



Title	フレンドウィルスエンベロープ遺伝子導入によるラット癌細胞の異物化
Author(s)	杉浦, 千尋
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第2735号
Issue Date	1990-03-24
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/30171">http://hdl.handle.net/2115/30171</a>
Type	theses (doctoral)
Note	共著者あり。共著者名: Toshiyuki Itaya, Nobuo Kondoh, Tsuneyuki Oikawa, Noboru Kuzumaki, Noritoshi Takeichi, Masuo Hosokawa, Hiroshi Kobayashi. Chihiro Sugiura, Toshiyuki Itaya, Nobuo Kondoh, Tsuneyuki Oikawa, Noboru Kuzumaki, Noritoshi Takeichi, Masuo Hosokawa, Hiroshi Kobayashi (1988), XENOGENIZATION OF TUMOR CELLS BY TRANSFECTION WITH PLASMID CONTAINING env GENE OF FRIEND LEUKEMIA VIRUS, Cancer Science, 79(12), pp.1259-1263. doi:10.1111/j.1349-7006.1988.tb01553.x. 'The definitive version is available at <a href="http://www.blackwell-synergy.com">www.blackwell-synergy.com</a> '
File Information	thesis.pdf



[Instructions for use](#)

フレンドウイルスエンベロープ遺伝子導入によるラット癌細胞の  
異物化

Xenogenization of rat tumor cells by transfection with  
envelope gene derived from Friend murine leukemia virus.

杉浦千尋

北海道大学歯学部口腔外科学第一講座

(主任 福田 博 教授)

## 目次

緒言

材料および方法

結果

考察

結語

文献

謝辞

図表

## 緒言

生体内で正常細胞が癌化する際、その多くは免疫学的監視機構により認識され、癌化が完了して致死的増殖をする以前に排除されると考えられている。したがって、生体内で増殖を示す癌細胞の多くは抗原性が低く、免疫学的監視機構に認識され難い場合が多い<sup>1) 2)</sup>。そのような癌細胞に、宿主に認識され易い異物性抗原を細胞膜面上に表現するウイルスを、人工的に感染させることにより、その癌細胞の抗原性が上昇し、正常同系宿主では自然退縮する。この現象は、癌細胞の異物化として報告されてきた<sup>3)</sup>。その後、癌細胞の抗原性を上昇させ異物化する試みはウイルスだけでなく、バクテリア、変異原性を有する化学物質、レクチンなどを癌細胞に処理することによってもなされてきた<sup>4) - 11)</sup>。さらに近年、分子生物学や遺伝子工学の発達に伴い、異物化のあらたな方法が模索されるようになった。ウイルスやバクテリアだけでなく、真核生物のさまざまな遺伝子も単離されるいっぽうで、単離した遺伝子の組換え、複製や、さらには、それら遺伝子を各種細胞内に人工的に導入し、導入した遺伝子産物を産生させる技術も確立された。これらの技術を背景に、マウスの主要組織適合抗原であるMHCクラスI (H-2) 遺伝子を癌細胞に導入することによっても、同様の異物化をおこしうることが報告されている<sup>12)</sup>。これらの試みのうち、抗原性の上昇による腫瘍原性の低下という観点からは、ウイルスによる異物化が最も効果的である。この場合用いられたウイルスはマウス由来の白血病ウイルスで、正常ラットに対する自然感染性は認められないものの、なおその病原性は

否定できない。

そこで、今回筆者は、感染性を有したウイルス粒子を用いずに、ウイルス複製のために必要な遺伝子構造はもたず、ウイルスの抗原のみをコードする、エンベロープ遺伝子のみを癌細胞に導入することによっても、ウイルス粒子を用いた場合と同様の、異物化を起こしうるかいなかを検討した。さらに、異物化された場合、正常同系宿主が異物化癌細胞を拒絶した後に、未処置親癌細胞に対する特異的腫瘍移植抵抗性を誘導しうるか否かを検討した。

## 材料と方法

ラット： 北海道大学医学部付属動物実験施設より供与された、8週齢から12週齢の雌近交系WKA/Hokラットをもちいた。

腫瘍細胞： WKA/hokラットに3'-methyl-4-dimethylaminoazo-benzeneにより誘発した、可移植性肝細胞癌cKDH-8由来のサブクローンcKDH-8 cl-11をもちいた。フレンドウイルス感染癌細胞(FV-KDH-8)は、生後24時間以内の新生児期のWKA/Hokラットに、フレンドウイルスを皮下および腹腔内に接種し、フレンドウイルス寛容としたラットに、その8週後、cKDH-8 cl-11およびフレンドウイルスを腹腔内接種し、*in vivo*で感染させた癌細胞を、1週後に再び*in vitro*培養系に戻した癌細胞をもちいた。これらの癌細胞は、10%の熱非働化牛胎児血清および0.584mg/mlのL-グルタミンを加えた、日水製Dubecco's Minimum Essential Medium (DMEM)にて単層培養されている。培養細胞は0.02%EDTA処理により継代されている。また、KMT-17腫瘍細胞はWKA/Hokラットに3'-methyl-cholanthreneにより誘発された繊維肉腫で、同系宿主の腹腔内接種により腹水の形態で維持されている。

