

- 山海 直. カニクイザル円形精子細胞の体外成熟培養におけるフィーダー細胞および培養液の検討. 日本実験動物科学技術大会2001: 第48回日本実験動物学会(横浜) 2001年5月
- 2) 岡田浩典, 広瀬良宏, 伊藤雅夫, 田中 温, 山海 直. 透明帯除去および割球を分離したマウス2細胞期卵の超急速凍結保存. 日本実験動物科学技術大会2001: 第48回日本実験動物学会(横浜) 2001年5月
- 3) 宮本幸子, 陳 楊, 中村紳一郎, 山海 直, 吉田高志, 町田武生. 雄カニクイザルの消化管組織におけるテストステロン様免疫活性物質の存在. 日本実験動物科学技術大会2001: 第48回日本実験動物学会(横浜) 2001年5月
- 4) 岡田浩典, 広瀬良宏, 伊藤雅夫, 山海 直. カニクイザル円形精子細胞から精子発生のための体外培養系におけるhFSHおよびIGF-I添加の影響. 第55回日本人類学会大会, 第17回日本霊長類学会大会連合大会(京都) 2001年7月
- 5) 広瀬良宏, 岡田浩典, 伊藤雅夫, 吉田高志, 山海 直. カニクイザルでのGnRHアゴニストとhMG投与による卵胞発育誘起とその内分泌学的解析. 第55回日本人類学会大会, 第17回日本霊長類学会大会連合大会(京都) 2001年7月
- 6) 越後貫成美, 土屋英明, 広瀬良宏, 岡田浩典, 小倉淳郎, 山海 直. カニクイザル円形精子細胞を用いた顕微授精. 第94回日本繁殖生物学会(東京) 2001年9月
- 7) 喜多 清, 大西 龍, 岩崎賢一, 山海 直, 吉田高志, 伊藤雅夫. 遠心G負荷環境におけるマウスの継代育成が繁殖と成長にあたる影響. 第15回日本宇宙生物科学学会総会(東京) 2001年9月
- 8) 揚山直英, 小野文子, 山海 直, 寺尾恵治. カニクイザルにおける子宮外妊娠. 第132回日本獣医学会学術大会(岩手) 2001年10月
- 9) Narumi Ogonuki, Hideaki Tsuchiya, Yoshihiro Hirose, Hironori Okada, Atsuo Ogura, Tadashi Sankai. Pregnancy following round spermatid injection in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). Development and Epigenetics of Mammalian Germ Cells and Pluripotent Stem Cells (Kyoto, Japan) November 2001
- 10) 喜多 清, 大西 龍, 岩崎賢一, 山海 直, 吉田高志, 伊藤雅夫. 2G環境で継代繁殖されたマウスの骨形成. 第47回日本宇宙航空環境医学会総会(名古屋) 2001年11月
- 11) 宮本幸子, 陳 楊, 山海 直, 吉田高志, 町田武生. 雄カニクイザルの消化管組織におけるテストステロン代謝関連酵素の活性. 第26回日本比較内分泌学会大会(東京) 2001年12月
3. 出版図書
- 1) 山海 直. 未成熟卵子, 排卵卵子, 受精卵の採取法: サル, 卵子の体外培養法. 生殖工学のための講座「卵子研究法」鈴木秋悦, 佐藤英明編集. 養賢堂, 153-162, 2001
- 2) 山海 直. 卵子の体外成熟・体外受精・体外培養法: サル, 卵子の体外培養法. 生殖工学のための講座「卵子研究法」鈴木秋悦, 佐藤英明編集. 養賢堂, 195-203, 2001
4. 報道関係
- 1) 山海 直. 読売新聞, 2001年4月18日. 内容: カニクイザルの円形精子細胞の顕微授精・胚移植で妊娠
- 2) 山海 直. 日経産業新聞, 2001年4月18日. 内容: カニクイザルの円形精子細胞の顕微授精・胚移植で妊娠
- 3) 山海 直. 日経産業新聞, 2001年10月5日. 内容: カニクイザルの円形精子細胞の顕微授精・胚移植で妊娠した個体が流産

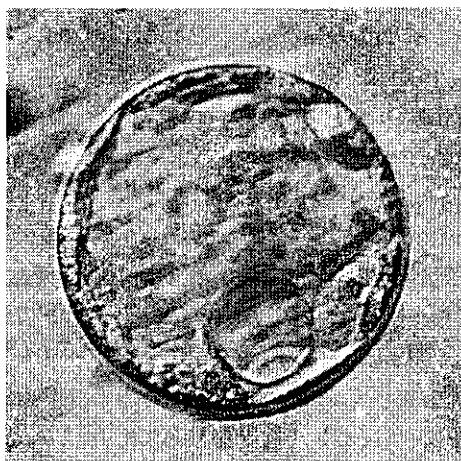


図1 無血清培地のBRL細胞上で
発育したマウス卵(blastocyst)

