最適化に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　真弓　忠範 （副査） 教　授　前田　正知　　教　授　山元　　弘　　教　授　松田　敏夫

論文内容の要旨

現在の癌治療は、外科療法、化学療法、放射線療法が三大標準治療法として認められているが、これらを組み合わせた集学的療法だけでは十分な癌治癒率が得られていないのが現状である。とりわけメラノーマは、高転移性であり、治療後5年以上が経過する患者の約20%で再発が認められる極めて致死性の高い悪性腫瘍であることから、新しい概念に基づく遺伝子治療の開発に寄せられる期待は大きい。しかしながら、既存の遺伝子治療用ベクターの中で最も高い遺伝子導入効率を有するアデノウイルスベクター（Ad）を用いてさえ、メラノーマへの十分な遺伝子導入は困難であることが知られており、効果的な *in vivo* メラノーマ遺伝子治療を確立するためには新規ベクターシステムの開発ならびに関連技術の向上が望まれている。そこで本研究では、*in vivo* のメラノーマ遺伝子治療における RGD ファイバーミュータントアデノウイルスベクター（AdRGD）の有用性を評価するとともに、サイトカイン発現 AdRGD を用いたメラノーマ遺伝子治療プロトコールの最適化に関する検討を行った。

従来型 Ad を用いた遺伝子導入には、標的細胞上の CAR（Coxsackievirus-adenovirus receptor）に Ad 粒子のファイバー先端部が結合し、続いて Ad のペントンベースに存在する RGD（Arg-Gly-Asp）モチーフが $\alpha_v\beta_3$-あるいは $\alpha_v\beta_5$-integrin に結合するという二段階の過程が必須である。メラノーマ細胞におけるこれらの分子の発現を RT-PCR で解析したところ、CAR mRNA の発現は極めて乏しく、$\alpha_v\beta_3$-および $\alpha_v\beta_5$-integrin については十分な mRNA 発現レベルが確認された。この結果は、メラノーマ細胞の Ad 介在性遺伝子導入に対する抵抗性が CAR の低発現に起因しており、Ad に α_v-integrin 標的指向性を付与することができれば、メラノーマ細胞への遺伝子導入効率を大幅に改善できる可能性を示唆した。そこで、α_v-integrin 親和性を有する RGD ペプチド配列をファイバー先端部に挿入した AdRGD を作製し、メラノーマ細胞への遺伝子導入に適用したところ、AdRGD は α_v-integrin を介してメラノーマ細胞表面に結合し、従来型 Ad と比較して極めて効率の良い遺伝子導入および遺伝子発現を達成できることが判明した。

次に、強力な抗腫瘍活性が報告されている TNF-α あるいは IL-12 を発現する AdRGD および従来型 Ad を構築し、*in vivo* メラノーマ遺伝子治療モデルに適用した際の有効性を比較検討した。C57BL/6 マウスに生着させた B16BL6 腫瘍内に 10^8 あるいは 10^9 vector particles（VP）のサイトカイン発現 AdRGD を投与したところ、同用量のサイトカイン発現従来型 Ad を適用した場合と比較して、より強力な腫瘍増殖抑制が観察され、AdRGD 投与群では従来型 Ad 投与群の 1/10 のベクター用量でほぼ同等の腫瘍内サイトカイン産生と抗腫瘍効果を達成することができた。さら

に、抗腫瘍メカニズムについて検討したところ、AdRGD-TNFαの投与は腫瘍血管の崩壊と出血壊死の誘導を、また、AdRGD-IL12の投与はNK細胞活性およびB16BL6特異的CTL活性の増強に基づく腫瘍免疫の誘導を、それぞれ対応する従来型Adを投与した場合よりも著しく促進できることも明らかとなった。これらの結果は、メラノーマを対象とした*in vivo*サイトカイン遺伝子治療において、AdRGDが有効性の向上と投与ベクター量の削減を達成できる優れたベクターシステムであることを示すものである。しかしながら、10^{10} VPを超える高用量のサイトカイン発現ベクターを腫瘍内投与したマウスにおいては、抗腫瘍効果が一層増強されるものの著しい体重減少や突然死といった重篤な副作用を伴う結果となった。