プラスミド： 通常の方法に従い、ヘルパーウイルス非依存性フレンド白血病ウイルスはクローン化されベクターに組み込まれた。このベクター(pZip-FV-env)はプラスミドpZip Neo SV(B)に、クローン化されたウイルスのエンベロープ遺伝子(HindIII-BanIII断片)を含むもので、京都大学ウイルス研究所の石本教授

より供与された(図1)<sup>13)</sup>。また、対照としてもちいたプラスミドは、セントルイス大学のグリーン博士より供与された、pSV2-Neoをもちいた。

**遺伝子導入：** 遺伝子導入方法は、Van der Ebらの原法に改変をくわえた<sup>14)</sup>。すなわち、直径60mmの培養用シャーレ中で対数増殖期にある $2 \times 10^5$ 個のcKDH-8 cl-11細胞に、培養液を吸引後、 $1 \mu\text{g}$ のpZip-FV-envまたはpSV2-Neoと、 $20 \mu\text{g}$ のsalmon sperm DNAを含むリン酸カルシウム共沈殿物を室温で20分処理した。つぎに、再び培養液を加え5%CO<sub>2</sub>、37℃条件下で4時間静置培養後、リン酸カルシウム共沈殿物を含む培養液を吸引し、培養液で2回洗浄の後通常の条件下でさらに24時間培養した。その後、直径60mmのシャーレに細胞を三等分し、さらに16時間培養した。この時点で、選択抗生剤であるG-418(GIBCO社)を $800 \mu\text{g/ml}$ 含む培地で約1ヵ月継代し、遺伝子の導入された細胞、すなわち選択抗生剤耐性になった細胞をもちいた。これ以後、これら遺伝子導入癌細胞は $400 \mu\text{g/ml}$ のG-418を含む培地で継代した。

**モノクロナール抗体および抗血清：** フレンドウイルスgp70に対するモノクロナール抗体は、フレンドウイルスを感染させたマウス細胞を、同系マウスに免疫して得られた脾細胞から、通常の方法によりハイブリドーマを作製し得られたもので、東海大学の多田博士より供与された。また、gag遺伝子産物p30に対する抗血清は、電気泳動により得られた分子量30000の分画を、兔に免疫して得られた抗血清で、北海道大学医学部癌研究施設分子遺伝部

門の葛巻教授より供与された。またFluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC)標識ヤギ抗マウス抗血清、FITC標識ヤギ抗兔抗血清はカッペル社製をもちいた。

フローサイトメトリー分析：細胞は回収後、リン酸緩衝液(PBS)で2回洗浄の後、 $1 \times 10^6$ 個あたり $50 \mu\text{l}$ の各種抗体と室温で30分間反応させ、PBSで2回洗浄した。次に $50 \mu\text{l}$ のFITC標識2次抗体と室温で30分間反応させ、PBSで2回洗浄の後、FACScan(Becton Dickinson社製)にて解析した。ヒストグラム作製にはConsort 30プログラムをもちいた。

免疫組織化学染色：試料はOCT compound (Miles Laboratory製)に包埋、 $5 \mu\text{m}$ に薄切後アセトン固定し、アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ(ABC)法により染色した。染色にはVectastain ABC kit (Vector Laboratory社製)を用い、通常の方法により染色した。

移植実験：癌細胞の腫瘍原性を調べるために、各種移植量の癌細胞を正常同系ラットおよび、免疫抑制ラットに皮下移植した。ラットの免疫を抑制するためには、コバルト60を線源としたガンマ線を6Gy全身照射したのち、 $2 \times 10^7$ 個の正常骨髄細胞を尾静脈より移植した。また、 $1 \times 10^6$ 個の癌細胞を拒絶したラットには、その後、未処置親癌細胞に対する移植抵抗性が誘導されたか否かを検討するため、各種移植量の親癌細胞を攻撃移植した。腫瘍形成の有無は、腫瘍移植後120日まで観察し判定した。なお、生存率



の統計学的有意差検定には $\chi^2$ 検定を適用した。

## 結果

FV-env遺伝子産物表現： もちいた癌細胞膜面上のFV-env遺伝子産物表現を検討したところ、ウイルス感染癌細胞およびFV-env遺伝子導入癌細胞ではgp70を表現していたが、未処置親癌細胞およびNeo遺伝子導入癌細胞には認められなかった（図2）。さらに、gag遺伝子産物であるp30の表現を調べたところ、p30はウイルス感染癌細胞にのみ認められ、他の細胞膜面上には認められなかった（図3）。

FV-env遺伝子導入癌細胞の腫瘍原性の検討： 未処置親癌細胞とFV-env遺伝子導入癌細胞、ウイルス感染癌細胞の腫瘍原性を検討するために、各種移植量の癌細胞を正常同系宿主に皮下移植した。その結果、未処置親癌細胞およびNeo遺伝子導入癌細胞は腫瘍原性は高く、 $1 \times 10^3$ 個の移植で半数以上が致死的増殖を示した。一方、FV-env遺伝子導入癌細胞の腫瘍原性は著しく低下しており、 $1 \times 10^5$ 個の移植ではともに全例で腫瘍が拒絶され、 $1 \times 10^6$ 個の移植に対してもFV-env遺伝子導入癌細胞では15例中13例で腫瘍は拒絶され、ウイルス感染癌細胞は5例全例が拒絶された（表1）。しかし、このように正常宿主では著しい腫瘍原性の低下を示した癌細胞も、放射線全身照射により免疫を抑制されたラットでは、ともに100%致死的増殖を示した（表2）。

