

学位論文内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 論文審査担当者 |
|--|---|
| 面川貴士 | 主査 教授 勝 健 一 副査 教授 植 林 勇 副査 教授 谷 川 允 彦 副査 教授 佐 野 浩 一 副査 教授 黒 岩 敏 彦 |
| 主論文題名 Adenovirus-Mediated <i>mda-7</i> (<i>IL24</i>) Gene Therapy Suppresses Angiogenesis and Sensitizes NSCLC Xenograft Tumors to Radiation (肺非小細胞癌に対するアデノウイルスベクターを用いた <i>mda-7</i> (<i>IL24</i>) 遺伝子治療の血管新生抑制および放射線増感効果に関する検討) | |
| 学位論文内容の要旨 | |
| <p>《目的》</p> <p>悪性腫瘍の分子生物学的理解の進歩により、遺伝子治療を含む様々な治療戦略がたてられている。melanoma differentiation-associated gene-7 (<i>mda-7</i>)は悪性黒色腫を interferonβと mezerein で治療した場合に強発現することにより発見され、通常はメラノサイトや早期のメラノーマで発現しているが、進行期のメラノーマでは発現が低下する。この事実より、<i>mda-7</i> は新たな癌抑制遺伝子と考えられ、様々な悪性細胞に強制発現させることにより、細胞周期の停止やアポトーシスの誘導を引き起こす一方、正常細胞には影響しないことが示されてきた。申請者らは、<i>in vitro</i> において肺非小細胞癌に対してもアデノウイルスを用いた <i>mda-7</i> (<i>Ad-mda7</i>)の投与が、抗腫瘍効果を示し、血管新生抑制作用を有することを報告してきた。今回、申請者は <i>in vivo</i> において <i>Ad-mda7</i>と放射線の併用療法による抗腫瘍効果および血管新生抑制効果について検討した。</p> <p>《対象と方法》</p> <ol style="list-style-type: none"> 細胞培養 肺非小細胞癌細胞株である A549、正常肺線維芽細胞株である CCD16 および臍帯静脈血管内皮細胞株である HUVEC を用い、推奨される条件下で培養した。<i>Ad-mda7</i> を定常的に感染させた HEC293 細胞は、Introgen Therapeutics より提供を受けた。 動物実験モデル 5×10⁶個の A549 細胞をヌードマウスの皮下に投与し腫瘍の大きさが 200mm³となった時点で治療を開始した。最大腫瘍径が 15mm となるまで測定を行い、各治療群間での抗腫瘍効果を比較した。 アデノウイルス <i>Ad-mda7</i>は CMV プロモーターを用い、アデノウイルス E1A 部を削除し自己増殖不能となるように構築した。 遺伝子導入 皮下腫瘍径が 200mm³に達した時点を day0 とし day1, day3, day5 に 1×10¹⁰vp の <i>Ad-mda7</i> を腫瘍内に直接注入した。 | |

5. 放射線治療

*in vivo*で放射線の線源は ^{60}Co unit を用い、5Gy を照射した。*in vitro*では ^{137}Cs unit を使用した。

6. 免疫組織染色

腫瘍を day14 に摘出し、vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), interleukin-8 (IL-8) または CD31 に対する免疫染色を行った。微小血管密度 (MVD) は CD31 染色で評価し、強拡大下で無作為に選んだ 3 視野の平均を求めた。

7. TUNEL 染色

アポトーシス細胞の検出に TUNEL 法を用い、陽性率を求めた。

8. Cell survival analysis

HUVEC に *mda-7* 蛋白 (MDA-7) を 10ng/ml の濃度で含んだ培養液を投与し、12 時間後放射線照射を行った。細胞をトリプシン処理した後、新たな培養皿に撒き、14 日後コロニーの数を求めた。

《結果》

1. Ad-*mda7* と放射線の併用療法による抗腫瘍効果

*in vivo*において Ad-*mda7* と放射線の併用療法は他の治療群と比較して著明な抗腫瘍効果を示した。対象群に比較して、Ad-*mda7* 単独投与群は腫瘍が 600mm^3 に達するのにさらに 4 日を要したのに対し、併用療法群では 28 日であった。生存率も併用療法群は他群に比べて著明に改善された。

2. Ad-*mda7* と放射線の併用療法によるアポトーシスの誘導

day8 に腫瘍を摘出し TUNEL 染色を行った。陽性率は対象群で 1.2%、Ad-*mda7* 単独群で 1.3%、放射線単独群で 2.2%、併用療法群で 4.6% であり有意な増加が認められた。

3. Ad-*mda7* による放射線照射後の血管新生誘導物質発現の抑制

血管新生誘導因子である VEGF, bFGF, IL-8 の発現は放射線単独治療において増強し、Ad-*mda7* の投与により抑制された。

4. Ad-*mda7* と放射線の併用療法による血管新生抑制効果

MVD は無治療群で 44 ± 16 、Ad-*mda7* 単独投与群で 25 ± 5 、放射線単独群で 30 ± 8 あったのに対し、併用療法群では 10 ± 4 であり有意に減少していた。

5. MDA-7 による血管内皮細胞の放射線感受性増強作用

MDA-7 (10ng/ml) は HUVEC の放射線感受性を増強させたが、A549 と CCD16 に対しては無効であった。HUVEC に対する放射線感受性の増強作用は、MDA-7 投与により 2Gy で 30.5% から 14%、4Gy で 9% から 2.8% に生存率を減少させた。

