

機関番号：17102

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592047

研究課題名 (和文)

網膜芽細胞腫に対する腫瘍自己溶解型ウイルスを用いた新規治療の開発

研究課題名 (英文)

Development of anti-tumor gene therapy for retinoblastoma using Sendai virus vector and IFN β gene.

研究代表者

吉川 洋 (YOSHIKAWA HIROSHI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00304808

研究成果の概要 (和文)：

放射線治療や化学療法に加わる網膜芽細胞腫に対する新たな治療法として、遺伝子治療に注目し、IFN- β 遺伝子を搭載した SeV/ Δ M ウイルスベクターの抗腫瘍効果について検討した。SeV/ Δ M ウイルスベクターは網膜芽細胞腫には感染が困難であったが、網膜色素上皮細胞には高効率に感染が可能であった。網膜色素上皮細胞に IFN- β を遺伝子導入・過剰発現させることによって、パラクライン的に RB の増殖を抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We investigated whether anti-tumor gene therapy using M gene deficient Sendai virus vector encoding IFN- β gene (SeV/ Δ M-IFN- β) has therapeutic potentials for the treatment of retinoblastoma. Whereas the gene transduction efficiency of SeV/ Δ M vector is low in retinoblastoma cell lines, it mediates efficient gene transfer in a retinal pigment epithelium (RPE)-derived cell line. SeV/ Δ M-mediated overexpression of IFN- β in RPE suppressed the growth of retinoblastoma cells, suggesting that intraocular IFN- β gene transfer using SeV/ Δ M vector may be a useful strategy for preventing tumor growth in retinoblastoma patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼細胞生物学・眼腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

両眼性網膜芽細胞腫保存治療眼における硝子体播種は、歴史上越えられない治療の難関である。放射線外照射が敬遠される現代、残された腫瘍治療の柱は化学療法のみとなっており、発想の転換が迫られている。我々はこれまでの研究で、ウイルス単独で殺細胞効果を発揮する M 遺伝子欠損センダイウイルスベクター (SeV/ Δ M ウイルスベクター) を開発し、これに各種ウイルスを搭載することで殺腫瘍効果を高める実験に成功した。そこで、今回抗腫瘍効果と免疫治療効果を併せ持つ IFN- β 遺伝子を搭載した SeV/ Δ M ウイルスベクターを用い、網膜芽細胞腫 (RB) 硝子体播種の根治を目指す研究を行う。

2. 研究の目的

RB に対する新しい治療の開発に向けて、

(1) *in vitro* の系で SeV/ Δ M ウイルスベクターの感染能および殺細胞効果を検討する。

(2) RB の動物モデルを確立し、SeV/ Δ M ウイルスベクターの抗腫瘍効果について検討する。

(3) SeV/ Δ M ウイルスベクターの眼内投与の安全性について検討する。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* の実験は、ヒト RB 由来の細胞株である Y79 および WERI-Rb-1 を用いる。GFP 遺伝子を搭載した SeV/ Δ M ウイルスベクターを MOI = 1, 5, 25 で添加し、感染効率を測定する。また IFN- β の腫瘍抑制作用を検討するため、ダブルチャンバーを用いて、下側に SeV/ Δ M ウイルスベクターで IFN- β を感染させた網膜色素上皮細胞 (ARPE-19) を培養し、

上側の RB 細胞の細胞生存率を測定した。

(2) *in vivo* の実験は、重症免疫不全 (SCID) マウスを用いて、RB 細胞を眼球硝子体腔に注入し、眼球内での腫瘍の生着、増殖を計測した。また、マトリゲルと混合した RB 細胞をマウス皮下に接種し、皮下での腫瘍増殖を計測した。さらに SeV/ Δ M ウイルスベクターを皮下腫瘍内に注入し、ベクターの抗腫瘍効果について検討した。