さらに、正常ラットで増殖をみたFV-env遺伝子導入癌細胞と、免疫抑制ラットで増殖したFV-env遺伝子導入癌細胞の生体内でのgp70の表現を調べたところ、正常ラットで増殖をみたFV-env遺伝子導入癌細胞はその細胞表面にFV-env遺伝子産物を表現していな

いことが示唆された（図4）。しかし、生体内で遺伝子産物を表現していなかった癌細胞も、再び培養することにより遺伝子産物を表現するようになる（図5）。

**異物化癌細胞による抗腫瘍移植抵抗性の誘導：** ウイルス感染またはFV-env遺伝子導入によって異物化された癌細胞を拒絶した正常同系ラットに、それら腫瘍拒絶後未処置親癌細胞に対する抗腫瘍移植抵抗性が誘導され得るか否かを検討した。1x10<sup>6</sup>個の異物化癌細胞を拒絶したラットに、2週後各種移植量の未処置親癌細胞を攻撃移植した。表6に示すように、異物化癌細胞を拒絶したラットには、親癌細胞に対する強い移植抵抗性が誘導された。誘導された抗腫瘍移植抵抗性の程度は、FV-env遺伝子導入癌細胞を拒絶したラットと、ウイルス感染癌細胞を拒絶したラットで有意差は認められなかったものの、1x10<sup>4</sup>個の移植に対しては、FV-env遺伝子導入癌細胞を拒絶したラットの群の方が、強い移植抵抗性を示す傾向がみられた。

## 考察

癌細胞膜面を修飾することにより人工的に抗原性を上昇させ、宿主に、その癌細胞にたいする、移植抵抗性を誘導する試みがある<sup>3)-12)</sup>。初期の試みは、細胞非障害性ウイルスを癌細胞に人工感染させることにより、癌細胞の抗原性を上昇させるものであった<sup>3)4)</sup>。その癌細胞は同系正常宿主では拒絶され、癌細胞の異物化として報告されてきた。その後、ウイルスだけでなく、化学物質やバクテリア、レクチンの処理によっても癌細胞の抗原性を増強しうることが数多く報告されている。更に近年、マウス癌細胞に同種主要組織適合抗原H-2遺伝子を導入することによっても、異物化されることが報告されている<sup>12)</sup>。

これらの多くの試みのなかでも、宿主に対し強い免疫を誘導する異物化モデルとしては、フレンドウイルスによる異物化が知られている。フレンドウイルスはマウス由来のため正常ラットには自然感染せず、ラット癌細胞を異物化するためにそのウイルスを用いることは、より強い宿主免疫反応を誘導しうることが考えられる<sup>15)-20)</sup>。

そこで今回の実験で筆者は、ウイルス感染による病原性や内在性ウイルスの活性化を避けるため、フレンドウイルスのエンベロープ遺伝子を癌細胞に導入することにより異物化を試み、その癌細胞の抗原性と免疫原性を検討した。

FV-env遺伝子を導入された癌細胞は内在性ウイルスを活性化す

ることなく細胞膜面上にFV-env遺伝子産物を表現した<sup>21)</sup>。そのFV-env遺伝子産物表現量はウイルス感染癌細胞の約50%であったものの、正常宿主の免疫を介して拒絶されることがしめされた。この、新たに表現されたFV-env遺伝子産物が宿主免疫を誘導したことは、FV-env遺伝子導入癌細胞が免疫抑制ラットでは致死的に増殖すること、またNeo導入癌細胞では腫瘍原性の低下が見られなかったことから考えられる。また、このときWKA/HokラットのMHCクラスI抗原の表現に差はみられなかった(Data not shown)<sup>22) 23)</sup>。FV-env遺伝子導入癌細胞のうち、正常同系ラットで増殖を示したものは、生体内で増殖状態でFV-env遺伝子産物を表現していなかった。しかし、選択抗生剤の有無に関わらずin vitroで数代継代培養後、再びFV-env遺伝子産物を表現した。このことは、宿主に導入された遺伝子がなんらかの原因で欠失した可能性または、その遺伝子表現が抑制されていた可能性を示唆している<sup>24) 25)</sup>。このようなウイルス感染癌細胞では見られない、in vitro とin vivoでの遺伝子表現の安定性の違いの機序は不明である。

いずれにせよ、FV-env遺伝子導入癌細胞が正常宿主で拒絶されるという結果から、FV-env遺伝子産物が宿主において異物として認識されうることを示唆している<sup>15) -19)</sup>。

また、生癌細胞の免疫原性を比較した場合、FV-env遺伝子導入癌細胞のほうがウイルス感染癌細胞のそれよりも強い傾向が見られた。ウイルス感染癌細胞の免疫誘導が低い傾向になった理由の、詳細はなお不明であるものの、生体内でのサイトカインなどの誘導能の違いのほか<sup>26) 27)</sup>、山口及び細川らの、腫瘍関連抗原