6. 様々な治療スケジュールによる併用療法の抗腫瘍効果

様々な治療スケジュールによる抗腫瘍効果を評価するために、day1、day5 または day7 に 3×10^{10} の Ad-*mda7* を 1 回投与し、day6 に放射線治療 (5Gy) を併用して、抗腫瘍効果を比較した。Day1 に Ad-*mda7* を投与した場合、著明な抗腫瘍効果が認められたが、day5 あるいは day7 に投与した群では、腫瘍の大きさが 600mm^3 に達するのに要する時間は放射線単独治療群と比較して有意差がなかった。

《考察》

肺非小細胞癌マウスモデルにおいて、Ad-*mda7* と放射線の併用療法群では無治療群および単独治療群と比較して著明な腫瘍増大抑制効果を認めた。アポトーシスに関する検討では、併用療法群において TUNEL 陽性細胞の増加が認められアポトーシスの誘導が治療効果の理由の 1 つと考えられた。さらに CD31 染色を用いた MVD の検討では、併用療法群において有意に減少しており、腫瘍血管新生が有意に抑制されていた。併用療法により血管新生が抑制される機序を明らかにするために免疫

染色により血管新生誘導物質である VEGF, bFGF, IL-8 の発現を調べた。興味深いことにこれらはすべて放射線照射後に発現が増強していたが、Ad-*mda7* の投与により著明に抑制されていた。また MDA-7 の放射線増感作用について検討したところ、HUVEC に対して放射線増感作用を有する一方で A549 や CCD16 に対しては無効であった。以上の結果より、申請者は *mda-7* 遺伝子治療の抗腫瘍効果は、Ad-*mda7* による腫瘍内でのアポトーシスの誘導、放射線感受性の増加および血管新生誘導物質の発現低下と、さらに *mda-7* 遺伝子が導入された細胞から分泌される MDA-7 により新生血管の放射線感受性が増強されることにより発揮されたものと考えられた。

放射線は様々な血管新生誘導物質の発現を増加させることが報告されており、放射線による癌治療後の再発や転移に関与しているとも推測される。この点において放射線と血管新生抑制物質の併用療法は有望な治療戦略である。よって放射線と Ad-*mda7* の併用療法は、肺非小細胞癌に対して、実行可能で有望な治療方法であると考えられる。

審査結果の要旨および担当者

| 報告番号 | 乙 第 号 | 氏 名 | 西 川 貴 士 |
|---|-------|--|---------|
| 論文審査担当者 | | 主 査 教授 勝 健 一 副 査 教授 樋 林 勇 副 査 教授 谷 川 允 彦 副 査 教授 佐 野 浩 一 副 査 教授 黒 岩 敏 彦 | |
| 主論文題名 Adenovirus-Mediated <i>mda-7</i> (<i>IL24</i>) Gene Therapy Suppresses Angiogenesis and Sensitizes NSCLC Xenograft Tumors to Radiation (肺非小細胞癌に対するアデノウイルスベクターを用いた <i>mda-7</i> (<i>IL24</i>) 遺伝子治療の血管新生抑制および放射線増感効果に関する検討) | | | |
| 論 文 審 査 結 果 の 要 旨 | | | |
| <p>本研究は、<i>in vivo</i>における <i>mda-7</i>遺伝子治療と放射線の併用療法の効果とその作用機序を検討したものである。</p> <p>melanoma differentiation-associated gene-7; <i>mda-7</i> (<i>IL24</i>) 遺伝子は様々な癌で発現が低下していることより、新規の癌抑制遺伝子と考えられている。アデノウイルスを用いた <i>mda-7</i> 遺伝子治療は様々な癌発育を抑制することが報告されてきた。さらに <i>in vitro</i> で <i>mda-7</i> 遺伝子治療が肺非小細胞癌株に対して JNK 及び c-Jun を活性化することにより放射線によるアポトーシスを誘導することが報告されたが、<i>in vivo</i> での検討は未だなかった。</p> <p>申請者は、本研究において <i>mda-7</i> と放射線の併用療法は、</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 著明な抗腫瘍効果を示すこと。 ② 腫瘍内において免疫染色では vascular endothelial growth factor (VEGF) や basic fibroblast growth factor (bFGF) といった血管新生誘導物質の発現低下を示すこと。 ③ 腫瘍内で細血管密度の低下およびアポトーシスの増加が認められること。 ④ 分泌型の <i>mda-7</i> 蛋白は、ヒト臍静脈血管内皮細胞に対し放射線増感作用を発揮したが、腫瘍細胞や正常細胞には効果を示さなかったこと。 <p>などを明らかにしている。</p> <p>すなわち、申請者の結果はアデノウイルス <i>mda-7</i> が放射線との併用により腫瘍内でアポトーシスを誘導し、分泌型 <i>mda-7</i> 蛋白が正常細胞に影響することなく、血管内皮細胞の放射線感受性を増加させることにより腫瘍血管新生を抑制することを示唆している。この結果から、今後、<i>mda-7</i> 遺伝子治療と放射線治療の併用療法は悪性腫瘍に対する新たな治療戦略となりうることが考えられた。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第3条第2項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Molecular Therapy 9(6): 818-828, 2004</p> | | | |