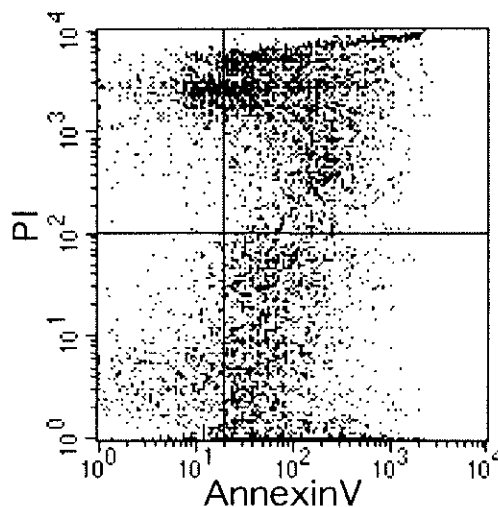


図2 カニクイザル円形精子細胞
のAnnexinVおよびPIによる解析

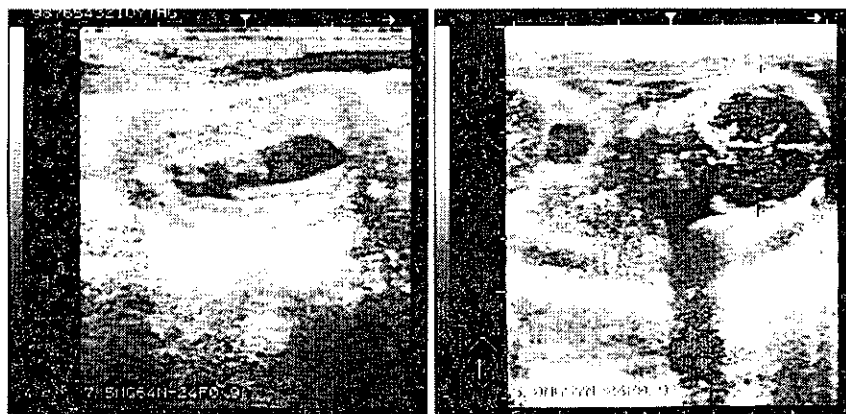


図3 カニクイザル円形精子細胞の顕微受精卵
の胚移植による妊娠
妊娠4週目(左)と12週目(右)のエコー像

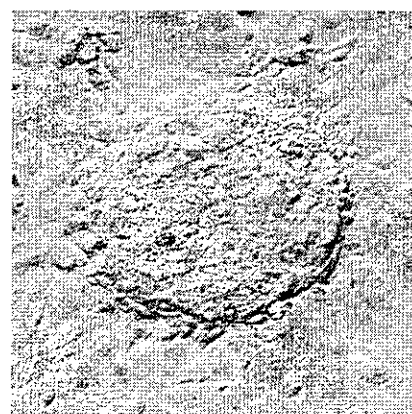


図4 カニクイザルのES様細胞

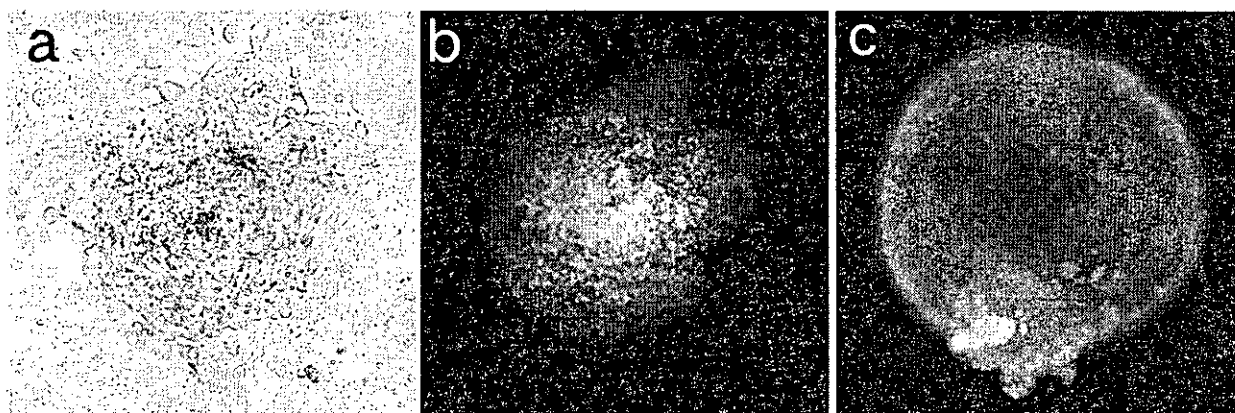


図5 マウスのES細胞(a,b)と胚様体(c)
aは明視野、bおよびcはEYFPを発現した蛍光像

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Immunolocalization of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) in cynomolgus monkey (<i>Macaca fascicularis</i>) testes during postnatal development J. Med. Primatol. 30, 107-111	2001		Ji-Hong Liang Tadashi Sankai Takashi Yoshida Yasuhiro Yoshikawa
Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa Theriogenology 55, 1759-1768	2001		Tadashi Sankai, Hideaki Tsuchiya Narumi Ogonuki
老齡ザルと若齡ザルにおける位置再認課題での位置偏好反応の検討 動物心理学研究 51, 11-18	2001		久保南海子 小山高正 川崎勝義 土田順子 山海 直 寺尾恵治 吉川泰弘
Activity of a sperm-borne oocyte-activating factor in spermatozoa and spermatogenic cells from cynomolgus monkeys and its localization after oocyte activation Biol. Reprod. 65, 351-357	2001		Narumi Ogonuki Tadashi Sankai, Kenichi Yagami Tomohide Shikano Shoji Oda Shunichi Miyazaki Atsuo Ogura
Cryopreservation-induced acrosome vesiculation in live sperm from cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>) Hum. Reprod. 16, 2139-2147	2001		Akiko Okada, Hiroaki Igarashi Masaru Kuroda Keiji Terao Yasuhiro Yoshikawa Tadashi Sankai
Behavioral complements in a positional learning and memory task by aged monkeys Behavioural Processes 56, 15-22	2001		Namiko Kubo Takamasa Koyama Katsuyoshi Kawasaki Junko Tsuchida Tadashi Sankai Keiji Terao Yasuhiro Yoshikawa

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Short-term preservation of mouse oocytes at 5 C Exp. Anim. 50, 441-443	2001		Hideaki Tsuchiya, Narumi Ogonuki, Tadashi Sankai, Kiichi Kanayama
Monitoring the reproductive status of female gorillas (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>) by measuring the steroid hormones in fecal samples Primates 42, 291-299	2001		Sachiko Miyamoto Yang Chen Hidetoshi Kurotori Tadashi Sankai Takashi Yoshida Takeo Machida
Monitoring the reproductive status of Japanese monkeys (<i>Macaca fuscata</i>) by measurement of the steroid hormones in fecal samples Primates 42, 367-373	2001		Takashi Yoshida Mie Matsumuro Sachiko Miyamoto Yasuyuki Muroyama Yasuko Tashiro Yuji Takenoshita Tadashi Sankai
Simple assay method for serum oxytocin and changes of serum oxytocin level during parturition in cynomolgus monkeys Exp. Anim.	(in press)		Katsuyoshi Kawasaki Yuko Mitsui Takahiro Ono Hiromi Ogawa Ichiro Takano Tadashi Sankai Keiji Terao
未成熟卵子、排卵卵子、受精卵の採取法：サル、卵子の体外培養法 生殖工学のための講座「卵子研究法」鈴木秋悦、佐藤英明 編集 153-162	2001	養賢堂	山海 直
卵子の体外成熟・体外受精・体外培養法：サル、卵子の体外培養法 生殖工学のための講座「卵子研究法」鈴木秋悦、佐藤英明 編集 195-203	2001	養賢堂	山海 直