(TAA)に対する免疫を誘導する為には適当量のウイルス抗原(VAA)表現が必要で、癌細胞膜面上の過度のVAA表現は、TAAに対する免疫を誘導するどころか、逆に低下させる場合があるという報告が、今回の実験結果にたいする一つの解釈として考えられる<sup>28) 29)</sup>。すなわち、過度のVAAがTAAとともに存在することにより、免疫誘導に対し競合的に働き、その結果、TAAにたいする免疫が低下したと考えられる<sup>29)</sup>。またそれとは逆に、FV-env遺伝子産物が直接主要拒絶に十分なほど表現されていなくても、効果的にTAAにたいする免疫を誘導しうる可能性もある。しかし、その際には、抗原量だけでなく、宿主にたいして効率的な免疫を誘導する抗原の組み合わせが重要となってくると思われる。このことは、筆者がおこなった別の実験系で、マウスの腫瘍にFV-env遺伝子を導入した場合、腫瘍原性の劇的な低下は見られなかったものの、X線照射により不活化して免疫原として用いた場合TAAにたいする強い免疫を誘導したことからも考えられる(Data not shown)。また、今回の実験では遺伝子を導入した後、未クローニングのままheterogeneousな細胞集団を用いたが、板谷らの示したように、クローニングすることにより、さらに免疫原性の高いクローンが得られることも考えられる<sup>30)</sup>。

いずれにせよ、TAAに対する免疫を誘導するための特異的活動免疫を考えた場合、病原性を有するウイルス粒子感染癌細胞を用いるよりも、FV-env遺伝子導入癌細胞を用いた方がより臨床応用可能なモデルになりうることに注目したい<sup>31)</sup>。しかしながら、前臨床的な動物治療実験をおこなうためには、宿主に対する適切な遺伝子を選ぶ必要があると考えられる。

## 結語

1. FV-env遺伝子導入癌細胞は、ウイルス感染癌細胞と同様その細胞膜面上にウイルス抗原を表現した。

2. ウイルス抗原を表現した癌細胞は、異物化され、正常宿主では自然退縮した。

3. FV-env遺伝子を導入され、異物化した癌細胞を拒絶した宿主には、未処置親癌細胞に対する特異的移植抵抗性が誘導された。

4. 癌細胞に遺伝子を導入することによる病原性は認められず、臨床応用を前提とした動物治療実験の可能性が示唆された。

## 文献

1. Klein, G., and Klein, E.

Immune surveillance against virus-induced tumors and non-rejectability of spontaneous tumor : contrasting consequences of host versus tumor evolution.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:2121-2125, 1977.

2. Klein, G., and Klein, E.

Rejectability of virus-induced tumors and non-rejectability of spontaneous tumors : a lesson in contrast.

Transplant. Proc., 11:1095-1104, 1977.

3. Kobayashi, H., Sendo, F., Shirai, T., Kaji, H., Kodama, T., and Saito, H.

Modification in growth of transplantable rat tumors exposed to Friend virus. J. Natl. Cancer Inst., 42:413-419, 1969.

4. Kuzumaki, N., Fenyó, E.M., Giovanella, B., and Klein, G.

Increased immunogenicity of low-antigenic rat tumors after superinfection with endogenous murine C-type



virus in nude mice. Int.J.Cancer, 21:62-66,1978.

5.Lindenmann, J., and Klein, P. A.

Viral oncolysis. Increased immunogenicity of host cell antigen associated with influenza virus.

J. Exp. Med., 126:93-108,1967.

6.Shimizu, Y., Fujiwara, H., Ueda, S., Wakamiya, N., Kato, S., and Hamaoka, T.

The augmentation of tumor-specific immunity by virus help. II. Enhanced induction of cytotoxic T lymphocyte and antibody response to tumor antigen by vaccinia virus reactive helper T cells.

Eur. J. Immunol., 14:839-843,1984.

7.Lachimann, P.J., and Sikora, K.

Coupling PPD to tumor cells enhances their antigenicity in BCG-primed mice.

Nature (Lond.), 271:463-464,1978.

8.Currie, G.A.,and Bagshawe, K.D.

Tumor specific immunogenicity of methlcolanthrene-induced sarcoma cells after incubation in neuramidase.

Br.J.Cancer,23:141-149,1969.

9. Bekesi, J. G., Saint-arneault, G., and Holland, J. E.  
Increase of leukemia L1210 immunogenicity by Vibrio  
cholerae neuramidase treatment.  
Cancer Res., 31:2130-2132, 1971.
10. Hoegen, P. V., Weber, E. and Schirmacher, V.  
Modification of tumor cells by a low dose of Newcastle 7  
Disease virus. Augmentation of the tumor-specific T  
cell response in the absence of an anti-viral response.  
Eur. J. Immunol., 18:1159-1166, 1988.
11. Hogen, P. V., Weber, E., and Schirmacher, V.  
Modification of tumor cells by a low dose of Newcastle  
disease virus. II. Augmented tumor-specific T cell  
response as a result of CD4+ and CD8+ immune T cell co-  
operation. H.  
Cancer Immunol. Immunother., 28:22-28, 1989.
12. Itaya, T., Yamagiwa, S., Okada, F., Oikawa, T.,  
Kuzumaki, N., Takeichi, N., Hosokawa, M., and Kobayashi,  
H.  
Xenogenization of mouse lung carcinoma (3LL) by  
transfection with an allogeneic class I major histo-  
compatibility complex gene (H-2Ld).  
Cancer Res., 47:3136-3140, 1987.

