



# Gene Therapy for Bladder Cancer Using Adenoviral Vector

和田, 義孝

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-01-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2430

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002430>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 7 1 】

氏 名・(本 籍) 和田 義孝 (大阪府)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1393号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成14年1月31日

【学位論文題目】

**Gene Therapy for Bladder Cancer Using Adenoviral Vector**

(アデノウイルスベクターを用いた膀胱腫瘍  
に対する遺伝子治療)

審 査 委 員

主査 教授 守殿 貞夫

教授 松尾 雅文

教授 熊谷 俊一

## 【緒言】

膀胱腫瘍は、泌尿器科領域において高頻度にみられ、再発しやすい悪性疾患である。その中の表在性膀胱腫瘍に対しては、経尿道的腫瘍切除術および、症例によってはその再発予防を目的として細胞毒性を有する薬剤を膀胱内に注入する膀胱内薬剤注入療法が行われる。しかしこのような治療を行っても、しばしば膀胱腫瘍は再発を繰り返す。今日、BCG を用いた膀胱内注入療法が最も有効とされ、その主流となっているが、有効率は38%から68%で、30%以上の患者には無効である。

近年、分子生物学及び遺伝工学の進歩により多くの癌抑制遺伝子が同定され、その機能も判明しつつある。中でも代表的な癌抑制遺伝子である p53 は、その変異が発癌の引き金になる一方で、その過剰発現により腫瘍の増殖を抑制することも可能では、との期待が高まり、化学療法に取って代わる新しい治療戦略の確立が望まれる。既に P53 の変異が膀胱腫瘍の発癌に関与を持つことや、再発や生存率の予測にも応用できることが分かってきた。そこで今回筆者らは、膀胱上皮や残存膀胱腫瘍に野生型 p53 蛋白を過剰発現させることにより病状の進行を抑止、あるいは化学療法後の組織修復率を改善するという仮説の基に、遺伝子組み替え p53 アデノウイルスベクターと、ヒトおよびマウス膀胱腫瘍細胞株を用いて、p53 癌抑制遺伝子の臨床応用の基礎的検討として癌抑制遺伝子 p53 アデノウイルスベクターの腫瘍抑制効果を検討した。

## 【方法及び結果】

- (1) 使用した細胞株は、ヒト膀胱腫瘍細胞株 KU-1、HTB9 及びマウス移行上皮癌細胞株 MBT-2。遺伝子組み換えアデノウイルスベクターは、改良型アデノウイルス (Ad5) の E1 領域を除去した部位に CMV プロモーター、p53 cDNA、及び SV40 遺伝子を組み込んで作製した (Ad5CMV-p53)。また、コントロールベクターとして、p53 cDNA 及び SV40 を含まないアデノウイルスベクター (Ad5CMV-PA) も用いた。
- (2) ウイルス感染において、感染効率の高い濃度 (各細胞株 1 個あたりの適切なウイルス量) を決定するために、アデノウイルスベクターに大腸菌の  $\beta$  ガラクトシダーゼ遺伝子を組み込んだ Ad5CMV- $\beta$ -gal を用いて、種々の濃度において HTB9、KU-1、MBT-2 のそれぞれに 24 時間曝露させ、その後、X-gal 溶液を用いた X-gal 染色を行い、青染した細胞数を計測することで、このアデノウイルスベクターの各細胞株に対

する最適濃度を決定した。その結果は図の如く、HTB9、KU-1、MBT-2 のそれぞれにおいて、50、20、20 PFUs/cell のアデノウイルスにより、95%、95%、90%の青染細胞を認めた。