(3) SeV/ Δ M ウイルスベクターを SCID マウスの硝子体中内に投与し、その1ヶ月後に組織切片を作製して安全性について検討した。

4. 研究成果

(1) RB 細胞に対する SeV/ Δ M ウイルスベクターの感染効率であるが、*in vitro* の系で、SeV/ Δ M ウイルスベクターをヒト RB 細胞株 Y79, WERI-Rb-1 へ遺伝子導入し GFP 遺伝子を搭載した SeV/ Δ M を MOI=1, 5, 25 で添加、蛍光顕微鏡で GFP 遺伝子の導入効率を検討したところ、MOI = 最大の 25 の濃度で感染させた場合でも感染効率は約 10% と低率であった。ARPE-19 では、MOI = 10 で 80% 以上の細胞に遺伝子導入が可能であることから、RB 細胞株では SeV/ Δ M ウイルスベクターの感染に必要なレセプターの発現が低下している可能性が考えられた。SeV/ Δ M ベクターの濃度をさらに MOI=50, 100, 200 まで高くしたが、RB 細胞への遺伝子導入効率は MOI=25 の場合と比較して改善されなかった。低酸素や炎症性サイトカインなどの刺激下に SeV/ Δ M ベクターの感染を試みたが、改善を認めなかった。

以上の結果より、SeV/ Δ MベクターのRB細胞への感染・遺伝子導入は困難と考えられた。一方で、別の細胞株（網膜色素上皮細胞株）などへは高効率に遺伝子導入が可能であることから、これらの細胞に抗腫瘍作用を持つ液性因子（IFN- β など）を遺伝子導入し、パラクライン作用によってRBの増殖を抑制する方法が可能と考えられた（今後の別の研究テーマとして）。

SeV/ Δ Mウイルスベクターを用いてARPE-19にIFN- β を遺伝子導入し、RBに対するIFN- β の抗腫瘍効果をダブルチャンバーで検討したところ、IFN- β の過剰発現によってRBの増殖が抑制された。これらの結果より、IFN- β を眼内に過剰発現することによって、RBの増殖を制御できる可能性が示唆された。

(2)RB細胞株の細胞浮遊液をSCIDマウスの硝子体腔に注入し、1週間後に眼球を摘出、組織学的に残存した腫瘍細胞数を検討したが、手技による個体差が大きく、本実験系を治療実験に用いることは困難で、まず次項の皮下注法で結果を求めていくこととした。

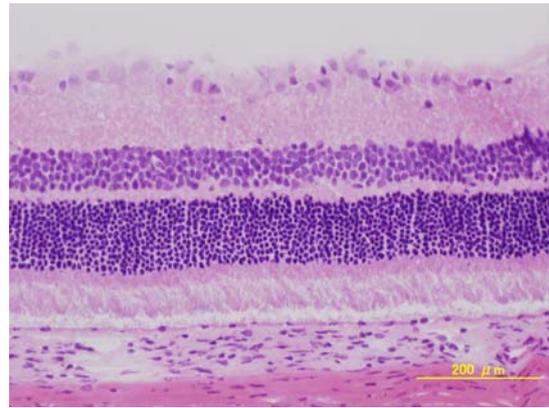


RB細胞株とマトリゲルの混合による皮下注法では、腫瘍塊が血管侵入を伴わず、一か月にわたり比較的均一に増大していくことが確認された。

このモデルを用いて、SeVベクター投与群

あるいは非投与群での腫瘍塊の大きさを比較したが、有意な差を認めなかった。その原因としては、*in vitro*の実験で示されたように、SeVベクターがRB細胞に感染しないことが大きいと考えられた。

(3)SeV/ Δ Mウイルスベクターを硝子体内投与1カ月後に組織学的検討を行ったが、網膜の変性や炎症細胞浸潤などを認めず、正常網膜への明らかな毒性を認めなかった。



以上の結果から、SeV/ Δ MウイルスベクターはRB細胞への感染効率が低いものの、RPE由来細胞（ARPE-19）には感染が可能であり、IFN- β をRPEに過剰発現させることで、パラクライン作用によってRBの増殖を抑制できる可能性が示唆された。今後は、遺伝子改変などによってRBが眼内に発症するモデルなど、よりヒトの病態に類似したモデルを開発し、治療実験を進める必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0件）

〔学会発表〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 洋 (YOSHIKAWA HIROSHI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：00304808

(2) 研究分担者

米満 吉和 (YONEMITSU YOSHIKAZU)
九州大学・大学院薬学研究院・客員教授
研究者番号：40315065

(3) 連携研究者

園田 康平 (SONODA KOH-HEI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：10294943