分担研究報告書

チンパンジーを用いた遺伝子治療の有効性・安全性評価方法の開発に関する研究

分担研究者 早坂郁夫*

協力研究者 富永壽和*、吉本信彦*、鷓殿俊史*、森 裕介*、山本太郎**、寺本信嗣***、松瀬健****、石井健男****、岡村 均*****、大場隆*****、本田律生*****、内野貴久子*****

* (株)三和化学研究所熊本霊長類パーク、**国立療養所熊本南病院、***国際医療福祉大学、****横浜市立大学、*****熊本大学

研究要旨

チンパンジーを用いた遺伝子治療用ベクターの評価技術開発の一環として、*in vitro* による評価方法を進めている。本年度は、器官培養したチンパンジー気管支上皮にアデノウイルスベクターが発現するか否かを検討した。また、ES細胞の利用による評価法開発を目指し、チンパンジーの卵採取方法を検討した。

バイオブシーにて採取したチンパンジー気管支上皮を3日間器官培養した後、Ad5-CMV-lacZを1時間暴露し、24時間後にLacZ遺伝子の発現を観察した。同様な方法により、18日間培養した気管支上皮におけるAd5-CMV-lacZの導入効果を検討した。培養3日目の気管上皮すなわち既存の上皮と新生上皮においては、LacZ遺伝子の発現は観察されなかった。一方、培養18日の気管上皮すなわち再生が終了し再分化した上皮においては、LacZ遺伝子の発現が認められた。

ES細胞の樹立においては、チンパンジーの月経周期と性ホルモン動向の基礎データをとり、採卵技術の検討を行った。チンパンジーにとって侵襲性の少ない超音波診断装置による経膈採卵の技術に目処が立ち、過排卵処理に見通しがついた。今後、受精、ES細胞の樹立を行う予定である。

研究目的

遺伝子治療の安全性および有効性の前臨床評価はゲッ歯類を用いられてきたが、評価の限界がでてきている。導入される遺伝子がヒト由来の遺伝子であることを考慮すると、生体内の安全性および有効性の前臨床評価はゲッ歯類ではなくヒトに近縁な霊長類を用いた評価系の開発が待たれる。特に、最もヒトに近いチンパンジーを用いた評価は、非常に有効な方法であると期待される。しかし、チンパンジーは最もヒトに近いが故に、高度な実験動物倫理が求められる。我々は、チンパンジーを用いてよりよい遺伝子治療の評価方法の開発を、*in vitro* を中心に進めてきた。昨年度は、バイオブシーの気管

支上皮を長期間器官培養する方法を確立した。

本年度は、アデノウイルスベクターによる培養気管支上皮への遺伝子導入を検討した。

また、本年度はチンパンジーのES細胞の利用について、検討を行った。ES細胞は様々な種類の細胞・組織・臓器に分化する能力を持っている。バイオブシーによって得られる細胞・組織は、*in vitro* 実験に必要な細胞・組織の種類および量において限界がある。ES細胞の利用はバイオブシーの限界をブレイクスルーする可能性を秘めている。本年度は、ES細胞樹立に必要な卵の採取方法を検討した。

実験1：Ad5-CMV-lacZの器官培養気管上皮への遺伝子導入効果

材料および方法

チンパンジーのバイオブシーは実験審査委員会の承認を得て行なった。健康な個体3頭（コイコ ♀ 50.0kg 24 才；サクラ ♀ 48.6kg 10 才；タカシ ♂ 59.3kg 13 才）を用いた。昨年度報告したように、塩酸ケタミン麻酔下、内視鏡用バイオブシー鉗子を用いて、気管支分岐部の spur における粘膜のバイオブシーを行った。

3頭から採取した18個の組織片を、penicillin (200IU/ml)、streptomycin (200 μ g/ml)、amphotericin B (500 ng/ml)を含む0.01M PBS (PH7.4)で2回洗浄した後、大きいものについては剃刀で分割することによって、直径約1mm大の28個の培養用組織片を得た。組織片は10%FBS、400 μ lのnonessential amino acid溶液、penicillin (100IU/ml)、streptomycin (100 μ g/ml)、amphotericin B (250ng/ml)を含むDulbecco's modified Eagle's 培地で2回洗浄後、この培地を組成とする0.75% agar(agar noble)でコートした24 well dish に、1 wellにつき1個ずつ置いた。次いで添加剤としてbovine pituitary extract (52 μ g/ml)、human epidermal growth factor (0.5ng/ml)、insulin(5 μ g/ml)、hydrocortisone (0.5 μ g/ml)、epinephrine (0.5 μ g/ml)、triiodothyronine (6.5ng/ml)、transferrin (10 μ g/ml)、retionic acid (0.1ng/ml)、gentamicin(50 μ g/ml)、amphotericin B (50ng/ml)を含むBEGM培地1mlを各wellに加えた。培養は37°C、5%CO₂下で行い、培地は48時間おきに交換した。BEGM培地およびその添加剤はClonetics社製を、他の試薬、培地はLife Technologies社製を用いた。培養を開始して3日後または18日後にアデノウイルスベクター(Ad5-CMV-lacZ)による遺伝子導入に供した。

培養開始3日目、チンパンジー気管支組織を、ディッシュからコニカルチューブに移し、培地

で洗浄した後、培地で希釈した Ad5-CMV-LacZ 5 \times 10⁸、1 \times 10⁸、1 \times 10⁷ pfu/ml の Ad5-CMV-lacZ 100 μ l に 37°C、5%CO₂ 下で 1 時間暴露した。なお、これら Ad5-CMV-LacZ のチンパンジー上皮細胞に対する multiplicity of infection(moi)は、およそ 800、160、16 と推定された。また対照群では培地 100 μ l を加え同様の操作を行った。組織数は 5 \times 10⁸ pfu/ml 暴露群が 3 ケ、他の群は 5 ケであった。1 時間暴露の後、気管支組織を培地で洗浄し、24 時間培養を行った。

