

学位論文題名

ゲルソリンアデノウイルスベクターを用いた
ヌードマウス膀胱内移植ヒト膀胱癌に対する遺伝子治療

学位論文内容の要旨

膀胱癌は、尿路系腫瘍の中で最も頻度が高く、米国において全悪性腫瘍の中で4番目の発生頻度である。抗癌剤や BCG の膀胱内投与は、初回の経尿道的手術から再発までの期間を延長できるが、70%の患者は再発する。膀胱癌患者のうち、15%から30%では浸潤癌として見つけられ、ひとたび浸潤癌へと進行すると、膀胱全摘除術、全身化学療法、放射線治療などが施行されるものの、これらの治療では、全生存率の劇的な改善には至っていない。このため、膀胱温存可能で治療効果の高い新たな治療法が望まれている。アクチン調節タンパク質ゲルソリンは、細胞の形態、運動、接着にかかわるアクチン細胞骨格の中心的な制御因子である。さらに最近ゲルソリンは、腫瘍抑制的な働きを有する事がわかってきた。胃癌、膀胱癌、肺癌、大腸癌、乳癌など種々の癌においては、ゲルソリンの発現が正常細胞に比べ低下または消失していた。さらに膀胱癌細胞株 UMUC-2 にヒトまたはマウスゲルソリン cDNA をトランスフェクションすると、軟寒天培地でのコロニー形成能やヌードマウス皮下での造腫瘍性が失われた。以上の結果に基づき、ゲルソリン遺伝子を用いた遺伝子治療の可能性を検討するために、ヌードマウス皮下移植ヒト膀胱癌細胞株に対してゲルソリン・レトロウイルス産生細胞を移植したところ、著明に腫瘍の増殖が抑制され、生存期間が有意に延長した。しかし、ゲルソリンレトロウイルスベクターの投与では、その感染効率が低いため、腫瘍増殖を充分抑制することはできなかった。レトロウイルスベクターは、染色体に組み込まれ、安定した発現が維持されるものの、発癌性や増殖型への変異の危険性のため、臨床応用は限定される。さらに、レトロウイルス産生細胞による膀胱癌遺伝子治療は、臨床的に使用困難である。一方、アデノウイルスベクターは一過性ながら目的の遺伝子への導入効率が高く、高力価のウイルスを作製できるなどの特徴を有しており、癌に対する遺伝子治療における有効なベクターとなっている。そこで実際の遺伝子治療への応用を目指して、ゲルソリン・アデノウイルスベクター (Ad-GSN) を作製し、*in vitro* での腫瘍増殖に対する抑制効果について検討した。さらに膀胱温存を念頭に経尿道的手術後の残存病変に対する治療モデルとして、ヌードマウス膀胱内移植ヒト膀胱癌モデルを作製し、このモデルでの遺伝子治療の効果について検討した。

まず、CMV プロモーターを持った shuttle plasmid pCA14 の *Bam*H1-*Hind*III 領域にゲルソリン cDNA をライゲーションし、pCA14-GSN を得た。アデノウイルス相同組み換え時に骨格となる plasmid pJM17 と pCA14-GSN をヒト胎児腎由来 293 細胞にリン酸カルシウム法にてトランスフェクションし、プラーク法にて Ad-GSN を得た。β-ガラクトシダー

ゼ遺伝子を含む plasmid pCA17 についても同様の操作を行い、 β -ガラクトシダーゼ発現アデノウイルスベクター(Ad- β gal)を作製した。各アデノウイルスベクターを 293 細胞に感染させ増幅のち、超遠心を行い高濃度のウイルス液を作製した。次に、ヒト膀胱癌細胞株 KU-7 へのアデノウイルス感染効率を検討するために、KU-7 に対して Ad- β gal を MOI 10 から 400 まで感染させ、青染細胞の割合を算出した。アデノウイルス感染効率は MOI 10 で 29%、MOI 50 で 44%、MOI 100 で 80%、MOI 400 で 95%であった。KU-7 に感染した Ad-GSN が、ゲルソリンタンパク質の発現を亢進させるかどうかを確認するために、Ad-GSN 感染後の KU-7 よりタンパク質を抽出し、Western Blotting を行った。MOI 400 の Ad- β gal を感染させた KU-7 においては、ゲルソリンの発現はほとんど認められなかった。一方、Ad-GSN 感染細胞ではゲルソリンの発現は著明に亢進しており、正常移行上皮細胞株 SVHUC と比較して、MOI 100 で感染させると 1.8 倍、MOI 400 で感染させると 5 倍となった。これらの結果より Ad-GSN は、KU-7 において、ゲルソリンタンパク質を産生させることがわかった。

