

論文の内容の要旨

1. 目的

頭頸部扁平上皮癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) は頭頸部癌全体の約 9 割を占め、癌全体の中で 6 番目に高い頻度で発症する。*c-myc* は癌原遺伝子の 1 つとされ、これまで HNSCC を含めた多くの癌において *c-myc* の増幅や c-Myc の高発現が指摘されている。*c-myc* 転写抑制因子 Far upstream element binding protein interacting repressor (FIR) は c-Myc 発現を抑制する転写因子として知られており、大腸癌や悪性中皮腫などいくつかの癌においてウイルスベクターを介した FIR 投与による抗腫瘍効果が報告されている。今回、F 遺伝子が欠失した非伝播型センドライウイルス (SeV/ Δ F) ベクターを用いた FIR の遺伝子導入による、HNSCC に対する抗腫瘍効果につき検証した。

2. 対象ならびに方法

当初、SeV/ Δ F ベクターが HNSCC 細胞への遺伝子導入が可能か否か確認するため、緑色蛍光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) を搭載した SeV/ Δ F ベクター、GFP-SeV/ Δ F ベクターを用いて *in vitro* 実験および *in vivo* 異所移植腫瘍ヌードマウスモデルによる検討を行った。その後、FIR 搭載 SeV/ Δ F (FIR-SeV/ Δ F) ベクターを使用し、同じく *in vitro* および *in vivo* 異所移植腫瘍マウスモデルにおいて HNSCC に対する FIR の抗腫瘍効果を確認した。更に、FIR の抗腫瘍効果の機序を解明すべく、HNSCC 腫瘍に対して FIR-SeV/ Δ F ベクターを投与した群 (高力価投与群と低力価投与群を作成) と非投与群 [GFP-SeV/ Δ F ベクターまたはリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline, PBS) を投与] を作成し、c-Myc 発現量やアポトーシスの程度につき比較検討を実施した。

3. 結果

4 種の HNSCC 細胞株に対し *in vitro* で GFP-SeV/ Δ F ベクターを投与した結果、いずれの細胞株においても感染多重度 (multiplicity of infection, MOI) 依存性、および時間依存性に GFP 発現の増強がみられ、特に OSC-19 細胞株では他の 3 細胞株と比べて著明な GFP 発現を認めた。続く *in vivo* 実験では、2 つの HNSCC 細胞株、OSC-19 と FaDu を用いて行った結果、両細胞株の異所移植腫瘍において GFP-SeV/ Δ F ベクター投与後 7 日目に GFP 発現のピークがみられた。また、同 7 日目の GFP 発現面積を比較したところ、OSC-19 において有意にその面積が大きかった。

続く FIR を用いた治療実験では、まず *In vitro* において OSC-19 に対し 0 から 100 MOI の範囲で FIR-SeV/ Δ F ベクターを投与した後に MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] 試験で生細胞数を半定量化した結果、腫瘍細胞の増殖は MOI 依存性に抑制され、特に 100 MOI 群ではほぼ完全に腫瘍増殖が抑制された。一方、FIR 非搭載である GFP-SeV/ Δ F ベクターを用いて同様に評価したところ、100 MOI 群においても腫瘍細胞は 0 MOI (SeV/ Δ F ベクター非投与) 群と同様の増加傾向を示した。*In vivo* 実験では、OSC-19 腫瘍に対し高力価の FIR-SeV/ Δ F

ベクターを投与した群が、対照 (GFP-SeV/ Δ F ベクター投与および PBS 投与) 群に比べて統計学的有意差を持って高い抗腫瘍効果を示した。また、同モデルの生存率を検討したところ、高力価 FIR-SeV/ Δ F ベクター投与群は PBS 投与群に比べて有意に生存率が高いことが示唆された。

最後に、*In vitro* で FIR-SeV/ Δ F ベクターを投与した OSC-19 細胞を用いてウェスタンブロット解析を行った結果、0 MOI 群と比較して 25 MOI 以上の群では有意に c-Myc 発現量が低下していた。また、FIR-SeV/ Δ F ベクター、GFP-SeV/ Δ F ベクター、もしくは PBS が投与された OSC-19 腫瘍を用いて c-Myc の免疫組織学的検討およびアポトーシス *in situ* アッセイを実施したところ、FIR 投与群では対照群と比べ、有意な c-Myc 発現の低下およびアポトーシス誘導を認めた。

4. 考察

SeV/ Δ F ベクターによる様々な組織細胞への遺伝子導入が可能であることは過去に報告されているが、今回 HNSCC 細胞に対しても安全かつ確実に遺伝子導入することができた。また、SeV/ Δ F ベクターを介して FIR を HNSCC 細胞へ遺伝子導入することにより、*c-myc* の転写抑制およびアポトーシス誘導によると考えられる優れた抗腫瘍効果を認めた。更に、SeV/ Δ F ベクター自体には細胞毒性はないことが示唆された。

5. 結論

FIR-SeV/ Δ F ベクターを用いた遺伝子治療は、その治療効果および安全性から、HNSCC に対する治療法の新たな選択肢になり得ることが示された。