

氏名(本籍)	瀬尾 恵美子 (茨城県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第3801号		
学位授与年月日	平成17年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Effective Gene Therapy of Biliary Tract Cancers by a Conditionally Replicative Adenovirus Expressing Uracil Phosphoribosyltransferase (UPRT):Significance of Timing of 5-fluorouracil Administration (Uracil Phosphoribosyltransferase(UPRT) 遺伝子を発現する制限増殖型アデノウイルスを用いた胆道癌の有効な遺伝子治療：5-fluorouracil 投与時期の重要性)		
主査	筑波大学教授	医学博士	坂庭 操
副査	筑波大学教授	医学博士	赤座 英之
副査	筑波大学講師	博士(医学)	小野寺 雅史
副査	筑波大学講師	博士(医学)	河合 弘二

論文の内容の要旨

(目的)

胆道癌は、多くは進行期に発見され、予後不良な癌腫の一つである。5-fluorouracil (5-FU) は多くの癌に使用される抗癌剤であるが、癌細胞の耐性のために効果は乏しい。大腸菌由来の Uracil Phosphoribosyltransferase (UPRT) は、ヒトには存在しない pyrimidine salvage 酵素で、5-FU を直接 fluorouridine monophosphate (FUMP) に代謝し F-RNA による RNA 障害を増強する。UPRT を発現するアデノウイルス (Ad) ベクターは、癌細胞の 5-FU 感受性を改善することが報告されている。しかし、従来の非増殖型ベクターでは遺伝子導入が一部の癌細胞に留まり効果に限界があった。近年、p53 変異癌細胞で選択的に増殖する E1B-55kD 欠損ベクターが開発され、頭頸部癌に対し画期的な臨床成績も報告された。そこで本研究では、E1B-55kD 欠損癌選択的増殖型 Ad に UPRT 遺伝子を導入した、癌選択的増殖型 Ad ベクター (AxE1CAUP) と、5-FU を用いた化学遺伝子治療の胆道癌に対する抗腫瘍効果と安全性を実験的に解析した。

(対象と方法)

胆道癌細胞株は、p53 変異または欠損を有する TGBC-44TKB, Sk-ChA-1, TGBC-1TKB の 3 種を用い、対照として正常ヒト線維芽細胞 WI-38 を用いた。Ad ベクターは、AxE1CAUP と UPRT 遺伝子導入非増殖型ベクター (AxCAUP), E1B-55kD 欠損癌選択的増殖型ベクター (AxE1AdB) を検討した。細胞内での各ベクターの増殖能は、Ad 力価の測定および Ad E1A 蛋白の発現により評価した。UPRT 蛋白の発現は Western blot 法、UPRT 活性は GC-MS による F-RNA 測定により評価した。ベクターが細胞の 5-FU 感受性に与える影響は、各ベクター (0-100MOI) の感染後、1-5 日後に 5-FU 投与 (0-1000 μ M) を開始し、5 日後に WST-1 法で cell viability を測定し、評価した。ベクターの in vivo での抗腫瘍効果は、ヌードマウスのヒト胆嚢癌皮下移植モデルおよび腹膜播種モデルにて検討した。Ad の存在は EIA 蛋白の免疫染色と電顕にて確認し、抗腫瘍効果は、皮下移植モデルでは腫瘍体積の変化、腹膜播種モデルでは組織像と生存期間にて判定した。いずれの実験も

ベクター投与後から 5-FU を開始するまでの期間を変えて検討した。

(結果)