13. Sugiura, C., Itaya, T., Kondho, N., Oikawa, T.,  
Kuzumaki, N. Takeichi, N., Hosokawa, M., and Kobayashi,  
H.  
Xenogenization of tumor cells by transfection with  
plasmid containing env gene of Friend leukemia virus.  
Jpn. J. Cancer Res. (GANN), 79:1259-1263,1988.
14. Van der Eb, A., and Graham, F. L.  
Assay of transforming activity of tumor virus DNA.  
Methods Enzymol., 65:826-839,1980.
15. Plata, F., Langlade-Demoyen, P., Abstado, J.P. Berbar,  
T., and Kourisky, P.  
Retrovirus antigens recognized by cytolytic T  
lymphocytes activate tumor rejection in vivo. Cell,48:  
231-240,1987.
16. Sobis, H., VanHove, L., Heremans, H., DeLey, M.,  
Billiau, A., and Vandeputte, M.  
Induction of immune reaction against rat embrional  
carcinoma by activation of viral genome. Int.J.Cancer,  
26:93-99,1980.
18. Taniyama, T., and Holden, H. T.

- In vitro induction of T-lymphocyte-mediated cytotoxicity by infectious murine type c onconaviruses.  
J.Exp.Med., 150:1367-1382,1979.
- 19.Krieg, A., Gause, W. C., Gourley, M. F., and Steinberg, A. D.  
A role for endogeneous retroviral sequences in the regulation of lymphocyte activation.  
J. Immunol., 143:2448-2451,1989.
- 20.Hunsmann, G., Schneider, J., and Schulz, A.  
Immuno prevention of Friend virus-induced erythro-leukemia by vaccination with viral envelope glyco-protein complexes.  
Virol., 113:602-612,1981.
- 21.Jacks, T., Madhani, H. D., Masiarz, F. R., and Varmus, H. F.  
Signals for ribosomal frameshifting in the rous sarcoma virus gag-pol region.  
Cell, 55:447-458,1988.
- 22.Gomand, E., Henin, Y., Colombani, M.J., and levy, J.P.  
Immune response gene control T killer cell response against Molony tumor antigen cytotoxicity regulating

reaction against the best available H-2 + viral antigen association. J.Exp.Med.,151:1468-1476,1980.

23.Eager, K. B., Hackett, C. J., Gerhard, W. U., Bennink, J., Eisenlohr, L. C., yewdell, J., and Ricciardi, R. P. Murine cell lines stably expressing the influenza virus hemagglutinin gene introduced by a recombinant retrovirus vector are constitutive targets for MHC class I- and class II- restricted T lymphocytes.

J. Immunol., 143:2328-2335,1989

24.Vasmel, W. L. E., Sijts, E. J. A. M., Leupers, C. J. M., Matthews, E. A., and Melief, C. J. M. Primary virus-induced lymphomas evade T cell immunity by failure to express viral antigens.

J. Exp. Med., 169:1233-1254,1989.

25.Zbar, B., Terata, N., Nagai, A., Tanio, Y., and Hovis, J.

Selection and rejection of retrovirus-expressing tumor cells from a heterogeneous murine leukemia virus-infected cell population

Cancer Res., 44:4622-4629,1984.

26.Kern, D., Peace, D. J., Klarent, J. P., Cheever, M. A.,

and Greenberg, P. D.

IL-4 is an endogenous T cell growth factor during the immune response to a syngeneic retrovirus-induced tumor. J. Immunol., 141:2814-2830,1988.

27. Lopez-Cepero, M., Specter, S., Matteucci, D., Friedman, H., and Bendinelli, M.

Altered interleukin production during friend leukemia virus infection.

Proc. Soci. Exp. Biol. Med., 188:353-363,1988.

28. Hosokawa, M., Okayasu, T., Ikeda, K., Katoh, H., Suzuki, Y., and Kobayashi, H.

Alteration of immunogenicity of xenogenized tumor cells in syngeneic rats by the immune response to virus-associated antigens produced in immunizing cells.

Cancer Res., 43:2301-2305,1983.

29. Yamaguchi, H., Moriuchi, T., Hosokawa, M., and Kobayashi, H.

Increased or decreased immunogenicity of tumor-associated antigen according to the amount of virus-associated antigen in rat tumor cells infected with Friend virus.

Cancer Immunol. Immunother., 12:119-123,1982.

30. Fearon, E. R., Itaya, T., Hunt, B., Vogelstein, B., and Frost, P.

Induction in a murine tumor of immunogenic tumor variants by transfection with a foreign gene.

Cancer Res., 48:2975-2980, 1988.

31. Heicappell, R., Schirmachher, V., Hoegen, P. V., Ahlert, T., and Appelhans, B.

Prevention of metastatic spread by postoperative immunotherapy with virally modified autologous tumor cells.

