

学位論文題名

Intratumoral delivery of interleukin 12 expression plasmids with in vivo electroporation is effective for colon and renal cancer

(インビボエレクトロポレーション法によるインターロイキン12発現プラスミドの腫瘍内導入による結腸癌と腎癌に対しての治療効果)

学位論文内容の要旨

分子生物学の発展により、基本的に病気とは遺伝子の異常による、遺伝子産物の発現・機能変化によって起こっていると考えられるようになった。この考えに基づき、現在のところ、多くの病気の原因遺伝子が同定されている。高血圧、糖尿病など依然として病因遺伝子が明確になっていない疾患も数多く残されているが、近年のゲノム研究の成果もあり、いずれ明確になると期待される。遺伝子治療は遺伝子を薬として用い、病気の治療をしようとするものである。つまり治療遺伝子を細胞に導入し発現させることで欠損した遺伝子産物を補ったり、病気の原因遺伝子の機能を抑制したりすることで細胞の働きを正常に戻そうというものである。現在までに癌、感染症、単一遺伝性疾患、心血管疾患などに対して世界中で400を超える臨床研究のためのプロトコルが存在し、4000人以上が遺伝子治療を受けている。日本でも承認されたプロトコルは10程度ある。しかし、現在までのところ、遺伝子治療が大きな成功を収めているとは言い難い状況であり、その理由の一つは細胞への安全で効率のよい遺伝子導入が難しいことであった。

細胞は一般的に容易には遺伝子を取り込まないため、遺伝子導入には特殊な方法が用いられる。遺伝子導入方法は大きく分けてウィルスベクターと非ウィルスベクターがある。アデノウィルスベクターやレトロウィルスベクターは遺伝子導入効率が高いため、よく用いられているがそのウィルスのもつ病原性のため、安全性の高い臨床用のベクターの作製は困難でかつ高価である。非ウィルスベクターではプラスミドやオリゴ核酸そのものを使用する。裸のまま組織に注入、あるいはリポソーム、遺伝子銃などを使用する。一般に非ウィルスベクターはウィルスベクターと比較して安全性は高いが、遺伝子導入効率は低いとされている。本論文では *in vivo* electroporation という新規な方法 (非ウィルス導入法) を使った。 *In vitro* では electroporation 法は細胞への遺伝子導入によく使われる。近年本方法は *in vivo* にも応用が行われ始めている。標的組織に遺伝子を注入し、組織に電気パルスをかけることで、遺伝子を導入する。非ウィルスとしては高い遺伝子導入効率が望めるし、ウ

ウイルスベクターより安価で作製でき病原性は低いと考えられ、注目されている。

癌は日本人の死因第一位であり、既存の治療方法（外科手術、化学治療、放射線治療など）では効果が見られないケースも多々ある。その一方で無限増殖能の獲得、転移浸潤、免疫系からの逃避など癌の主要な側面についてはその分子生物学的機構がかなり明らかになっており、現在もその機構解明が進められている。このような観点から遺伝子治療の歴史の初期から癌は研究対象となってきた。治療遺伝子としては癌抑制遺伝子（p53 など）、自殺遺伝子（HSV thymidine kinase と ganciclovir の組み合わせなど）、免疫調節遺伝子（GM-CSF、IL-12 など）が主に使われている。癌に対する免疫を強化することは原発巣だけでなく、転移巣にも抗腫瘍効果が及ぶ可能性があり、また腫瘍に対する免疫学の進展もあり、熱心に研究が進められ、現在のところ癌に対する遺伝子治療の承認プロトコールの約6割を免疫治療法が占めている。その中でIL-12はT細胞やNK細胞に作用しその細胞障害活性を高める作用がある。また間接的に血管新生を阻害する作用もあり、既に高い抗腫瘍効果が報告されている。

本論文はIL-12遺伝子の発現プラスミドをin vivo electroporationによって腫瘍内に導入することで抗腫瘍効果を得ることができるかどうか調べたものである。まずIL-12遺伝子の発現プラスミドを構築しその発現と活性をチェックした後治療効果を検証した。マウスCT26（結腸がん細胞）をBALB/Cマウス皮下に移植し、形成した腫瘍内にプラスミド溶液を注入し腫瘍周囲に電場をかけ、遺伝子導入した。導入場所としては大腿筋肉内や皮内も考えられるが、IL-12による全身的な副作用の軽減を考慮すると腫瘍内局所の導入がまずは第一選択と考えられた。経時的に腫瘍容量を測定したところ、IL-12遺伝子による治療で有意な抗腫瘍効果を得ることができた。組織解析により、CD8+T細胞の腫瘍内の浸潤が増加したこと、腫瘍内のIFN- $\gamma$ の産生が増加したことが明らかになった。治療を行ったマウスに対してCT26を再移植するとこの腫瘍の成長は有意に抑制された。さらにRenca（腎癌細胞）でも同様に抗腫瘍効果が得られた。これらの結果からin vivo electroporationによるIL-12遺伝子を使った種々の癌の遺伝子治療は有効であると結論された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 志 田 壽 利