遺伝子導入は、24 時間の培養が終わった後、X-gal 染色によって LacZ 遺伝子発現を検出して評価した。X-gal 染色は、組織を 0.5% glutaraldehyde で固定した後、1mM MgCl₂ を含む PBS で 2 回洗浄し、直前に調製した X-gal (Sigma Co.)1mg/ml を含む 5mM K₃Fe(CN)₆、5mM K₄Fe(CN)₆ 溶液で 4 時間染色した。この後、パラフィン方理を行い、3 μ m 厚の切片を切り出し、ケルンエヒトロートで 2 重染色を行った。

チンパンジー気管支組織の培養開始後 18 日目の遺伝子導入も、同様にして行った。ただし、暴露した Ad5-CMV-Lac の濃度は、1 \times 10⁸、1 \times 10⁷ pfu/ml の 2 用量であった。組織数は 1 \times 10⁸ pfu/ml 暴露群が 4 ケ、1 \times 10⁷ pfu/ml 暴露群と対照群は 3 ケであった。

なお、チンパンジーの対照動物として 3 ヶ月齢の雄性 C57BL マウス (体重 22-27 g) 5 匹を用いて Ad5-CMV-lacZ による遺伝子発現を調べた。ペントバルビタールナトリウム (ネンブタール®注射液) 10 mg/kg 麻酔下、気管を摘出した。気管を 1 mm 間隔で横断し、1 匹あたり 3 ケ、合計 15 ケの気管組織片を、チンパンジー気管支組織片と同様の方法で器官培養し、培養開始後 3 日に Ad5-CMV-lacZ による遺伝子導入実験を行った。暴露した濃度は 1 \times 10⁸、1 \times 10⁷ pfu/ml で、対照群を含め各群の組織数は 5 ケであった。

結果および考察

Ad5-CMV-lacZ を暴露しても、培養3日目のチンパンジー気管支上皮に LacZ 遺伝子発現はいずれの暴露量においても認められなかった。一方、Ad5-CMV-lacZ を暴露すると、培養18日目の気管支上皮には LacZ 遺伝子発現がすべての培養組織において認められた (Fig. 1)。LacZ 遺伝子発現率に関して、暴露量間で明らかな差は観察されなかった。なお、マウスの培養3日目の気管上皮においては、LacZ 遺伝子発現はいずれの暴露量においても認められなかった。本実験において、チンパンジーの培養気管支上皮を用いてアデノウイルスベクターによる遺伝子導入を検討したところ、培養3日目と培養18日目との間で、遺伝子導入に差異が認められた。培養3日目の気管支上皮は、既存の上皮と新生上皮とが混在している。一方、培養18日目の気管支上皮は、線毛を有する再生細胞からなっている。このように、培養時間によって上皮細胞および組織が変化している。アデノウイルスベクターによる遺伝子導入においてみられた培養3日目と18日目との違いは、暴露時の上支細胞あるいは組織の性質に起因していると考えられる。なぜ、遺伝子発現に差が発生したかを、微細構造レベルで検討する予定である。

実験2：ES細胞樹立のための採卵法の検討

材料および方法

チンパンジーを用いた実験はすべて実験審査委員会の承認を得て行なった。

i) チンパンジーの月経周期と性ホルモンの検討

成獣雌2頭 (イヨ 25才、レム 21才) を用いた。約2回の月経周期の尿中におけるLH、エストラジオール(E₂)、プレグナンジオールを測定し、性皮腫脹の観察を行った。

ii) ヒト用経膈超音波診断装置適用の検討及び自然周期の卵胞サイズの検討

成獣雌12頭を用いた (ヒトミ 31才、ロマン 29才、クミコ 25才、コイコ 25才、レム 21才、アキナ 16才、ヨウコ 13才、チコ 12才、ヨシエ 12才、ヨシズ 11才、クッキー 11才、アラレ 11才)。性皮腫脹の程度とその個体の平均的な月経周期より排卵前の時期を推定し、卵胞観察日を設定した。自然周期における卵胞サイズを測定は麻酔下にて行った。

麻酔は塩酸ケタミン単独の筋注(動物用ケタラール、1.4 ml/body(体重 20-60kg)、三共)で行った。その際の麻酔薬投与はほとんどの個体で positive reinforcement training による自発的な受け入れにより行った。

麻酔導入後、経膈超音波診断装置(持田 SONOVISTA MSC および ALOKA SSD1000)の経膈プローベに経膈プローベ用カバーを装着し、静かに膈内に挿入した。縦断面にて子宮を確認した後に横断面で卵巣および卵胞の観察を行い、卵胞径の測定を行った。

2例では排卵日を推定するために、尿中のLHを簡易型の定量法(ハイゴナピス、持田製薬)で測定し、LHサージが起こったか否かを判定した。

iii) 過排卵刺激法の検討

i)において月経周期を確認した成獣雌1頭(イヨ 25才)を用い、GnRHa と hMG-hCG を併用した long protocol で卵巣刺激を行った。月経初日あるいは2日目に GnRHa (酢酸リュープロレリン、3.75 mg、武田薬品工業)の皮下投与を麻酔下に行った。hMG(150または300 IU、オルガノン)の筋肉内投与は採卵日から逆算し9日前に開始し、その後にhCGの投与を行い、その34~36時間後に採卵を実施するプロトコルを立てた。

実際のhCG投与のタイミングはii)で得られ

た成熟卵胞径の結果から、主席卵胞の長径と短径の平均径が 17mm 以上で hCG を投与することとした。そのため、hMG 投与開始後より 1 日置きに麻酔下の経膈超音波観察を行った

