



Title	新たに開発された増殖型レトロウイルスシステムを用いた膵癌に対するプロドラッグ活性化遺伝子治療 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	猪子, 和穂
Description	配架番号 : 2417
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13252号
Issue Date	2018-06-29
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71241
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuho_Inoko_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 猪子 和穂

学位論文題名

新たに開発された増殖型レトロウイルスシステムを用いた
膵癌に対するプロドラッグ活性化遺伝子治療
(Prodrug-activator gene therapy mediated by newly developed retroviral replicating
vector system for pancreatic cancer)

【背景と目的】膵癌は最も予後不良な難治癌の一つであり、その発生率や死亡率は増加している。手術、化学療法、放射線療法といった既存の治療法の効果は限られており、新たな治療戦略の開発は急務である。一方、ウイルスを用いた遺伝子治療は多くの癌腫で研究が行われ、膵癌においても様々な臨床試験が行われている。しかし、高い転移能、増殖能を有する膵癌に対していかに効果的に遺伝子導入を達成するかが課題とされている。そこで、膵癌に対する新たな遺伝子治療の開発に当たり、われわれは増殖型レトロウイルスベクター(Retroviral replicating vector: RRV)を用いることとした。RRV はマウス白血病ウイルスを由来とし、自立的な増殖力を保持し高い感染力、遺伝子導入効率を示すが、核移行シグナルを持たないため分裂細胞にのみ感染する。従って、活発に分裂する癌細胞では感染が成立し、大半が静止期にある正常組織の細胞には感染しないため、腫瘍選択的な増殖が達成される。さらに、正常免疫下ではレトロウイルスは先天性宿主因子や獲得免疫により増殖が抑制されるが、腫瘍微小環境下ではこれら免疫機構が抑制されていることも腫瘍選択性を高めている。また、導入する治療遺伝子としては酵母由来シトシン脱アミノ化酵素(yeast cytosine deaminase: yCD)を選択したが、これはプロドラッグである抗真菌薬 5-Fluorocytosine(5-FC)を抗癌剤 5-Fluorouracil(5-FU)に変換することで優れた抗腫瘍効果を発揮することができる。米国では再発脳腫瘍患者を対象とした本遺伝子治療システムの第 I 相臨床試験が行われ、その安全性、有効性が証明されたため、現在は国際的な第 III 相試験が展開されている。本研究では、このプロドラッグ活性化システムの膵癌に対する新規遺伝子治療法としての有効性を前臨床試験として評価することを目的とした。

【材料と方法】本研究では 2 種類の RRV、すなわち治療遺伝子として yCD 遺伝子を有する Toca 511 と、レポーター遺伝子として GFP 遺伝子を有する RRV-GFP を用いた。まず、*in vitro* で膵癌細胞株(ヒト膵癌細胞株: MIA PaCa-2, BxPC-3, PANC-1, SUIT-2, マウス膵癌細胞株: Pan02)における RRV-GFP の感染効率、増殖能と遺伝子導入効率をフローサイトメトリーおよび定量 PCR により評価した。さらに、膵癌臨床検体を用いて樹立した初代培養細胞集団

においても RRV-GFP の感染能を評価した。次に、Toca 511 により yCD 遺伝子を導入した膵癌細胞株(MIAPaCa-2, Pan02)における 5-FC 投与後の細胞毒性を MTS アッセイで評価した。続いて *in vivo* で腫瘍内における RRV-GFP の感染・増殖能を、2 種類の膵癌皮下腫瘍モデル、すなわちヒト膵癌細胞株(MIAPaCa-2)を BALB/c-nu/nu マウスに移植した異種移植免疫不全モデル、マウス膵癌細胞株(Pan02)を C57BL/6 マウスに移植した同種移植正常免疫モデルにおいてフローサイトメトリーにより評価した。次いで、これら皮下腫瘍モデルを用いて、Toca 511/5-FC(500mg/kg/day)療法の抗腫瘍効果を評価した。また、安全性試験として、治療後のマウスの正常組織(食道、心臓、肺、肝臓、腎臓、卵巣、膵臓、脾臓、直腸、骨髄)を摘出し、Toca 511 の生体内分布を定量 PCR により評価した。さらに、ルシフェラーゼ遺伝子を導入した MIAPaCa-2 を膵に移植した同所移植モデルにおいても RRV-GFP の腫瘍内複製動態を評価し、Toca-511/5-FC 療法の抗腫瘍効果を *in vivo* imaging system (IVIS) で評価した。

【結果】*in vitro* 実験では、5%の細胞に RRV-GFP を感染させた場合、全ての膵癌細胞株において GFP 陽性細胞率は速やかに上昇し、2~3 週間以内に約 80~90%と高レベルに到達した。RRV コピー数は、MIAPaCa-2 では初期にピークを伴って上昇、Pan02 では対数関数的に上昇し、いずれもプラトーに達した。また、膵癌初代培養細胞においても RRV-GFP は感染能を示した。次に、Toca 511 を感染させた膵癌細胞株における細胞毒性試験では、0.1~1.0mM の 5-FC 添加により約 90%の細胞活性低下が示された。*in vivo* 実験では異種移植免疫不全モデル、および同種移植正常免疫モデル、いずれにおいても RRV-GFP 感染率 1%の膵癌細胞を皮下移植すると、GFP 陽性細胞率は第 7 日目で約 60%、第 14 日目で約 70%に達した。また、Toca 511 感染率 1%の膵癌細胞を皮下移植し、第 15 日目より 5-FC 連日投与を行った治療実験では、免疫不全モデル、正常免疫モデルいずれにおいても治療群ではほとんどの皮下腫瘍が完全消退した。さらに、治療後の正常組織における Toca 511 の分布については、免疫不全モデルでは脾臓、骨髄に有意な RRV コピーが検出されたが、正常免疫モデルでは全ての組織において極めて低いレベルであった。同所移植モデルでは、RRV-GFP 感染率 1%の膵癌細胞を移植後、第 14 日目で GFP 陽性細胞は約 60%に達し、また、Toca 511 感染率 1%の膵癌細胞を移植後、第 14 日目より 5-FC 投与を行った治療実験では、コントロール群に比較して治療群の Bioluminescent signals は有意に低値であった。

【考察】RRV は *in vitro* の膵癌細胞において速やかな感染・増殖能を示し、安定した遺伝子導入を達成することができ、また、*in vivo* の膵癌腫瘍細胞内においても生体の免疫機能の有無によらず感染・増殖することが示された。Toca 511 を用いた治療実験では、yCD を効率的に膵癌細胞に導入することで、5-FC の投与により優れた抗腫瘍効果が得られた。さらに、正常免疫環境下では治療後の正常組織から RRV はほとんど検出されず、本治療の腫瘍選択性と安全性が示された。

【結論】RRV は膵癌細胞に極めて効率的にプロドラッグ活性化酵素遺伝子(yCD)を導入することが可能であり、プロドラッグ(5-FC)投与により高い抗腫瘍効果を発揮することが示された。この結果を受け、現在、米国では局所進行・転移性膵癌患者を対象とした第 I 相試験(NCT02576665)が進行中である。