I. Parameters for optimal therapeutic effects. 19.

Int. J. Cancer, 37:569-577, 1986.

## 謝 辞

稿を終わるにあたり、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました、福田博教授に心より感謝致します。また、本研究の遂行にあたり、かぎりない御教示と御援助をいただいた北海道大学医学部癌研究設病理部門の小林博教授、細川真澄男助教授、武市紀年助教授はじめ教室の皆様には厚く御礼申し上げます。



図表

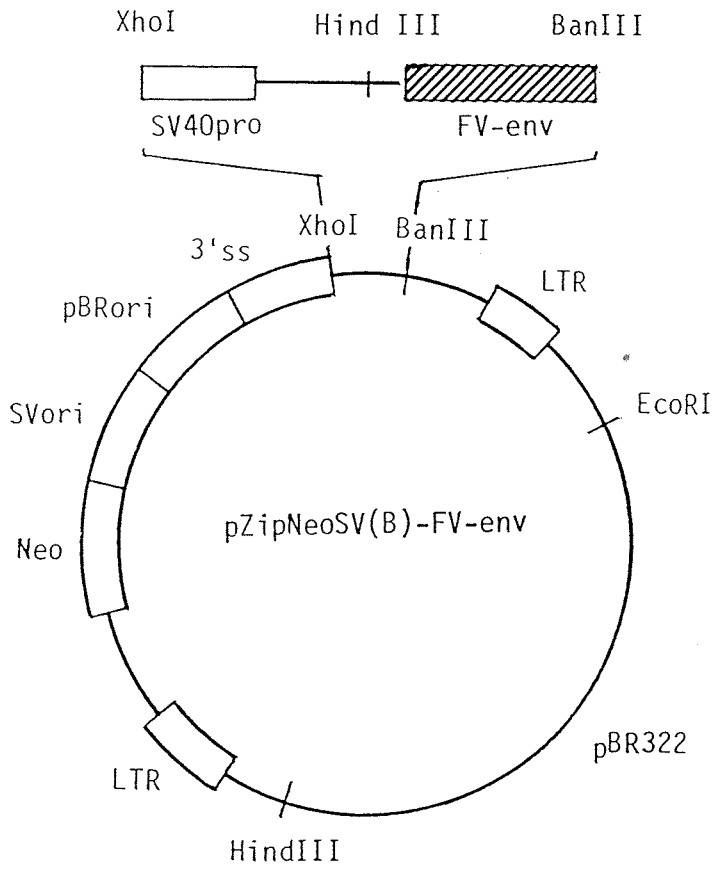