1) 癌選択的増殖型の AxE1AdB と AxE1CAUP は、胆道癌細胞内で 150-1000 倍に増殖し、E1A 蛋白も増加したが、少量 (0.01 μ M) の 5-FU 投与でこの増加は阻害された。2) 胆道癌細胞内で、非増殖型の AxCAUP の感染後には一定量の UPRT しか発現しなかったのに比し、増殖型の AxE1CAUP の感染後には UPRT 発現は経時的に著明に増加した。5-FU 投与後の F-RNA 産生も、AxE1CAUP (1MOI) 感染細胞で、AxCAUP (10 MOI) 感染細胞に比し有意に高かった。3) TGBC-44-TKB の 5-FU 感受性は、AxCAUP (10 MOI) の感染 3 日後に 5-FU 投与を開始すると約 12 倍増強したが、一方、その 1/10 量の AxE1CAUP (1MOI) の感染では約 120 倍に増強した。Sk-ChA-1 細胞でも、同様に AxE1CAUP が 5-FU 感受性を最も増強した。この 5-FU 感受性の増強はベクター感染 1 日後から 5-FU を開始すると認められなくなった。Ad の感染効率の低い TGBC-1TKB 細胞では、AxE1CAUP の増殖はやや遅く UPRT の発現も遅いため、感染 3 日後から 5-FU を開始すると 5-FU 感受性の増強は中等度に留まったが、感染 5 日後から開始すると感受性は著明に増強した。4) AxE1CAUP は、正常 WI-38 細胞では増殖が抑制され、UPRT 発現は乏しく 5-FU 感受性を変化させなかった。5) 胆嚢癌皮下移植モデルでは、AxE1CAUP 群が他ベクター群に比し有意に強く腫瘍増殖を抑制し、5-FU をベクター投与 1 日後に投与した群より 3 日後に投与した群でより抑制した。5) 胆嚢癌腹膜播種モデルでは、コントロールの PBS 群では大きな腹膜播種が多数みられたのに比し、AxE1CAUP 群では播種巣は小さく Ad が多数確認された。ベクター投与後 5-FU を投与した群では腫瘍は壊死し、腫瘍サイズは小さかったが、Ad も激減していた。生存期間は、AxE1CAUP の腹腔内投与後 10 日後または 15 日後から 5-FU を投与した群では PBS 群、5-FU 群に比し有意に延長したが、5 日後から 5-FU を投与した群では延長しなかった。

(考察)

UPRT 発現癌選択的増殖型 Ad ベクター (AxE1CAUP) は、UPRT 発現非増殖型ベクター、癌選択的増殖型ベクターに比し、胆道癌に対し強力な抗腫瘍効果を有すると考えられる。しかし、その効果を得るためには、ウイルスが腫瘍内で十分に増殖する期間を待たなくてはならないことが、本実験より示唆された。今までに多くの HSV-tk/GCV システムをはじめとした、自殺遺伝子治療が報告されているが、その効果は画期的なものではない。これらの多くは、ウイルス投与後比較的速やかに prodrug が投与されており、ウイルスの増殖が十分でないために、本来の効果が現れていない可能性がある。本ベクターの最大の効果を得るためには、5-FU の投与時期が重要だが、近年、生体内におけるウイルス量の測定方法が、複数報告されており、それらを利用することで臨床への応用も可能と考える。

(結論)

1) UPRT 発現癌選択的増殖型 Ad ベクターは、胆道癌細胞に対して *in vitro* および *in vivo* で、癌選択的増殖型ベクターや UPRT 発現非増殖型ベクターに比しより高い抗腫瘍効果を発揮し、胆道癌の 5-FU 抵抗性の克服に有効な遺伝子治療と考えられた。2) 本ベクターの増殖は 5-FU により抑制され、最大効果を得るためにはベクターの腫瘍内での十分な増殖を待った後に 5-FU を投与することが重要であった。3) 本ベクターは、従来型ベクターに比し、初期投与量を減量できるうえ正常細胞では増殖が抑制されることから、より安全であると考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

胆道癌は、現在有効な抗癌剤が殆どない予後不良の悪性疾患である。本研究は、この胆道癌にある程度効果がある 5-FU の薬効を高めるために、癌細胞の 5-FU 感受性を遺伝子治療によって高めようと思図されたものである。ベクターには E1B-55kD 欠損癌選択的増殖型アデノウイルスに大腸菌由来の UPRT 遺伝子を導

入したものをを用いた。この結果、このベクターは胆道癌細胞の5-FU感受性を飛躍的に高めることが明らかになった。また、本遺伝子治療法の有効性を確保するためにはベクターの腫瘍細胞内での十分な増殖を待ってから5-FUを投与することが重要であることが示された。本ベクターはその所期投与量を減量でき、正常細胞では増殖が抑えられることから、従来型に比べより安全であると考えられた。

本研究は、綿密な研究計画と高度な研究手技によって実行され、実験結果が緻密に分析されており、今後の臨床応用への発展が大いに期待される。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。