



Title	増殖型レトロウイルスシステムを用いた肺癌に対するプロドラッグ活性化遺伝子治療に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	櫛谷, 洋樹
Description	配架番号 : 2797
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15571号
Issue Date	2023-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90402
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KUSHIYA_Hiroki_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 櫛谷洋樹

学位論文題名

増殖型レトロウイルスシステムを用いた
肺癌に対するプロドラッグ活性化遺伝子治療に関する研究
(Strategy for prodrug activator gene therapy of lung cancer
by retroviral replicating vector)

【背景と目的】

肺癌は世界の癌関連死の中で最も多い癌腫とされており、我が国の統計においても癌による死因の第1位となっている。手術による切除が第一選択となるが、遠隔転移を伴う症例や多臓器浸潤を来した症例では、集学的治療が必要となる。しかし、進行肺癌では局所浸潤や遠隔転移による症状に伴い全身状態不良となり、抗癌剤治療が適応にならないことも多い。近年、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬の登場により肺癌治療の選択肢は増えたが、生存期間中央値は2年前後となっており効果は十分ではない。したがって、副作用の少ない新規治療の開発は急務である。そこで私は増殖型レトロウイルスベクター (Retroviral replicating vector: RRV) を用いた癌遺伝子治療に着目した。レトロウイルスベクターは多くの遺伝子導入に利用されているが、その特徴としてウイルス構成配列は一本鎖RNAであり宿主細胞内で二本鎖DNAに逆転写され、宿主細胞のDNAに組み込まれるため、安定した遺伝子発現が可能となる。しかし、従来より使用されてきた非増殖型レトロウイルスベクターは自己増殖能を欠き、遺伝子導入効率が低いという弱点があった。その点を補うため自己増殖能を持つRRVが開発され多くの癌種でその有効性が示されてきた。RRVはガンマレトロウイルスに属するMolonyマウス白血病ウイルスを遺伝子改変し開発されたもので、レトロウイルスの基本構造を維持し、自己増殖力を有することが大きな特徴である。したがって、従来の増殖能欠損型レトロウイルスベクターと異なり、宿主細胞への高い感染力、遺伝子導入効率を有している。また、レトロウイルスは細胞溶解性を持たず、一度感染した宿主細胞は恒久的な遺伝子発現細胞となる。導入する治療遺伝子としては酵母菌由来のシトシン脱アミノ化酵素 (yeast cytosine deaminase: yCD) が組み込まれている。yCDは宿主細胞内で哺乳類動物に無毒なフルオロシトシン (5-fluorocytosine: 5-FC) を抗癌剤であるフルオロウラシル (5-fluorouracil: 5-FU) に変換する酵素である。5-FUは主要な化学療法剤の一つであるが全身投与が原則であり、骨髄抑制などの重篤な副作用を引き起こす。RRVを用いたプロドラッグ活性化遺伝子治療の利点は、無毒な5-FCを全身投与するとyCDを発現する癌細胞内でのみ5-FCが5-FUに変換され、全身性の副作用をきたすことが少ないことである。そこで本研究では上述のRRVを用いたプロドラッグ活性化遺伝子治療の肺癌に対する有効性を前臨床試験として評価することとした。

【材料と方法】

RRVの感染能、遺伝子導入効率、治療効果を評価するため、ヒト肺癌細胞株である

A549、H226、SBC-3およびマウス肺癌細胞株であるEx-3LLを用いた。また、yCD遺伝子を有しているRRV (Toca511)、GFP遺伝子を有しているRRV (RRV-GFP)を使用した。

*In vitro*でのRRVの感染効率、遺伝子導入効率を評価するためRRV-GFPをmultiplicity of infection (MOI)=0.01で投与しGFPの発現をフローサイトメトリーで解析した。また解析の際に一部の細胞から genomic DNA (gDNA)を抽出しqPCR (TaqManプローブ法)を用い各サンプルのRRVコピー数を評価した。また、*in vitro*での細胞毒性は未感染細胞、RRV-GFP感染細胞、Toca511感染細胞の3群を用いMTS assayで評価した。続いて*in vivo*でのRRV感染能、治療効果を評価するため肺癌皮下腫瘍モデルを作成した。A549異種移植モデル、Ex-3LL同種移植モデルを用い皮下腫瘍内でのRRV感染能をフローサイトメトリー解析で評価し、5-FCの治療効果は腫瘍縮小率で評価した。続いて、前臨床モデルとしてマウスの胸腔内に肺癌細胞を投与し胸膜播種モデルを作成し、マウスの胸腔内にRRVを直接投与し感染能を検討した。さらに、胸膜播種モデルに対する治療効果を検討するため、5-FC投与群とPBS投与群で生存期間を比較した。安全性の評価として胸膜播種モデルにおけるToca511の生体内分布を全身臓器のgenomic DNAを抽出しqPCR法で検討した。

【結果】

*In vitro*においてRRVは肺癌細胞への高い感染能と効果的な遺伝子導入効率を示した。また、5-FCの投与によりToca511感染細胞では優れた殺細胞効果が得られた。*in vivo*においてもRRVは皮下腫瘍内で高い感染能を示し、Toca511に感染させた皮下腫瘍モデルではプロドラッグである5-FCの投与により著明な抗腫瘍効果が得られた。前臨床試験モデルとして作成した胸膜播種モデルにおいて、RRVは胸腔内直接投与により肺癌胸膜播種細胞に感染した。また、5-FCの投与により胸膜播種モデルにおいてもコントロール群と比較し有意に生存期間を延長させた。安全性の評価としてRRVの生体分布を評価したが、腫瘍細胞を除き全ての検討した生体組織においてRRVコピー数は低レベルに抑制されていた。

【考察】

In vitro、および*in vivo*においてRRVは高い感染能を示し、RRVを用いたプロドラッグ活性化システムにより優れた殺細胞効果を示した。*In vivo*の同種移植モデルにおいては、感染効率は異種移植モデルより低かったが、5-FCの投与により腫瘍の完全消退が得られた個体もあった。これは5-FUの殺細胞効果に加え、Bystander効果や、プロドラッグ活性化システムにより惹起された獲得免疫による抗腫瘍効果も加わった結果と考えられる。胸膜播種モデルにおいては実臨床に則し、胸腔内経路でRRVの投与を行ったが、優れた感染能を示した。また、腫瘍細胞を除く各組織でのRRV生体分布も低レベルに抑えられており、臨床試験に向けて安全性が示唆される結果となった。

【結論】

本研究では、Toca511、5-FCを用いたプロドラッグ活性化遺伝子治療の肺癌に対する有効性と安全性が示唆された。また、肺癌胸膜播種モデルに対するウイルス投与経路を確立し、プロドラッグ活性化遺伝子治療の有用性を示し臨床応用への重要な知見の一つとなった。