結果および考察

i) チンパンジーの月経周期と性ホルモンの検討

性皮腫脹の消退の 1~2 日前に LH サージが起り、さらにその 1 日前にエストラジオールの上昇が確認された。また性皮腫脹の消退と共にプレグナンジオールの増加が認められた (Fig. 2A)。この結果はこれまでの報告と一致し、次に行う実験の基礎データとして活用できた。

ii) ヒト用経膈超音波診断装置適用の検討及び自然周期の卵胞サイズの検討

性皮腫脹したチンパンジーに対してヒト用経膈プローベは短いものの、子宮や卵巣および卵胞の観察に十分対応できた (Fig. 3)。

卵胞サイズを測定した結果、LH サージの当日において、1 例では長径 22 mm、短径 15 mm (平均径 18.5 mm)、別の 1 例では長径 18 mm、短径 12 mm (平均径 15 mm) であった。またこのうちの 1 例は翌日の超音波検査で卵胞が見られず、排卵が確認された。超音波検査の翌日に性皮腫脹が消退した 1 例 (LH サージは未確認) では卵胞の長径が 21 mm、短径が 19 mm (平均径 20 mm) であった。

これまでチンパンジーの成熟卵胞の大きさに関して、報告がなされていない。本実験において、チンパンジーの成熟卵胞は 20 mm ほどであり、ヒトとほぼ同じ大きさであることが明らかになった。また、この成績より過排卵刺激法での hCG 注射のタイミングは、卵胞径 17 mm 以上 (ヒトの基準) のときがよいと判断された。

iii) 過排卵刺激法の検討

GnRHa の投与による flare-up で性皮が一時

的に腫脹し、尿中 LH、尿中 FSH は一過性の増加がみられた。その後は down-regulation により性皮腫脹、尿中 LH、尿中 FSH とも抑えられた (Fig. 4)。

今回は hMG による卵巣刺激を開始するに先立ち、GnRHa を追加投与した (作用期間の 4 週間を超える可能性があったため)。hMG 投与 (300IU) 開始後 4 日目に径が約 3 mm の卵胞が複数個認められた。そこで hMG を 150IU にして卵巣刺激を続けたが主席卵胞のサイズは投与開始後 7 日後で 5 mm、10 日目で 8 mm、12 日目で 10 mm、14 日目で 12 mm であり、ヒトに比して卵胞の発育に時間を要した。そこで 15 日目より hMG を再び 300IU にして卵巣刺激を続けた。その結果 16 日目に平均径が 13.5 mm の主席卵胞と 1~2 mm 小さい卵胞が 2 個、18 日目に平均径 15.5 mm の主席卵胞と若干小さい卵胞 2 個が確認された (Fig. 2B)。20 日目に卵胞を確認しようとしたものの、卵胞は存在しなかった。血中の FSH と E_2 が 16 日目にピークに達していることより (Fig. 5)、19 日目に LH サージが起り、20 日目には排卵したものと思われた。

今回、LH サージが起き卵を得るまでに至らなかったが、ヒト IVF で使用されている過排卵刺激法が適用できると考えられた。今後、複数の成熟卵を採取するために、ホルモン剤の投与量や投与期間を検討する。

結論

チンパンジーを用いた遺伝子治療用ベクターの in vitro 評価技術系の開発を行い、次の結果を得た。

1) 器官培養 3 日目あるいは 18 日目の気管支上皮に、Ad5-CMV-lacZ を暴露したところ、3 日目の上皮に LacZ 遺伝子は発現しなかったが、18 日目の上皮には発現した。この結果、培養の時期によって遺伝子の発現が異なることが明らかになった。

2) チンパンジーES細胞樹立のために、採卵の方法を検討した。月経周期と性ホルモン動向との基礎データを取り、ヒト用超音波診断装置による経膈採卵の技術を導入した。また、過排卵刺激法の予備的な検討を行った。

