



Combination with CD/5-FC gene therapy enhances killing of human bladder-cancer cells by radiation

張, 竹君

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2004-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2954

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002954>

※ 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。



【 104 】

氏 名・(本 籍) 張 竹 君 (中国)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1564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16年3月31日

【 学位論文題目 】

Combination with CD/5-FC gene therapy enhances
killing of human bladder-cancer cells by radiation
(膀胱癌に対するCD/5-FC遺伝子治療及び
放射線療法の併用療法)

審 査 委 員

主査 教 授 千原 和夫

教 授 杉村 和朗

教 授 前田 盛

INTRODUCTION

Resistance to radiation and chemotherapy is a significant obstacle to the treatment of advanced bladder cancer. Gene therapy combined with radiation represents a new approach to cancer treatment.

A widely used suicide gene encodes the bacterial and fungal enzyme cytosine deaminase (CD) can be transferred from bacteria and expressed in mammalian tumor cells. CD-expressing cells can deaminate the relatively nontoxic prodrug 5-fluorocytosine (5-FC) to the highly toxic drug 5-FU.

In the present study, we explored adenovirus-mediated CD/5-FC gene therapy combined with subsequent radiotherapy for human bladder-cancer cells *in vitro* and *in vivo* using subcutaneous tumor model. Our results indicate that this combination therapy dramatically enhances the cell killing effect on human bladder cancer cells both *in vitro* and *in vivo*.

METHODS

Three human bladder-cancer cell lines (KK47, T24 and 5637) were investigated. A recombinant adenovirus vector containing the CD gene (Ad-RSV-CD) was used. Cells were infected with Ad-RSV-CD and treated with 5-FC. Forty-eight hours after infection, the cells were irradiated and cytotoxicity assays performed to determine the *in vitro* cytotoxicity. A KK47 subcutaneous tumor-xenografts model was used in an animal study to examine the tumor growth inhibitory effect of this combination therapy. Ad-RSV-CD was directly injected into the tumor and daily 5-FC was intraperitoneally injected. Forty-eight hours after injection of Ad-RSV-CD, the tumor was irradiated. The tumor volume was measured every day.

RESULTS

1. Different gene-transfer efficiency in each cell line

We examined adenovirus (Ad-RSV- β gal)-mediated gene-transfer efficiency in human bladder-cancer cells by X-gal staining. About 50% β -gal gene transfer was achieved by Ad-RSV- β gal infection at 25 MOI in the KK47 cells, at 125 MOI in the T24 cells and at 5 MOI in the 5637 cells. These MOI doses were employed in an *in vitro* cytotoxicity study.

2. Gene-transfer efficiency correlates with CAR expression

CAR is a common receptor for both coxsackievirus and group C adenovirus. We observed a significant difference in *CAR* mRNA expression (the expression ratio of KK47: T24: 5637 = 14: 1: 100) and the *CAR* mRNA levels paralleled viral gene-transfer efficiency in the respective cell lines.

3. CD/5-FC gene therapy combined with radiation enhances human bladder-cancer cell killing *in vitro*

Ad-RSV-CD/5-FC-treated groups showed significantly lower cell numbers than the no treatment groups (KK47: $P=0.0056$; T24: $P=0.0286$; 5637: $P=0.0131$), which represented 49.4%, 51.5% and 45.3% cell killing relative to the no treatment groups in KK47, T24 and 5637 cells. A single 4-Gy radiation exposure induced apparent cytotoxicity ($P=0.0032$, 0.0299 and 0.007) of 57.3%, 38.7% and 40.9% cell killing. An increased cytotoxic effect was noted in Ad-RSV-CD/5-FC with 4Gy radiation groups compared to no treatment control ($P=0.0005$, 0.0052 and 0.0045), representing 91.4%, 80.5% and 79.1% cell killing. The enhanced cell killing was seen only when the cells were exposed to the Ad-RSV-CD/5-FC before radiation.

4. CD/5-FC gene therapy combined with radiation enhances growth inhibition of KK47 subcutaneous tumor *in vivo*

CD/5-FC alone or IR alone showed slightly tumor growth delay, which followed by tumor regrowth. In tumors treated with CD/5-FC and irradiation, significant volumetric regression was observed, which have the smallest ratio of final tumor size to original tumor size among treatment groups compared to the untreated control group ($P= 0.03$). Histomorphological study showed that the largest necrotic lesions in tumors treated with CD/5-FC plus irradiation.

