

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
井上 仁	主査 教授 谷 川 允 彦 副査 教授 宮 崎 瑞 夫 副査 教授 林 秀 行 副査 教授 勝 健 一 副査 教授 黒 岩 敏 彦
主論文題名 Enhancement of Chemosensitivity to Fluoropyrimidines by Retroviral Transduction of Thymidine Phosphorylase cDNA: an <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> Study (レトロウィルスベクターによるThymidine Phosphorylase遺伝子導入のフッ化ピリミジン系抗癌剤に対する感受性増強効果)	
学位論文内容の要旨	
<p>《背景および研究目的》</p> <p>Thymidine phosphorylase (TP)は pyrimidine nucleoside の代謝に関与する酵素で、thymidine と thymine の変換を触媒する。この酵素は悪性腫瘍組織で高発現していることが知られている。そして、血管新生因子である platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF)と同一蛋白であることが明らかにされ、血管新生や腫瘍組織での血管密度と相関することが報告されている。一方、TP は 5-fluorouracil (5-FU)のプロドラッグである 5'-deoxy-fluorouridine (5'-DFUR)と capecitabine の活性化酵素であり、これらは TP を高発現する腫瘍において選択的に抗腫瘍効果を発揮する。TP は 5'-DFUR および capecitabine の効果発現に必須であり、この酵素による 5-FU への変換が効果発現の律速段階となっている。これらの抗癌剤に対する感受性は、プラスミドベクターによる TP 遺伝子導入により増強されることが報告されている。また、ある種の抗癌剤、放射線およびサイトカインが腫瘍組織中の TP を誘導することも報告されている。</p> <p>本研究では、分裂する細胞の染色体に安定に組み込まれることにより長期に遺伝子の発現が可能であり、現在、遺伝子導入実験および遺伝子治療に広く用いられているレトロウィルスベクターを用いた。TP 遺伝子をコードするレトロウィルスベクターを作製しマウス大腸癌細胞株に導入することにより、安定した TP 発現がフッ化ピリミジン系抗癌剤の抗腫瘍効果を増強させ、遺伝子治療の標的となり得るかどうかについて検討することとした。</p> <p>《対象および方法》</p> <p>1.6kbp の TP cDNA をレトロウィルスベクター-pMV7 の EcoR I サイトに挿入し pMV7-TP を作製した。これとコントロールベクターである pMV7 をパッケージング細胞 (PA317) にトランスフェクションし得られたウィルスを、それぞれマウス大腸癌株である MC38 細胞株に感染させ MC38-TP、MC38-Neo を樹立した。MC38 親細胞株 (MC38-P) と MC38-Neo は対象群として用いた。</p> <p>各細胞株について、TP 蛋白の発現、細胞増殖速度、フッ化ピリミジン誘導体に対する感受性の増強効果について検討した。また、マウスの皮下に各細胞株を移植した腫瘍モデルを用いてフッ化ピリミジン系抗癌剤に対する抗腫瘍効果について検討した。</p>	

TP 蛋白の発現の判定は、ウェスタンブロット法および免疫組織化学染色にて行い、1 次抗体として抗ヒト TP モノクローナル抗体 (1C6-203) を用いた。TP 活性は ELISA 法にて測定した。細胞増殖はメチレンブルー染色法により判定した生細胞数の経時的な変化により測定した。抗癌剤感受性試験は、5-FU、5'-DFUR と capecitabine に対して行い、メチレンブルー染色により 50% inhibitory concentration (IC50) を測定して感受性を測定した。

動物実験は 6 週齢の C57BL/6J-Jcl mice (Clea Japan 社) の背部皮下に上記三種類の細胞をそれぞれ移植した。腫瘍移植 3 週間後よりコントロールとして PBS を経口投与し、抗癌剤投与は 5-FU を腹腔内投与、5'-DFUR と capecitabine を経口投与にて行った。抗癌剤投与は最大耐用量を 2 週間投与した。抗腫瘍効果は経時的な腫瘍体積の測定にて判定した。

#### 《結果》

1) ウェスタンブロット法、免疫組織化学染色および TP 活性測定において MC38-TP 群にのみ TP の発現を確認した。細胞増殖能においては各群に有意差は無く、in vitro における TP 遺伝子導入による細胞障害は認めなかった。

2) 抗癌剤感受性を IC50 で比較すると、対象群に比べて MC38-TP 群では、5-FU に対して 10 倍、5'-DFUR に対して 800 倍、capecitabine に対して 40 倍と増強した ( $p < 0.01$ )。

