

# 出雲 剛 論文内容の要旨

## 主 論 文

### Epstein-Barr virus-based vector improves the tumor cell killing effect of pituitary tumor in HVJ-liposome-mediated transcriptional targeting suicide gene therapy

(下垂体腫瘍特異的転写制御自殺遺伝子治療における EB ウイルスベクターを用いた殺腫瘍細胞効果の増強～HVJ リポゾーム導入法による検討)

(International Journal of Oncology in press, 2007)

共著者: 大津留 晶、徳永能治、難波裕幸、金田安史、永田 泉、山下俊一

長崎大学大学院医学研究科外科系専攻  
(指導教授: 永田 泉教授)

#### 【 緒 言 】

下垂体腫瘍は、大部分は組織学的に良性の腫瘍で、その治療法も近年ほぼ確立してきている。しかしそれらの治療法にても制御困難な悪性度の高い腫瘍が一部に存在する。これらの治療抵抗性下垂体腫瘍や下垂体癌に対する新たな治療手段として遺伝子治療の応用が検討されている。既にウイルスベクターを用いた自殺遺伝子治療にて下垂体腫瘍実験モデルに対する良好な抗腫瘍効果が試みられている。一方、アデノウイルスベクター使用により著明な下垂体炎を認めたことなどより、安全な遺伝子治療の確立の為に非ウイルスベクターによる遺伝子治療法も検討されている。しかし、非ウイルスベクターを用いた場合には、治療遺伝子の発現効率が極めて低く、ヒト臨床応用研究に向けての最大の障壁の一つとなっている。今回それらの欠点を克服するため、Epstein-Barr(EB)ウイルスベクターを応用した下垂体腫瘍特異的な自殺遺伝子治療を考案した。成長ホルモン(GH)産生ラット下垂体腫瘍モデルにおいて、HVJ リポゾーム法により EB ウイルスベクター治療遺伝子導入を行い、著明な抗腫瘍効果と腫瘍選択性が同時に得られたことを報告する。

#### 【 対象と方法 】

- 1) 細胞株: ラット成長ホルモン産生悪性下垂体腫瘍細胞株 metastatic GH3 (mGH3)、ラットグリオーマ細胞株 C6。
- 2) *In vivo* 腫瘍モデル: mGH3 皮下移植ヌードマウスモデル及び Wistar-Furth モデル。
- 3) 遺伝子治療法: 単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV-TK)/ガンシクロビル(GCV)による自殺遺伝子治療。
- 4) プラスミドベクター: GH プロモーター連結 HSV-TK 遺伝子を組み込んだ EB ウイルスベクターを作成(pEBGTK)。通常のプラスミド発現ベクターに GH プロモーター連結 HSV-TK 遺伝子を組み込んだ pGTK、レポーター遺伝子解析用として、HSV-TK 遺伝子の代わりにルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだベクター(pEBGL 及び pGL)を作成。
- 5) 遺伝子導入方法: hemmagultinating virus of Japan (HVJ) リポゾーム法。
- 6) 遺伝子発現能評価法: duplex luciferase assay による検討。

7) 抗腫瘍効果; *in vitro* においては  $IC_{50}$ 、*in vivo* では腫瘍径測定にて評価。

### 【 結 果 】

- 1) 導入遺伝子発現 *in vitro* 解析; pGL を mGH3 に導入した場合、luciferase 活性は導入後48時間まで上昇し、その後低下していく。pEBGL では導入後144時間まで luciferase 活性の上昇を認め、その活性は pGL の39倍を呈した。C6 では pGL 及び pEBGL ともに活性発現を認めなかった。
- 2) 導入遺伝子発現 *in vivo* 解析; Wistar-Furth ラット mGH3 移植腫瘍モデルに、pGL を遺伝子導入した場合、導入後7日までの腫瘍組織 luciferase 活性上昇を認めるが、その後活性は急速に低下した。一方、pEBGL を導入した場合にも7日目が最高値を示したが、導入24日目まで安定した活性を認めた。導入7日目および21日目での pEBGL 導入腫瘍における luciferase 活性は、pGL 導入腫瘍組織での活性に比し、それぞれ12倍及び84倍であった。正常組織・臓器では、対照ベクターの活性は認めしたが、pEBGL による有意な luciferase 活性は認められなかった。
- 3) *in vitro* 遺伝子治療; mGH3 では治療群別に GCV のみ・pGTK・pCTK・pEBGTK 導入の4群にて GCV 感受性を検討したところ、pEBGTK 導入群においてのみ著明な GCV 感受性亢進を認めた ( $IC_{50}$  はそれぞれ 91.7、51.6、41.7、0.47  $\mu$ M)、C6 においても同様に検討したところ、pCTK 導入細胞にて  $IC_{50}$  の有意な低下を認めた ( $IC_{50}$  は非導入細胞にて 526.7  $\mu$ M に対して pCTK 導入にて 127.3  $\mu$ M)。
- 4) *in vivo* 遺伝子治療; mGH3 ノードマウス皮下腫瘍モデルにて検討した。治療群としては pEBGTK 導入/GCV 腹腔内投与・pEBGTK 導入のみ・pGTK/GCV・GCV 腹腔内投与のみ・pEBGL/GCV・pCTK/GCV にて検討したところ、pCTK/GCV では治療開始3日目までの腫瘍縮小を認めたが以後増大し有意な腫瘍発育抑制は認めなかった。全治療経過にて有意な腫瘍発育抑制を認めたのは pEBGTK/GCV 群のみであり、8個の腫瘍の内1個は完全消失し1個は一過性消失を認めた。

### 【 考 察 】

悪性グリオーマに対するウイルスベクターを用いた自殺遺伝子治療は、動物実験では比較的良好な結果を示すものの、臨床試験においては十分な治療効果を示すに至っていない。この一因としてヒトグリオーマが、動物腫瘍モデルグリオーマに比して細胞分裂速度が遅く、治療遺伝子の発現が長期間持続しなければ効果が出ないのではないかと推測されている。下垂体腫瘍はグリオーマに比し、腫瘍体積の縮小でも治療効果が期待できるため遺伝子治療のよい適応であるが、細胞分裂の速度がさらに遅く、従来の遺伝子治療ベクターの効果がやはり期待できない。また周囲の中樞神経系や正常下垂体組織に対する障害のない安全な治療法の開発が必要とされてきた。この様な観点から本研究では、Epstein-Barr(EB)ウイルス遺伝子を基にしたプラスミド発現ベクターを確立し、GH プロモーターによる分子標的化を図り、遺伝子導入はHVJリポソーム法を用いた。EBV ベクターはその EBNA-1 遺伝子と OriP 遺伝子による自己複製と核内安定化を特徴とする。これにより治療遺伝子が長期間かつ高い活性にて発現され、*in vitro* 及び *in vivo* において高い抗腫瘍効果が発揮されるに至ったと思われる。また、*in vitro* 遺伝子治療の検討にて示される通り、プロモーター活性の強い非 EBV ベクターの pCTK に比して、pEBGTK の  $IC_{50}$  が極めて低くなっている。非ウイルスベクターでは細胞内導入後に不活性化機序が働くものが多く、EBV ベクターにおいてはそれを補うメカニズムがあり、これが episomal expression の特徴でないかと考える。

下垂体腫瘍に対する腫瘍特異的転写制御自殺遺伝子治療において、EBV ベクターを構築することで殺腫瘍細胞遺伝子発現能の改善を認め、著明な治療効果示されたことにより、今後のヒト下垂体腫瘍遺伝子治療への臨床応用へ向けた非ウイルスベクター遺伝子治療の可能性が示された。