DISCUSSION

CD/5-FC gene therapy combined with radiation therapy for treatment of bladder cancer offers fresh potential to improve the therapeutic efficacy of radiation through selective tumor-cell radiosensitization. Radiosensitization via local conversion of 5-FC to 5-FU can potentially lead to more tolerable treatment without the local or systemic toxicity of conventionally delivered 5-FU. This molecular approach would improve the therapeutic efficacy of the bladder-preserving combined modality of chemotherapy with radiotherapy in the treatment of locally advanced bladder tumors.

In summary, our results demonstrated that prior CD/5-FC gene therapy can enhance the therapeutic efficacy of subsequent radiation therapy in the treatment of human bladder cancer, suggesting that this combination therapy could be integrated with existing therapies for muscle-invasive bladder cancer to improve local control and opportunities for bladder preservation.

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1563号	氏名	張竹君
論文題目	Combination with CD/5-FC gene therapy enhances killing of human bladder cancer cells by radiation 膀胱癌に対する CD/5-FC 遺伝子治療及び放射線療法の併用療法		
審査委員	主　　査 副　　査 副　　査	千原和夫 杉村和郎 前田一盛	(
審査終了日	平成 16 年 2 月 16 日)

(要旨は1,000字～2,000字程度)

進行した膀胱癌に対する化学療法や放射線療法には限界があり、新しい治療法の開発が望まれている。申請者たちは、放射線療法に遺伝子治療を組み合わせた治療法の前臨床実験を行った。遺伝子治療のストラテジーは、cytosine deaminase(CD)をコードする自殺遺伝子を、adenovirus vector を使って腫瘍細胞に移入、発現させてから、比較的毒性の低いプロドラッグである 5-fluorocytosine (5-FC)を投与すると、CD 発現細胞では CD の働きによって毒性の高い 5-FU が産生され、その 5-FC によって細胞が死滅するというものである。3種類のヒト膀胱癌細胞株(KK47, T24 および 5637)に、CD 遺伝子を入れたりコンビナント・アデノビールスペクター(Ad-RSV-CD)を移入した。Ad-RSV- β gal を用いて β gal 遺伝子発現量で調べた 50% 遺伝子移入率は、KK47 細胞の場合は 25MOI(multiplicity of infection), T24 細胞では 125 MOI, 5637 細胞では 5MOI であった。Coxsackie-Adenovirus Receptor(CAR)は coxackievirus および adenovirus group C に対する受容体であるがこの受容体の発現は細胞間で異なり、その発現率は KK47:T24:5637=14:1:100 であったが、この比率は遺伝子移入率とよく相関していた。一回の 4Gy 照射をしたところ、非照射群と比べて細胞の死滅率はそれぞれ KK47:T24:5637=57.3%:38.7%:40.9% であった。5-FC を投与すると、非投与群と比べて細胞の死滅率はそれぞれ KK47:T24:5637=49.4%:51.5%:45.3% であった。照射と 5-FC 投与を併用すると、対照群と比べて細胞の死滅率はそれぞれ KK47:T24:5637=91.4%:80.5%:79.1% と明らかに上昇した。この効果は照射の前に 5-FC を投与した場合にのみ観察された。次に in vivo での効果を観るために、KK47 細胞をマウスの皮下に植え込み腫瘍を形成させ、その腫瘍に Ad-RSV-CD を直接注射、その後毎日 5-FC を腹腔内投与した。また、照射群では Ad-RSV-CD 注射後 4~8 時間に 4Gy を一回照射した。腫瘍サイズを経時に測定したところ、CD/5-FC 単独群、照射単独群では、やや腫瘍発育の遅れは観られたものの腫瘍は再腫大した。両者の併用群では、腫瘍サイズは明らかに縮小し、最も有効なものでは移植当初のサイズまで退縮した。組織学的検索の結果、腫瘍サイズの縮小が観られたものでは腫瘍内に大きな壊死が起こっていた。

以上、本研究は、進行性膀胱癌の治療について、CD/5-FC 遺伝子治療と放射線治療の併用療法の有効性を、ヒト膀胱癌細胞株およびヒト膀胱癌細胞移植マウスを用いて、それぞれ in vitro と in vivo で研究したものであるが、従来ほとんど行われていなかった CD/5-FC 遺伝子治療と放射線治療の併用療法の有効性を証明し、ヒト膀胱癌の新しい治療法の開発に関する重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。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。