つづいて、*in vitro* での Ad-GSN 投与による KU-7 の細胞増殖抑制効果を検討するために、6 穴プレートに KU-7 (1×10^4 /well) をまき、MOI 400 の Ad-GSN または Ad- β gal を感染させ、経時的に細胞数を数えた。複数の実験を行い、その平均を比較したところ、Ad-GSN 感染細胞では、Ad- β gal 感染細胞に比べ、細胞増殖が有意に抑制された ($p < 0.05$)。5 日目に、細胞数は Ad-GSN 感染にて Ad- β gal 感染に比べ、約 60%減少していた。

この細胞増殖抑制効果がなぜ起きるかについて検討するために、Ad-GSN 感染前後での DNA 分布をフローサイトメトリーによって調べ、Ad-GSN 感染による KU-7 での細胞周期の変化を検討した。Ad- β gal 感染細胞では、細胞周期の変化はわずかであった。一方、Ad-GSN 感染細胞では、G2/M 期が 18.8%から 28.4%へと増加したのに比べ、G1/S は 70.4%から 56.8%へと、減少していた。これらの結果は、Ad-GSN による細胞増殖抑制効果が G2/M 期での細胞周期の延長または停止によるものであることを示している。

次に、膀胱腫瘍の経尿道的手術後の残存病変を念頭にヌードマウス移植ヒト膀胱癌細胞モデルを作製し、Ad-GSN 膀胱内注入による感染効果を検討した。まず、ヌードマウス膀胱内移植ヒト膀胱癌細胞にアデノウイルスが感染するかどうかを検討するため、ヌードマウスの膀胱上皮をトリプシンにて障害、経尿道的に KU-7 を移植したのち、Ad- β gal を注入した。Xgal 染色にて腫瘍部に青染細胞を認め、腫瘍へのアデノウイルス感染を証明した。正常上皮では青染細胞をごく一部に認めるのみで、Ad- β gal はほとんど感染しないと考えられた。

さらに、Ad-GSN による *in vivo* でのヌードマウス膀胱内移植ヒト膀胱癌細胞の増殖抑制効果を検討するため、ヌードマウスの膀胱に経尿道的に KU-7 を移植後、48、72、96 時間後に Ad-GSN または Ad- β gal を各群 5 匹ずつ投与し、10 日目に膀胱を摘出した。膀胱は 100 μ m ごとに 20 切片を作製後、HE 染色を行い、NIH image にて腫瘍面積を測定した。両群ともに 1 箇所以上の腫瘍が形成されていたが、10 日目の腫瘍平均面積を比べたところ、Ad-GSN 群では 2.5mm²、Ad- β gal 群では 23.5mm² となり、Ad-GSN 投与により腫瘍面積は 9 分の 1 と有意に抑制されていた ($p < 0.05$)。また両群ともに、肝臓、肺、脾臓には明らかな炎症所見は認められなかった。アデノウイルス投与中にヌードマウスの活動、成長に明らかな異常は認められなかった。これらの結果により、ゲルソリン・アデノウイルスベクターは、ヌードマウス膀胱内移植ヒト膀胱癌細胞の増殖を抑制すると考えられ、今後の膀胱癌に対する遺伝子治療への可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 柳 知 彦

副 査 教 授 細 川 眞 澄 男

副 査 教 授 田 中 一 馬

学 位 論 文 題 名

ゲルソリンアデノウイルスベクターを用いた ヌードマウス膀胱内移植ヒト膀胱癌に対する遺伝子治療

浸潤性膀胱癌に対しては、さまざまな治療法が行われるものの、全生存率の劇的な改善には至っておらず、膀胱温存可能で治療効果の高い新たな治療法が望まれている。アクチン調節タンパク質ゲルソリンの発現は、膀胱癌において正常細胞に比べ低下または消失しており、膀胱癌細胞株にヒトゲルソリン cDNA を導入すると、軟寒天培地でのコロニー形成能やヌードマウス皮下での造腫瘍性が失われた。また、ヌードマウス皮下移植ヒト膀胱癌細胞株に対してゲルソリンレトロウイルス産生細胞を移植すると、著明に腫瘍の増殖が抑制された。そこで実際の遺伝子治療への応用を目指して、ゲルソリンアデノウイルスベクター (Ad-GSN) を作製し、*in vitro* でのヒト膀胱癌細胞株 KU-7 での増殖抑制効果およびヌードマウス膀胱内移植ヒト膀胱癌モデルでの遺伝子治療の効果について検討した。

