

	さとう たかあき
氏 名	佐藤孝明
学 位	博士(医学)
学位記番号	新大博(医)第1686号
学位授与の日付	平成17年 9月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
博士論文名	Increased efficiency of cisplatin resistant cell lines to DNA mediated gene transfer with cationic liposome (カチオニックリポソームによる遺伝子導入に対して示されたシスプラチン抵抗性細胞株の亢進した感受性)
論文審査委員	主査 教授 木南 凌 副査 教授 田中 憲一 副査 教授 五十嵐 道弘

博士論文の要旨

癌の遺伝子治療は予後不良な癌種に対して試みられており、卵巣がんも早期発見が困難で予後不良であることより遺伝子治療の適応疾患であると思われる。上皮性卵巣がんに対して、現在シスプラチン等のプラチナ製剤やタキサン化合物がその有効性により第1選択とされているが、短期生存率の向上は見られているが長期予後の十分な改善には至っていない。これは化学療法を繰り返すことにより出現する薬剤耐性細胞の出現が問題とされている。薬剤耐性克服のために種々の試みが行われているが、現時点においてみるべきものは少ない。遺伝子治療を行う際に効率的なベクターが必要とされるが、ウイルスベクターに比してカチオニックリポソームは安全性の問題は少なく遺伝子導入も簡便であるが、遺伝子導入効率の低さが問題であるとされていた。近年、我々は血清存在下あるいは腹水中でも有効な導入効率を示す、カチオニックリポソーム GTE319, GTE321 を開発した。

今回、シスプラチン耐性細胞株、KFra, KFrb, mEIIL-R およびその親株 KF, mEIIL に対して、この新設したカチオニックリポソームを用い、 β -galactoside 遺伝子を導入し X-gal 染色によりその遺伝子導入効率を検討した。またチミジンキナーゼ遺伝子を導入、引き続きアシクロビルを投与しアシクロビルに対する 50% inhibitory concentration (IC50) を算出し、対照として LakZ 導入細胞に対するアシクロビルの IC50 を算出、(LakZ 導入細胞に対するアシクロビルの IC50 / チミジンキナーゼ遺伝子導入細胞のアシクロビルに対する IC50) を Therapeutic index として抗腫瘍活性の変化を観察した。さらにヌードマウス側腹皮下に腫瘍細胞を接種、皮下腫瘍形成後、チミジンキナーゼ遺伝子導入およびアシクロビルを連日投与し腫瘍体積を比較することにより抗腫瘍活

性を検討した。

遺伝子導入効率は GTE319 を用い KF で $7.9 \pm 1.1\%$ であったのに対しその耐性株 KFra, KFrb ではそれぞれ $21.5 \pm 3.2\%$ 、 $25.2 \pm 3.2\%$ であった。GTE321 では KF, KFra, KFrb のそれぞれで $12.1 \pm 2.8\%$ 、 $23.0 \pm 7.3\%$ 、 $16.6 \pm 3.7\%$ であった。MEIIL およびその耐性株 mEIIL-R では GTE-319 でそれぞれ $20.4 \pm 2.9\%$ 、 $34.5 \pm 3.6\%$ 、GTE321 で $15.4 \pm 5.3\%$ 、 $32.9 \pm 4.0\%$ といずれも親株に比し耐性株での遺伝子導入効率が高かった。チミジンキナーゼ遺伝子導入後のアシクロビル投与による Therapeutic index は GTE319 において KF の 106.62 に対し KFra, KFrb では 215.91、168.09、GTE321 において KF の 105.98 に対し KFra, KFrb では 132.29、184.44 とシスプラチン耐性株においてより強い殺細胞効果を示した。同様に mEIIL および mEIIL-R では GTE319 でそれぞれ 3.17、60.73 であり GTE321 でそれぞれ 3.40、45.38 と耐性株において強い殺細胞効果が認められた。ヌードマウス皮下に移植した KF 細胞とそのシスプラチン耐性細胞 KFrb に対してチミジンキナーゼ遺伝子の腫瘍内局注とアシクロビル投与を行ったところ、KF 細胞においては対照遺伝子を導入しアシクロビル投与を行った群での腫瘍発育との間に有意差を認めなかったが、KFrb 細胞では対照遺伝子を導入した群に比して有意な増殖抑制が認められた。

シスプラチン耐性卵巣がん細胞株においては、カチオニックリポソームを用いた遺伝子導入効率の向上が認められ、チミジンキナーゼ遺伝子導入後のアシクロビル投与により強い細胞障害効果を示した。シスプラチン耐性株において遺伝子導入効率が向上することのメカニズムは明らかとはなっていない。しかし今回の結果は、自殺遺伝子導入による卵巣がんの遺伝子治療のみならず、カチオニックリポソームを用いた遺伝子導入による薬剤感受性の向上を求める等のアプローチも、シスプラチン耐性卵巣がんに対する有効なものの一つといえることを示していると考えられる。

論文審査の要旨

上皮性卵巣がんに対して現在シスプラチンがその有効性により第 1 選択とされているが、薬剤耐性細胞の出現が問題となっている。薬剤耐性克服のために種々の試みが行われているが、現時点において有効な開発に至っていない。

近年、申請者の教室において、血清存在下あるいは腹水中でも有効な導入効率を示す、リポソーム GTE319, GTE321 が開発されている。そこで、シスプラチン耐性細胞株、KFra, KFrb, mEIIL-R に対して、この新設計カチオニックリポソームを用いた遺伝子導入効率、およびチミジンキナーゼ遺伝子導入とアシクロビル投与による抗腫瘍活性の変化を申請者らは検討している。

その結果、全てのシスプラチン耐性細胞株は高い遺伝子導入効率とチミジンキナーゼ遺伝子導入後のアシクロビル投与により強い殺細胞効果を示した。さらにヌードマウス皮下に移植した KF 細胞とそのシスプラチン耐性細胞 KFrb に対してチミジンキナーゼ遺伝子の腫瘍内局注とアシクロビル投与を行ったとこ

ろ、KFr_b 細胞由来腫瘍だけが増殖を抑制された。

以上より、カチオニックリポソームを用いた遺伝子導入による薬剤感受性の向上を求めるアプローチはシスプラチン耐性卵巣がんに対する有効なものの一つであると、申請者は主張している。この点に博士論文としての価値を認める。