研究発表

なし

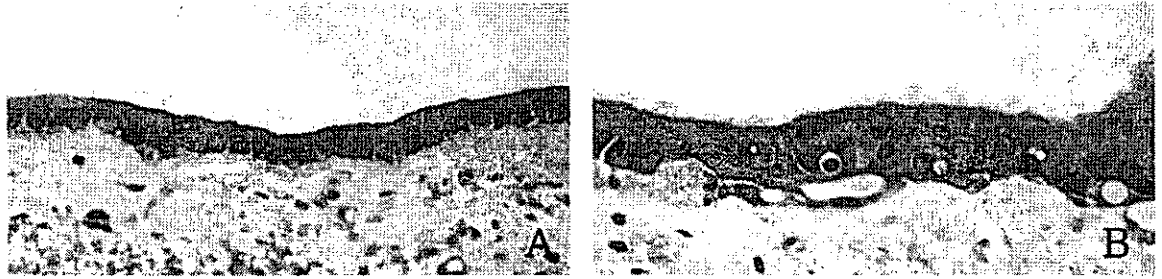


Fig. 1 Ad5-CMV-lacZ によるチンパンジー培養気管支上皮への遺伝子導入
 A : 培養 3 日目暴露 B : 培養 18 日目暴露

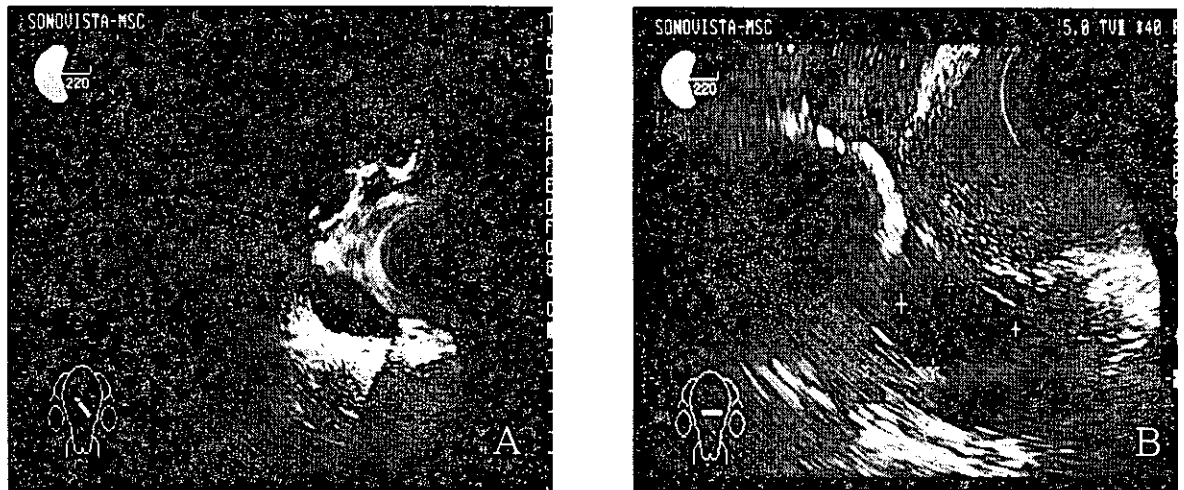


Fig. 2 経膈超音波装置により得られたチンパンジー卵胞の画像
 A : 自然周期における成熟卵胞
 B : 過排卵刺激により成育した複数の卵胞

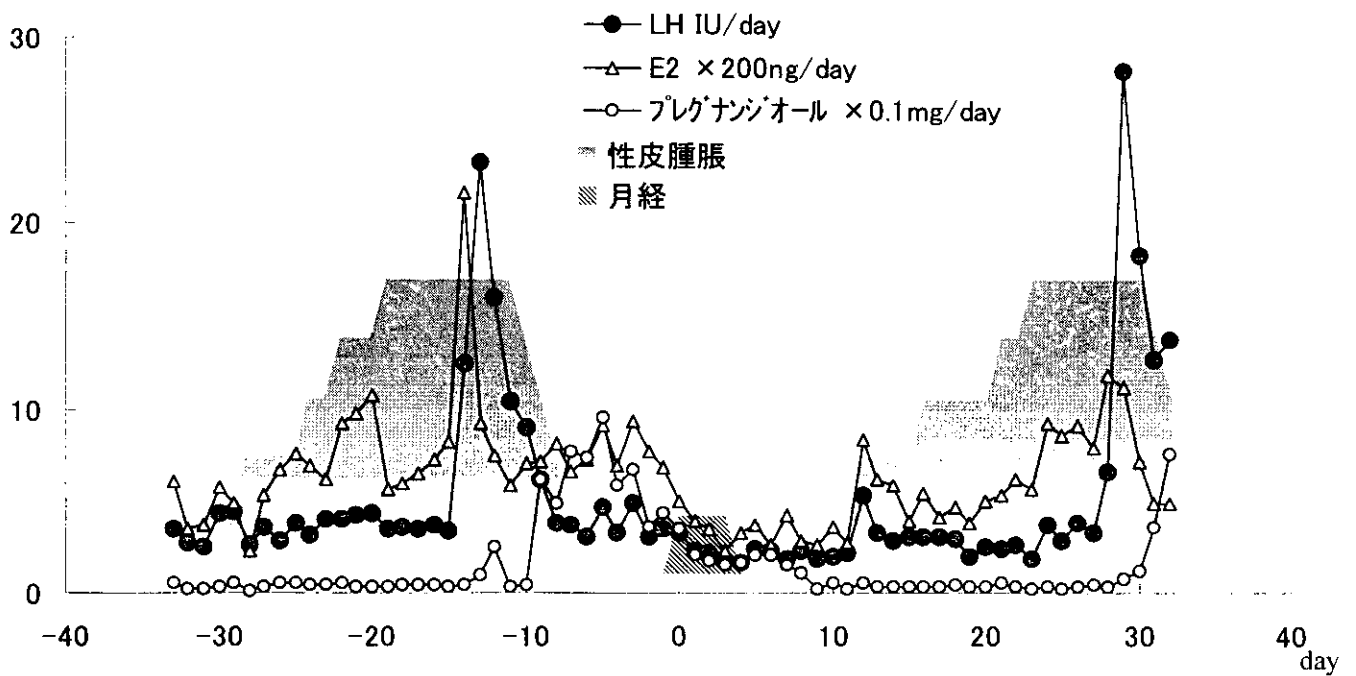


Fig. 3 チンパンジーの月経周期における尿中ホルモンの変化

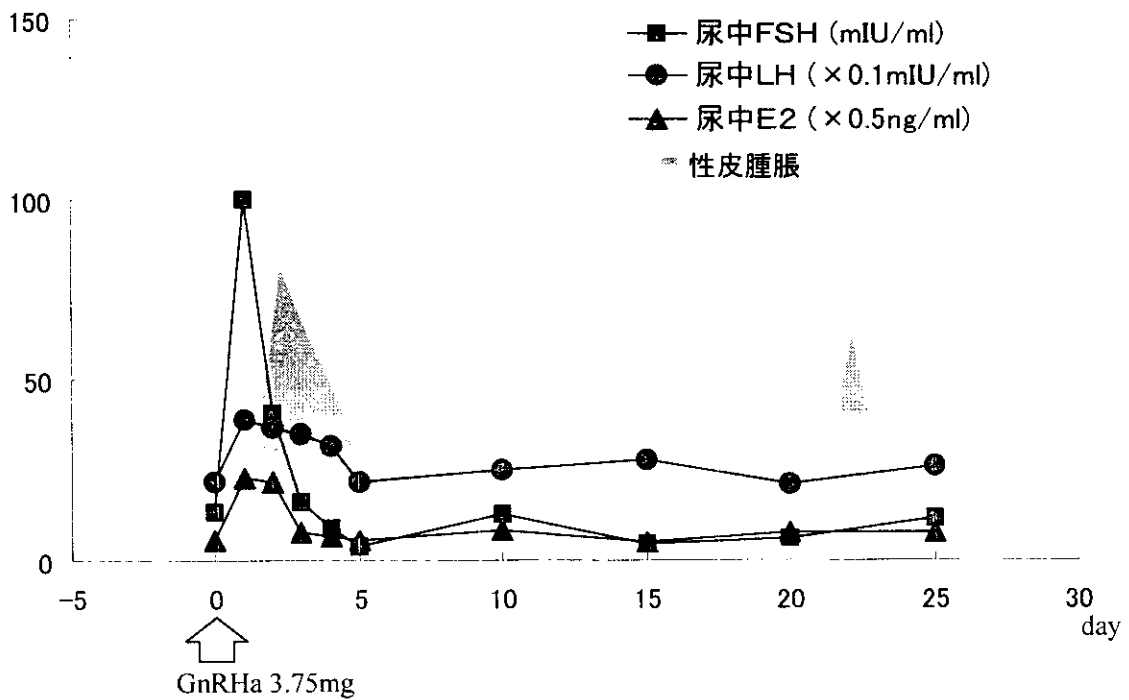


Fig. 4 GnRHα 投与による尿中ホルモンと性皮腫脹の変化(flare-up と down-regulation)