- (3) In Vitro における細胞増殖抑制効果を評価するため、6 穴の培養皿に各穴 1 万個の細胞を蒔き、24 時間後、先程決定した最適濃度で各ウイルスを曝露させ、2 日おきにトリパンブルーにより生細胞を計測したが、治療群においては対照群に比し、HTB9、KU-1、MBT-2 のそれぞれで、各々 74%、77%、62%の増殖抑制効果を認めた。また、同時に TdT 染色により、これらの細胞のアポトーシスを起こした割合を評価した。その結果、MBT-2 細胞株において約 30%、HTB9 において約 35%、KU-1 において約 50%にアポトーシスが確認された。この結果は、対照群の Ad5CMV-PA や PBS を曝露させた群におけるアポトーシス確認の割合と比較して有意に高かった。
- (4) In Vivo における抗腫瘍効果を評価するために、HTB9、KU-1、MBT-2 の各細胞液 ( $1 \times 10^6$  個) をヌードマウスの皮下に移植し、推定腫瘍体積が約 300mg に達した時点で、治療群として  $1 \times 10^6$  PFUs の Ad5CMV-p53 を、対照群として同量の Ad5CMV-PA、PBS を腫瘍に局所投与し (4 日おき計 3 回)、1 週おきに腫瘍体積を計測し、抗腫瘍効果を評価した。その結果、治療後 20 日目の腫瘍体積において、全ての細胞株において治療群は対照群に比し有意に腫瘍体積の減少が認められた。また、長期間にわたる生存率においても、治療群では対照群に比し有意に生存率が高かった ( $p < 0.01$ )。

## 【考察】

p53 遺伝子の変異は、人類の発癌において最も良く知られた遺伝子素因である。膀胱腫瘍においても種々の研究において、表在性膀胱腫瘍の 22%から 64%に p53 の変異が確認されており、腫瘍の再発や短期生存率にも大きく関わっていることが報告されている。こうした症例においては、経尿道的腫瘍切除術後に再発予防的に BCG 膀胱内注入療法を行って一時的・局所的に効果は認められても予後は不良で、より多くの症例で完治の期待できる全く新しい治療戦略が望まれている。癌遺伝子治療はこうした取り組みの一つで、体細胞における遺伝子の変異を直接修復し、腫瘍増殖抑制や正常機能の回復を期待するものである。

また、遺伝子治療においては種々の遺伝子導入法が考えられるが、今回筆

者らは、膀胱上皮細胞に遺伝子導入するためにアデノウイルスベクターを使用した。それは以下の3つの理由からである。まず第一に、アデノウイルスベクターは上皮細胞にも高い遺伝子導入効率を有すること。次に、レトロウイルスが標的細胞が分裂期にある時期にのみ感染するのとは違い、アデノウイルスは分裂期にあるかどうかに関らず、標的細胞に高い感染効率を有すること。最後に、アデノウイルス感染による遺伝子発現は一時的なものであるもので、万が一正常細胞に感染したとしても宿主遺伝子と融合して遺伝毒性をもたらすことが無いこと、による。

今回筆者らは自己増殖能力を削除し、その部位に野生型 p53 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター Ad5CMV-p53 を用いて膀胱腫瘍に対する癌抑制効果を検討し、in vitro、in vivo ともに高い癌抑制効果を証明したが、この研究は、進行性限局性膀胱腫瘍に対する新しい治療法の開発に大きく貢献するものと思われる。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1397号	氏 名	和田 義孝
論文題目	Gene Therapy for Bladder Cancer Using Adenoviral Vector (アデノウイルスベクターを用いた膀胱腫瘍 に対する遺伝子治療)		
審査委員	主 査 宇殿 貞夫 副 査 松尾 雅文 副 査 熊谷 俊一		
審査終了日	平成14年 1 月 4 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

泌尿器科領域において高頻度にみられる膀胱腫瘍は、再発しやすい悪性疾患である。その中の表在性膀胱腫瘍に対しては、経尿道的腫瘍切除術および、症例によってはその再発予防を目的として細胞毒性を有する薬剤を膀胱内に注入する膀胱内薬剤注入療法が併用されるが、しばしば膀胱腫瘍は再発を繰り返す。今日、BCG を用いた膀胱内注入療法が補助療法として最も有効とされ、その主流となっているが、本法によっても 30%以上の患者に無効である。