図1 癌細胞に導入したFV-env遺伝子の構造

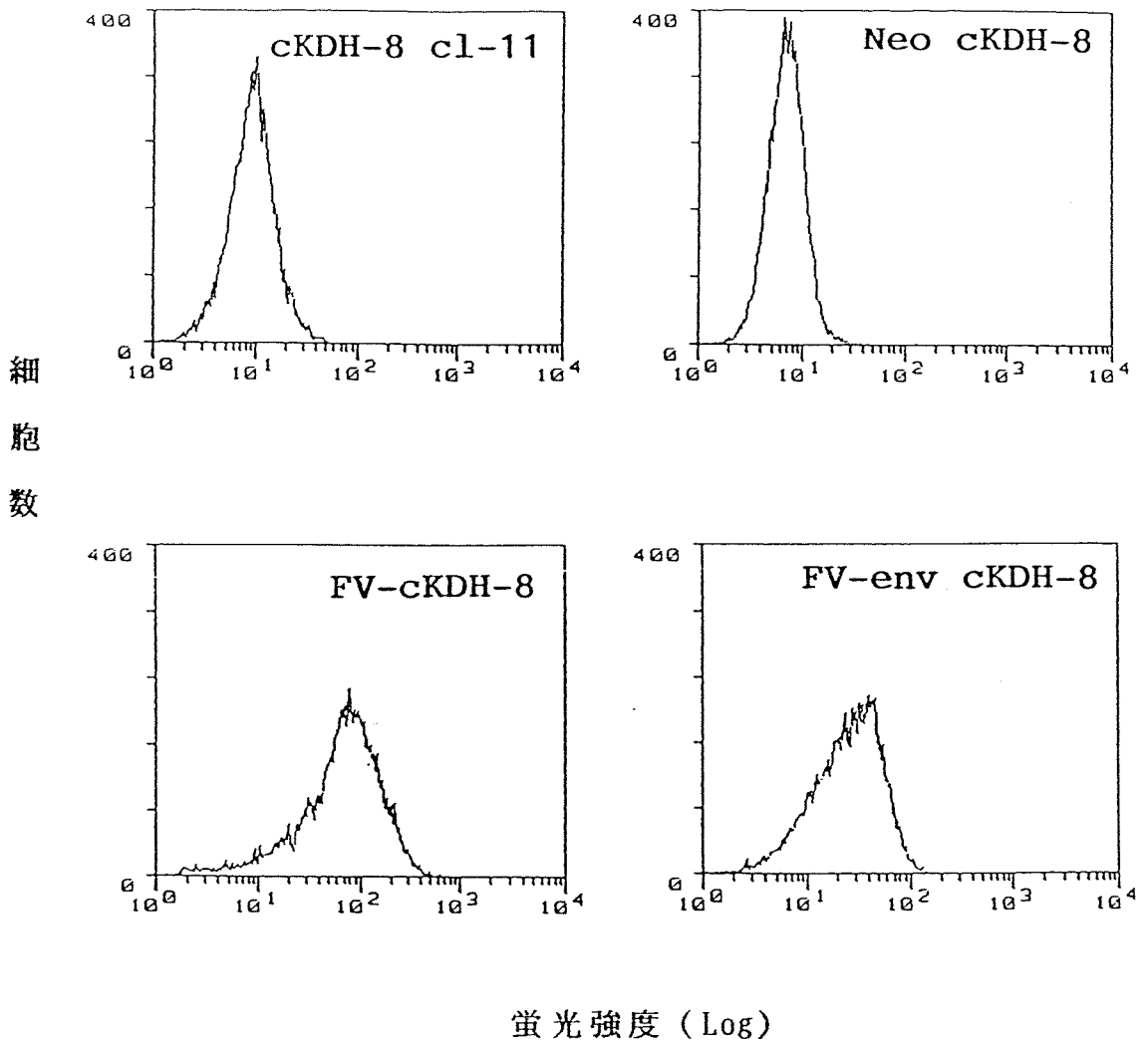
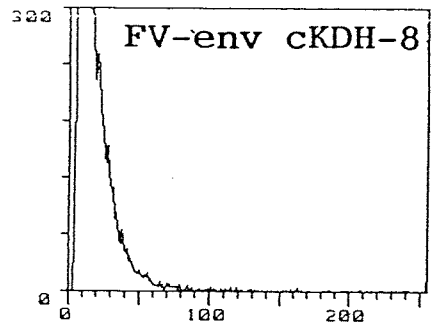
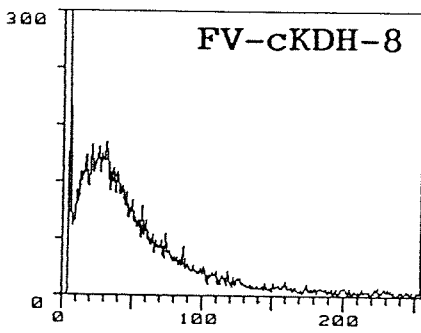
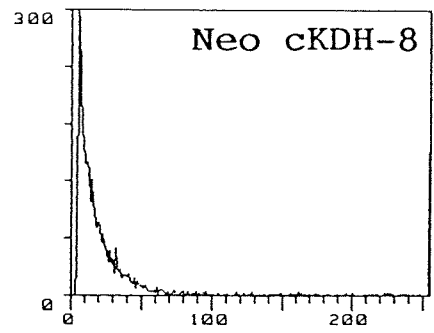
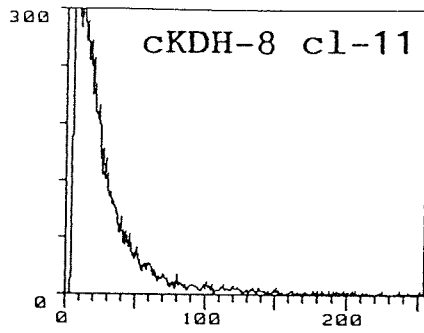


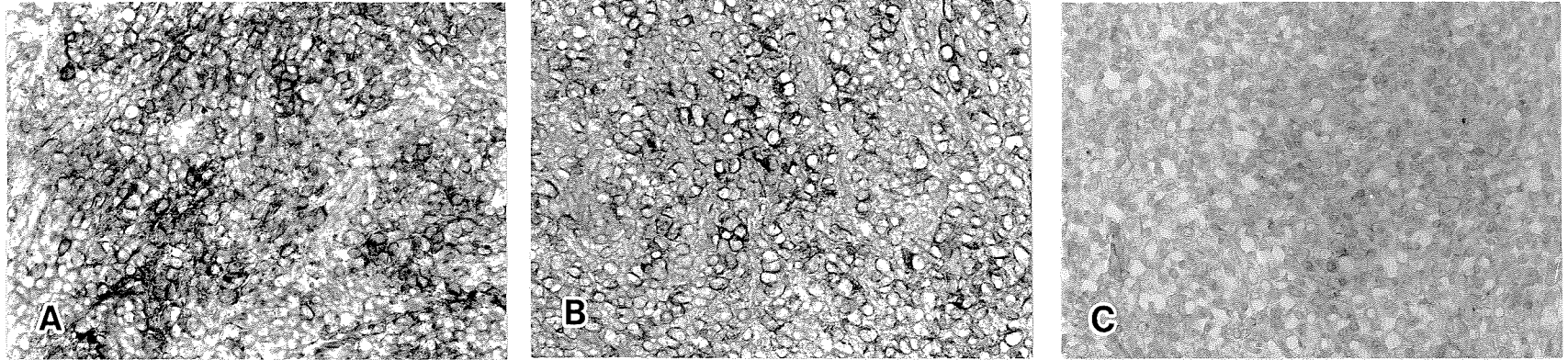
図2 各種癌細胞膜面上のFV-env遺伝子産物gp70の表現

細胞  
数



蛍光強度 (Linear)