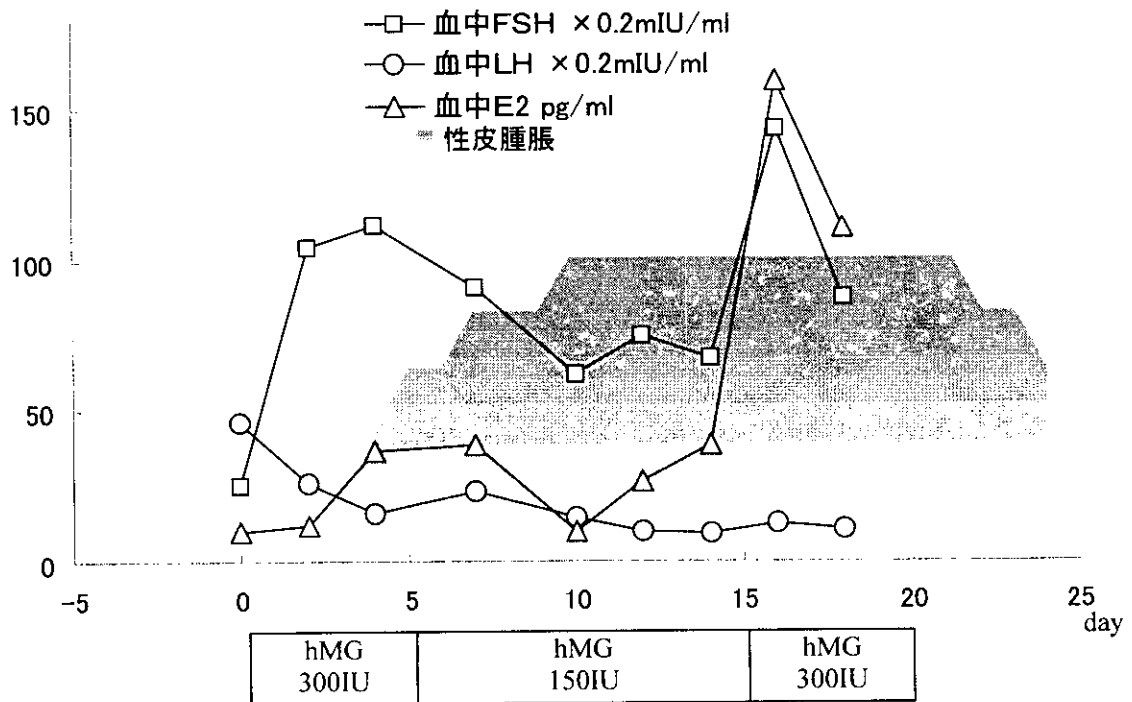


Fig. 5 hMG 過排卵刺激による血中ホルモンと性皮腫脹の変化

イヌの自然発生腫瘍に対するアデノウイルスベクターを用いた p53 遺伝子治療

分担研究者 辻 本 元

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

研究要旨

本年度は、イヌ p53 遺伝子発現アデノウイルスベクターの *in vitro* における抗腫瘍効果の検討を行うとともに、その腫瘍症例に対する試験的臨床応用を試みた。その結果、1) AxCA-cp53 がイヌの腫瘍細胞株に対して増殖抑制効果を持つことが示され、その腫瘍症例に対する遺伝子治療への臨床応用が期待された。また今回、p53 遺伝子の変異を持たない腫瘍細胞株に対しても AxCA-cp53 が増殖抑制効果を示したことから、AxCA-cp53 が p53 遺伝子に変異を持たない腫瘍症例に対して有効性を示す可能性があるものと考えられた。2) 肺癌症例においては、超音波検査下でその胸腔内腫瘍に AxCA-cp53 10^{10} PFU/5 ml を注射した。ウイルスの投与自体による副作用は認められなかったが、本症例は投与時点で DIC を併発しており、投与 2 週後に斃死した。剖検では、腫瘍の中心に組織の溶解がみられたが、ウイルスの投与によるものかどうかは不明であった。また、斃死 1 日後にししか剖検を行えなかったため、p53mRNA およびその蛋白の発現を検討することはできなかった。

A, 研究目的

近年、伴侶動物は寿命の延長からヒトと同様に老人病や癌の発生が高くなり、従来の治療法以外に遺伝子治療のような先端医療の試みが開始されつつある。今年度はイヌの腫瘍を対象に、*ex vivo* 評価のためのツール開発、評価法の作成、及び臨床例を用いて *in vivo* での遺伝子デリバリー系開発と評価基準の作成を試みた。

B・C、研究方法と結果

(1) イヌ p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター (AxCA-cp53) の *in vitro* における抗腫瘍効果の検討: AxCA-cp53 の *in vitro* における抗腫瘍効果の検討について、イヌの骨肉

腫瘍細胞株 (HOS、OOS) および乳腺腫瘍細胞株 (cHMP、cIPm、cNMm) を用いて行った。イヌ腫瘍細胞株に対するアデノウイルスの感染効率については、アデノウイルスベクターに LacZ 遺伝子を組み込んだ AxCA-LacZ を用い、X-gal 染色を行うことによって検討した。次いで、AxCAcp53 をイヌの腫瘍細胞株に MOI 100 および MOI 500 で接種し、その後 5 日間、細胞数および細胞生存率を測定することによってその抗腫瘍効果を検討した。

感染効率は用いた細胞株によって異なり、X-gal 染色陽性率が 100%に達する MOI は今回用いた細胞株では 50~500 であった。また、X-gal 染色陽性率はウイルス量依存的