そこで、サイトカイン発現AdRGDを用いた*in vivo*のメラノーマ遺伝子治療の最適化に繋がる基礎的情報の収集を目的に、高用量ベクターの腫瘍内投与に伴う副作用発現機序を解析した。腫瘍内にサイトカイン発現AdRGDを投与すると、その約1％が腫瘍から循環血中へと漏出し、投与ベクター量の増大に伴って漏出ベクター量も増加することが明らかとなった。しかし、この漏出ベクターの組織傷害性や遺伝子導入に伴う他臓器からのサイトカイン発現は副作用発現の主要な原因ではなく、腫瘍局所で高濃度に産生されたサイトカインの全身循環血中への移行を抑止することが、副作用発現を回避するためには重要であることが判明した。そこで、本サイトカイン遺伝子治療モデルにおいて副作用発現を認めなかった10^9 VP以下のベクター用量で、AdRGD-TNFαとAdRGD-IL12をB16BL6腫瘍内に併用投与したところ、血中サイトカイン濃度の上昇および体重減少を伴うことなく、各ベクター単独投与群と比較してより強力な抗腫瘍効果が発揮された。したがって、今後のサイトカイン遺伝子治療の開発においては、単一のサイトカイン発現ベクター投与による有効性および安全性を検討することはもちろんのこと、適用疾患に応じて作用メカニズムの異なる複数のサイトカイン発現ベクターの併用も視野に入れた探索を進めることで、有効性と安全性の両面に優れた治療法の確立が可能であると考える。

本研究成果を総合すると、α_v-integrin標的指向性を付与したAdRGDは、メラノーマへの遺伝子導入効率に極めて優れており、効果的な*in vivo*メラノーマ遺伝子治療の開発において非常に有用性の高いベクターシステムであることが実証された。また、サイトカイン発現ベクターを用いた*in vivo*癌遺伝子治療において、高い遺伝子導入・発現効率を達成するために高用量のベクターを腫瘍局所に投与することは、治療効果の増強ばかりでなく、むしろ高濃度のサイトカインの全身循環血中への移行に起因する副作用発現を増大させることが判明し、投与ベクター量の慎重なescalation trial、すなわちrisk/benefit比を考慮した厳密な1imiting doseの設定、に大きな注意を払う必要性が示された。さらに、複数のサイトカイン発現ベクターの併用というアプローチが高い有効性と安全性を備えた治療プロトコールとなりうるという知見は、今後のサイトカイン遺伝子治療の開発に貴重な基礎的情報を提供するものと考える。

論文審査の結果の要旨

近年のガン研究の発展はめざましいものがあるが、外科療法、化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的療法でも治癒が望めないものも依然として多い。とりわけメラノーマは高転移性であり、治療後5年以上が経過する患者の約20%で再発が認められる極めて致死性の高いガンであることから、遺伝子治療に寄せられる期待は大きい。さて、遺伝子治療に用いられるウイルスベタターおよび非ウイルスベクターは、それぞれ一長一短を有しており、現在のところ全ての疾患に対して適用可能な「万能ベクター」は存在しない．その中で、アデノウイルスベクター（Ad）は、既存の遺伝子治療用ベクターの中で、最も高い導入効率を有しており、広範な細胞・組織に導入できる。しかしながら、メラノーマ細胞に対しては導入困難であり早期の改善が望まれている。そこで著者はメラノーマ細胞がAd遺伝子導入に抵抗性を示す原因を追及し、その結果に基づいてメラノーマ遺伝子治療プロトコールの最適化に関する種々の検討を行った。その結果以下の成果が得られた。

1．従来型Adを用いた遺伝子導入に対するメラノーマ細胞の抵抗性が、Ad感染受容体であるCARの低発現に起因することを明らかにした。

2．メラノーマ細胞への遺伝子導入の向上を目的に、Adのファイバー領域にRGDペプチド配列を挿入したα_v-

integrin 指向性 AdRGD を適用することで、メラノーマ細胞（*in vitro*）ならびに腫瘍（*in vivo*）への極めて効率の良い遺伝子導入・発現に成功した。

3．メラノーマに対するサイトカイン遺伝子治療に AdRGD を適用することにより、従来型 Ad に比べて有効性の向上と投与量の削減が達成できることを明らかにした。

4．高用量のサイトカイン発現従来型 Ad あるいは AdRGD を腫瘍内投与した際の副作用発現には、腫瘍から漏出したベクター（投与量の約１％）の影響はほとんど認められず、腫瘍内で過剰に産生されたサイトカインの全身性作用が深く関与することを明らかにした。

5．AdRGD-TNFα と AdRGD-IL12 を併用することにより、副作用を発現しないベクター用量で、抗腫瘍効果の増強が達成された。

以上の研究成果は、AdRGD がメラノーマ遺伝子治療の開発において非常に有用性の高いベクターシステムである事を実証しており、今後のメラノーマに対する遺伝子治療に貴重な基礎的情報を提供している点、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考える。