図3 各種癌細胞膜面上のgag遺伝子産物p30の表現



- A : 免疫抑制ラットで増殖した、FV-env遺伝子導入癌細胞。  
B : 免疫抑制ラットで増殖した、ウイルス感染癌細胞。  
C : 正常同系宿主で増殖した、FV-env遺伝子導入癌細胞。

図 4 正常および免疫抑制ラットで増殖したFV-env遺伝子導入癌細胞の、免疫組織化学染色によるFV-env遺伝子産物表現の変化

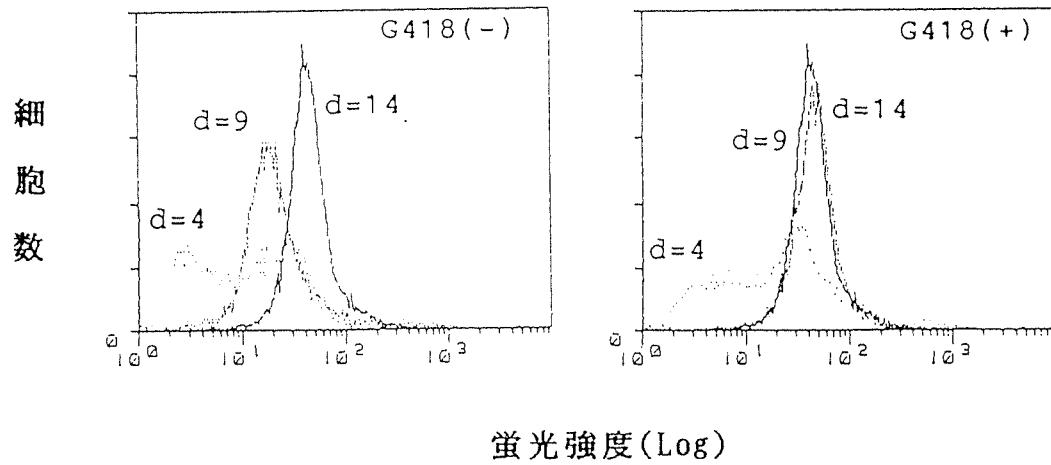


図5 正常ラットで増殖したFV-env遺伝子導入癌細胞の、  
in vitro培養下でのFV-env遺伝子産物表現の経時的  
変化

表1 正常同系宿主での、FV-env遺伝子導入癌細胞と  
ウイルス感染癌細胞の腫瘍原性

Tumor cells used	No. of rats with tumor / No. of rats used					Tumorigenicity LTD <sub>50</sub> <sup>a)</sup>
	----- No. of tumor cells s.c. challenged					
	1x10 <sup>3</sup>	5x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>6</sup>	
cKDH-8 c1-11	4/5	7/10	8/9	5/5	5/5	<10 <sup>3</sup>
Neo cKDH-8	3/5	NT <sup>b)</sup>	4/5	5/5	5/5	<10 <sup>3</sup>
FV-env cKDH-8	NT	NT	NT	NT	2/15 <sup>c)</sup>	>10 <sup>6</sup>
FV-cKDH-8	NT	NT	NT	NT	0/10 <sup>c)</sup>	>10 <sup>6</sup>

a) 同系正常宿主の50%腫瘍死細胞数。

b) NT : Not tested.

c) p<0.01

表2 X線照射免疫抑制ラットでのFV-env遺伝子導入癌細胞と  
ウイルス感染癌細胞の腫瘍原性

Rats treated with	Tumor cells <sup>a)</sup>	No. of rats died / No. of rats used
Irradiation <sup>b)</sup>	FV-env cKDH-8	8/8
	FV-cKDH-8	8/8
None	FV-env cKDH-8	0/6
	FV-cKDH-8	0/6

a)  $1 \times 10^6$ 個の腫瘍細胞を皮下移植した。

b) 腫瘍移植1日前に、 $^{60}\text{Co}$ による6Gyの全身照射をおこなった。



表3 正常同系宿主における、FV-env遺伝子導入癌細胞  
とウイルス感染癌細胞の、未処置親癌細胞に対す  
る移植抵抗性の誘導。

Rats immunized with <sup>a)</sup>	Lethal growth of tumor cells (%) No. of rats died / No. of rats used				
	Parental cKDH-8 cl-11 (%)				Unrelated KMT-17
	No. of cells inoculated s.c.				No of cells inoculated s.c.
	1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>6</sup>
None	4/5(80)	8/10(80)	5/5(100)	5/5(100)	10/10(100)
FV-env cKDH-8	NT <sup>b)</sup>	0/8(0) <sup>c)</sup>	3/8(38)	2/8(25) <sup>d)</sup>	10/10(100)
FV-cKDH-8	NT	3/5(60)	2/5(40)	3/10(30) <sup>d)</sup>	10/10(100)

a) 1x10<sup>6</sup>個の異物化癌細胞を皮下移植し、その2週後腫瘍を拒絶したラットに、各種移植量の親癌細胞を攻撃移植した。

b) NT : Not tested.

c) p<0.01

d) p<0.05