3) 移植腫瘍モデルにおいて、PBS 投与では対象群、MC38-TP 群ともに腫瘍増大速度に有意差は認めなかった。対象群間においては PBS 投与と抗癌剤投与による腫瘍抑制効果に有意差は認めなかった。MC38-TP 群においては対象群に比べて有意な腫瘍抑制効果を示し、抗癌剤投与開始 38 日目の腫瘍縮小率は 5-FU 投与において 37.6% ( $p < 0.05$ )、5'-DFUR 投与において 96.8% ( $p < 0.01$ )、capecitabine 投与において 100% ( $p < 0.01$ ) であった。5'-DFUR 投与群と capecitabine 投与群において著明な腫瘍抑制効果を認めた。

#### 《考察および結論》

フッ化ピリミジン系抗癌剤の活性化酵素である TP をコードするレトロウィルスベクターを作製した。そして、マウス大腸癌細胞に導入し安定した TP 発現を得ることができた。これにより capecitabine 投与群、5'-DFUR 投与群で劇的な腫瘍消退率を認めた。しかし、TP は抗癌剤活性化酵素として利用しうる一方で、腫瘍組織に多く出現し血管新生や予後と関連しているという二つの側面を持つユニークな酵素である。さまざまな TP 高発現腫瘍において血管密度が高く予後が悪いとの報告もあるが、これらの相関するメカニズムは良く分かっていない。本研究においては TP 発現による細胞増殖能および血管密度との相関は認めなかった。

臨床的に TP をいかに特異的に癌細胞に発現させるかなど更なる検討の余地はあるが、TP 低発現腫瘍に対してレトロウィルスベクターを用いて安定した TP 発現を得ることによりフッ化ピリミジン系抗癌剤に対する抗腫瘍効果を著しく増強させることが本研究によって示された。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	井上 仁
論文審査担当者		主 査 教授 谷 川 允 彦 副 査 教授 宮 崎 瑞 夫 副 査 教授 林 秀 行 副 査 教授 勝 健 一 副 査 教授 黒 岩 敏 彦	
主論文題名 Enhancement of Chemosensitivity to Fluoropyrimidines by Retroviral Transduction of Thymidine Phosphorylase cDNA: an <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> Study (レトロウィルスベクターによる Thymidine Phosphorylase 遺伝子導入のフッ化ピリミジン系抗癌剤に対する感受性増強効果)			
論文審査結果の要旨			
<p>Thymidine phosphorylase (TP) 5-fluorouracil (5-FU) のプロドラッグである 5'-deoxy-fluorouridine(5'-DFUR)と capecitabine の活性化酵素であり、さまざまな悪性腫瘍で高発現していることが知られている。これにより5'-DFURおよびcapecitabineが腫瘍選択的な抗腫瘍効果を発揮する。</p> <p>本研究において申請者は、レトロウィルスベクターを用いて TP 遺伝子を癌細胞に導入することによりフッ化ピリミジン系抗癌剤に対する抗腫瘍効果を増強させ、TP遺伝子が遺伝子治療の標的となり得るかどうかについて検討した。申請者は、TP 遺伝子をコードするレトロウィルスベクターを作製しマウス大腸癌細胞株に導入することにより、TP 蛋白発現、細胞増殖能、抗癌剤感受性を <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> において検索して以下の結果および結論を得ている。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) TP 導入細胞株においてウェスタンブロット法、免疫組織化学染色および ELISA 法による TP 活性測定で TP 蛋白発現を認めた。</li> <li>2) TP 導入細胞株では対象群に比べてフッ化ピリミジン系抗癌剤に対する有意な感受性増強が認められた。</li> <li>3) 移植腫瘍モデルにおいて、TP 導入群は対象群に比べて有意な腫瘍抑制効果を認め、特に capecitabine 投与において腫瘍縮小率は 100%であった。</li> <li>4) TP 遺伝子導入による細胞増殖能および腫瘍増大速度に対する影響は認められなかった。</li> </ol> <p>本研究はフッ化ピリミジン系抗癌剤の活性化酵素である TP を治療標的にする可能性を明らかにしたものである。申請者は、レトロウィルスベクターを用いて安定した TP 蛋白発現を得ることにより、フッ化ピリミジン系抗癌剤に対する著しい感受性増強効果を導き出した。すなわち、TP 遺伝子を標的とした遺伝子治療の可能性を本研究は示している。</p> <p>以上より、本論文は本学大学院学則9条に定める所の博士(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 Bulletin of the Osaka Medical 52(1): 19-27, 2006</p>			