近年、多くの癌抑制遺伝子が同定され、その機能も判明しつつあり、中でもその代表的癌抑制遺伝子である p53 を用いた新しい治療戦略が確立されようとしている。今回申請者は、膀胱上皮や残存膀胱腫瘍に野生型 p53 蛋白を過剰発現させることにより病状の進行を抑止、あるいは化学療法後の組織修復率を改善するという仮説の基に、遺伝子組み替え p53 アデノウイルスベクターとヒトおよびマウス膀胱腫瘍細胞株を用いて、p53 癌抑制遺伝子の臨床応用の基礎的検討として癌抑制遺伝子 p53 アデノウイルスベクターの腫瘍抑制効果を検討した。

使用した細胞株は、ヒト膀胱腫瘍細胞株 KU-1、HTB9 及びマウス移行上皮癌細胞株 MBT-2。遺伝子組み換えアデノウイルスベクターは、改良型アデノウイルスの E1 領域を除去した部位に CMV プロモーター、p53 cDNA、及び SV40 遺伝子を組み込んで作製。予備実験として、ウイルス感染において適切な濃度を決定するために、大腸菌の  $\beta$  ガラクトシダーゼ遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを用いて、種々のウイルス濃度において各細胞株に 24 時間曝露させ、X-gal 染色を行った。結果 HTB9 では 1 細胞あたり 50PFU、KU-1 及び MBT-2 では 1 細胞あたり 20PFU のアデノウイルスが最適濃度であった。次に、この濃度を用いて、In Vitro における細胞増殖抑制効果として、6 穴の培養皿に各穴 1 万個の細胞を蒔き、24 時間後、各ウイルスを曝露させ、2 日おきにトリパンブルーにより生細胞を計測した。結果、治療群においては p53 を含まないアデノウイルスや PBS を曝露させた対照群に比し、HTB9、KU-1、MBT-2 のそれぞれで、各々 74%、77%、62% の増殖抑制効果を認め、また同時に TdT 染色により、これらの細胞のアポトーシスを起こした割合を評価したが、治療群においては、全ての細胞株で対照群と比較して有意に高い確率でアポトーシスが確認された。さらに In Vivo における抗腫瘍効果では、 $1 \times 10^6$  個の各腫瘍細胞を

含む培養液をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍が十分発育したところで、治療群として  $1 \times 10^9$  PFU の p53 を組み込んだアデノウイルスベクターを、対照群として同量の p53 を含まないアデノウイルスベクターおよび PBS を、腫瘍に 4 日おき計 3 回局所注入し、1 週おきに腫瘍体積を計測し抗腫瘍効果を評価した。結果、治療後 20 日目において、全ての細胞株において治療群は対照群に比し有意に腫瘍体積の減少が認められた。また、長期間にわたる生存率においても、治療群では対照群に比し有意に生存率が高かった。

考察：p53 遺伝子の変異は、人類の発癌において最も良く知られた遺伝子素因である。膀胱腫瘍においても、p53 の変異に関係した症例は、BCG 膀胱内注入療法で局所的に効果を示しても結果的に予後不良で、より多くの症例で完治の期待できる全く新しい治療戦略が望まれている。癌遺伝子治療はこうした取り組みの一つで、体細胞における遺伝子の変異を直接修復し、腫瘍増殖抑制や正常機能の回復を期待するものである。また遺伝子治療においては種々の遺伝子導入法が考えられるが、今回申請者は、標的細胞が分裂期にあるかどうかに関らず、標的細胞に対して高い感染効率を有すること、またアデノウイルス感染による遺伝子発現は一時的なものであり、万が一正常細胞に感染したとして

も宿主遺伝子と融合して遺伝毒性をもたらすことは無いこと等の理由により自己増殖能力を削除したアデノウイルスベクターを用いて膀胱腫瘍に対する癌抑制効果を検討し、優れた結果を示したが、これは進行性限局性膀胱腫瘍に対する新しい治療法の開発に大きく貢献するものと思われる。

以上のように、本研究は、p53 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを用いて、ヒト及びマウスの膀胱腫瘍細胞株に対する癌抑制効果について、in vitro 及び in vivo で研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった進行性限局性膀胱腫瘍に対する癌遺伝子治療について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。（1942 文字）