副 査 教 授 西 村 孝 司

副 査 教 授 葛 卷 暹

## 学位論文題名

### Intratumoral delivery of interleukin 12 expression plasmids with in vivo electroporation is effective for colon and renal cancer

(インビボエレクトロポレーション法によるインターロイキン12発現プラスミドの腫瘍内導入による結腸癌と腎癌に対しての治療効果)

分子生物学の発展により、基本的に病気とは遺伝子の異常による、遺伝子産物の発現・機能変化によって起こっていると考えられるようになった。遺伝子治療は遺伝子を薬として使い、病気の治療をしようとするものである。つまり治療遺伝子を細胞に導入し発現させることで欠損した遺伝子産物を補ったり、病気の原因遺伝子の機能を抑制したりすることで細胞の働きを正常に戻そうというものである。しかし、現在までのところ、遺伝子治療が大きな成功を収めているとは言い難い状況であり、その理由の一つは細胞への安全で効率のよい遺伝子導入が難しいことであった。細胞は一般的に容易には遺伝子を取り込まないため、遺伝子導入には特殊な方法が用いられる。遺伝子導入方法は大きく分けてウィルスベクターと非ウィルスベクターがある。アデノウィルスベクターやレトロウィルスベクターは遺伝子導入効率が高いため、よく用いられているがそのウィルスのもつ病原性のため、安全性の高い臨床用のベクターの作製は困難でかつ高価である。非ウィルスベクターではプラスミドやオリゴ核酸そのものを使用する。裸のまま組織に注入、あるいはリポソーム、遺伝子銃などを使用する。一般に非ウィルスベクターはウィルスベクターと比較して安全性は高いが、遺伝子導入効率は低いとされている。本論文では in vivo electroporation という新規な方法（非ウィルス導入法）を使った。In vitro では electroporation 法は細胞への遺伝子導入によく使われる。近年本方法は in vivo にも応用が行われ始めている。標的組織に遺伝子を注入し、組織に電気パルスをかけることで、遺伝子を導入する。非ウィルスとしては高い遺伝子導入効率が望めるし、ウィルスベクター

より安価で作製でき病原性は低いと考えられ、注目されている。IL-12 はT細胞やNK細胞に作用しその細胞障害活性を高める作用がある。また間接的に血管新生を阻害する作用もあり、既に高い抗腫瘍効果が報告されている。本論文は IL-12 遺伝子の発現プラスミドを *in vivo* electroporation によって腫瘍内に導入することで抗腫瘍効果を得ることができるかどうか調べたものである。まず IL-12 遺伝子の発現プラスミドを構築しその発現と活性をチェックした後治療効果を検証した。マウス CT26 (結腸がん細胞) を BALB/C マウス皮下に移植し、形成した腫瘍内にプラスミド溶液を注入し腫瘍周囲に電場をかけ、遺伝子導入した。導入場所としては大腿筋肉内や皮内も考えられるが、IL-12 による全身的な副作用の軽減を考慮すると腫瘍内局所の導入がまずは第一選択と考えられた。経時的に腫瘍容量を測定したところ、IL-12 遺伝子による治療で有意な抗腫瘍効果を得ることができた。組織解析により、CD8+T細胞の腫瘍内の浸潤が増加したこと、腫瘍内の IFN- $\gamma$  の産生が増加したことが明らかになった。治療を行ったマウスに対して CT26 を再移植するとこの腫瘍の成長は有意に抑制された。さらに Renca (腎癌細胞) でも同様に抗腫瘍効果が得られた。これらの結果から *in vivo* electroporation による IL-12 遺伝子を使った種々の癌の遺伝子治療は有効であると結論された。

その後葛巻暹教授からエレクトロポレーションのメリットについての質問があった。申請者は遺伝子銃やリポソームでの報告を引用しエレクトロポレーションの応用範囲の広さを主張した。次いで西村孝司教授から安定発現細胞の出現の危険性についての質問があった。申請者は遺伝子発現の調節システムの報告を引用し、安定発現細胞の出現の危険性の回避の可能性について論じた。また、志田から技術面での質問があったが、申請者は的確に答えた。

この論文は、癌の遺伝子治療の分野で安全な非ウィルスベクターの使用の可能性を示したことで高く評価され、今後さまざまな癌に対して臨床応用されると期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。