まず、Ad-GSN および β -ガラクトシダーゼ発現アデノウイルスベクター (Ad- β gal) を作製した。Ad- β gal による KU-7 へのアデノウイルス感染効率は MOI 400 で 95% であった。Ad-GSN 感染後の KU-7 よりタンパク質を抽出し、Western Blotting を行ったところ、ゲルソリンの発現は著明に亢進した。つづいて、*in vitro* で MOI 400 の Ad-GSN または Ad- β gal を KU-7 へ感染させ、経時的に細胞数を数えたところ、Ad-GSN 感染にて、細胞増殖が有意に抑制された。KU-7 での細胞周期の変化を調べたところ、Ad- β gal 感染細胞では、細胞周期の変化はわずかであったが、Ad-GSN 感染細胞では、G2/M 期が 18.8% から 28.4% へと増加したのに比べ、G1/S は 70.4% から 56.8% へと、減少していた。

次に、ヌードマウス膀胱内移植ヒト膀胱癌モデルを作製し、Ad- β gal 膀胱内注入による感

染効率を検討した。ヌードマウスの膀胱上皮をトリプシンにて障害、経尿道的に KU-7 を移植したのち、Ad- β gal を注入したところ、Xgal 染色にて腫瘍部に青染細胞を認め、腫瘍へのアデノウイルス感染を証明した。正常上皮では青染細胞をごく一部に認めるのみであった。さらに、Ad-GSN による *in vivo* でのヌードマウス膀胱内移植ヒト膀胱癌細胞の増殖抑制効果を検討するため、ヌードマウスの膀胱に経尿道的に KU-7 を移植後、48、72、96 時間後に Ad-GSN または Ad- β gal を投与し、10 日目に膀胱を摘出した。両群ともに 1 箇所以上の腫瘍が形成されており、10 日目の腫瘍平均面積を NIH image にて比べたところ、Ad-GSN 投与により腫瘍面積は 9 分の 1 と有意に抑制されていた。また両群ともに、肝臓、肺、脾臓には明らかな炎症所見は認められなかった。これらの結果により、ゲルソリンアデノウイルスベクターは、ヌードマウス膀胱内移植ヒト膀胱癌細胞の増殖を抑制すると考えられ、今後の膀胱癌に対する遺伝子治療への可能性が示された。

この論文に対して、ゲルソリンによる膀胱癌細胞株の増殖抑制効果の機序、ゲルソリンとアポトーシスのかわり、ゲルソリンが転移を抑制するかどうかについて質問があった。また、膀胱内投与に関して、ヒトへのゲルソリンアデノウイルスベクター膀胱内投与による炎症などの副作用惹起の可能性、アデノウイルスベクター反復投与による感染効率の低下の可能性、反復投与時の抗体産生による治療効果減弱の可能性、同所性モデルで β ガラクトシダーゼ発現ウイルスが正常細胞に感染しない理由についての質問があった。さらに臨床面より、ゲルソリン発現が低下する時期がいつごろか、ゲルソリンアデノウイルスベクター膀胱内投与を実際に行う場合の適応についての質問があった。これらの質問に対して、申請者は、まずゲルソリンによる膀胱癌細胞株の増殖抑制効果は、アポトーシスではなく、細胞周期を G2/M 期に集積させるためであること、悪性黒色腫細胞株のゲルソリントランスフェクタントでは転移が抑制されることを述べた。次にアデノウイルスベクター膀胱内投与に関して、受容体の違いや膀胱粘膜表面の糖タンパク障壁により、正常膀胱上皮での発現がきわめて低く、抗体産生による治療効果の減弱や炎症が認められにくいと考えられること、したがって反復投与可能なことを述べた。臨床面では、ゲルソリン発現の低下が癌化の初期でおこること、浸潤性膀胱癌患者の経尿道的手術後の残存病変に対して適応となりうることを述べた。

この論文は、ヒト膀胱癌細胞株の同所性モデルに対するアデノウイルスベクターを用いたはじめの遺伝子治療として高く評価され、今後のヒトへの遺伝子治療への応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。