に上昇した。いずれの腫瘍細胞株に対しても AxCA-cp53 は明らかな増殖抑制効果を示し、腫瘍細胞の生存率の低下を誘導することが観察された。これらの効果は感染させたウイルス量に依存的であった。また、腫瘍細胞に対する AxCA-cp53 増殖抑制効果は、腫瘍細胞の p53 遺伝子の変異の有無には関わりなく認められ、またその効果はウイルスの感染効率に依存することが示された。以上から、AxCA-cp53 がイヌの腫瘍細胞株に対して増殖抑制効果を持つことが示された。また p53 遺伝子の変異を持たない腫瘍細胞株に対しても AxCA-cp53 が増殖抑制効果を示した。

(2) AxCA-cp53 の腫瘍症例に対する試験的臨床応用：これまでに 2 例のイヌの悪性腫瘍症例（肺癌症例 1 例および乳腺腫瘍症例 1 例）に対して AxCA-cp53 の投与を行い、遺伝子治療における基礎的知見を得た。

肺癌症例においては、超音波検査下でその胸腔内腫瘍に AxCA-cp53 10^{10} PFU/5 ml を注射した。ウイルスの投与自体による副作用は認められなかったが、本症例は投与時点で DIC を併発しており、投与 2 週後に斃死した。剖検では、腫瘍の中心に組織の溶解がみられたが、ウイルスの投与によるものかどうかは不明であった。また、斃死 1 日後にしか剖検を行えなかったため、p53mRNA およびその蛋白の発現を検討することはできなかった。

乳腺腫瘍症例（PCR-SSCP では p53 遺伝子の変異無し）においては、AxCA-cp53 10^{11} PFU/2.5 ml を乳腺腫瘍内に 1 回投与した（右側乳腺 3, 4, 5 番の腫瘍のうち 4 番）。投与による副反応は認められなかった（発熱を呈さず、肝酵素、腎機能に変化を認め

なかった）。血中には投与後 10 分の時点で AxCA-cp53 が PCR 法によって検出され、少なくとも 3 日目までは陽性を示した。6 日後には検出限界以下であった。一方、尿中への AxCA-cp53 の排出は検出されなかった。腫瘍は投与 3 日後の時点でやや縮小し色調も改善したが、7 日後には投与時点と同程度の大きさであった。投与 7 日後に右側乳腺の全摘出を行い、AxCA-cp53 ゲノムの検出、ウイルス由来 p53 mRNA の検出、および P53 蛋白の免疫染色を行った。AxCA-cp53 ゲノムは投与部位（4 番）とともに他の乳腺腫瘍からも検出された。付属して摘出した皮膚からは検出されなかった。ウイルス由来 p53 mRNA はこれら乳腺腫瘍組織からは検出されず、その付属リンパ節からのみ検出された。

D、考察

1) 以上の結果から、AxCA-cp53 がイヌの腫瘍細胞株に対して増殖抑制効果を持つことが示され、その腫瘍症例に対する遺伝子治療への臨床応用が期待された。また今回、p53 遺伝子の変異を持たない腫瘍細胞株に対しても AxCA-cp53 が増殖抑制効果を示したことから、AxCA-cp53 が p53 遺伝子に変異を持たない腫瘍症例に対して有効性を示す可能性があるものと考えられた。

2) 臨床例ではウイルス由来 p53 mRNA はこれら乳腺腫瘍組織からは検出されず、その付属リンパ節からのみ検出された。ウイルス由来 p53 mRNA が投与部位の腫瘍で検出できなかった理由は不明であるが、壊死による RNA の変性、および投与してから検出するまでの時間経過が関与していたものと考えられる。また投与量が腫瘍の容積と比較

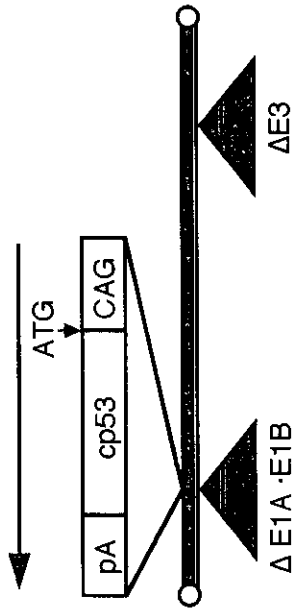
して多く、腫瘍周囲の皮下や血中に漏出した可能性もあげられる。ウイルス蛋白の免疫染色においても同様に付随リンパ組織においてのみ陽性反応を示す細胞が検出され

た。以上の投与経験をふまえ、AxCA-cp53 投与方法および投与量について検討を進めるとともに、試験的 *p53* 遺伝子治療が可能な腫瘍症例の検索に努めている。

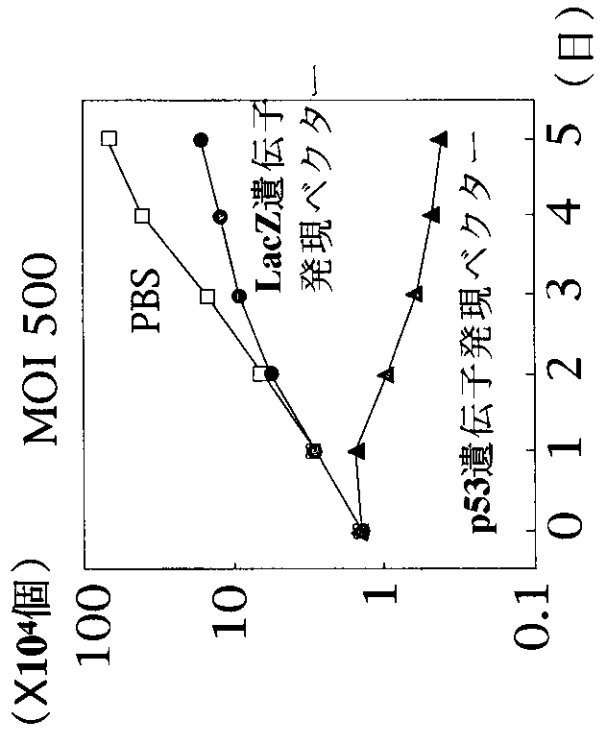
イヌの自然発生腫瘍に対するアデノウイルスベクターを用いた

p53遺伝子治療

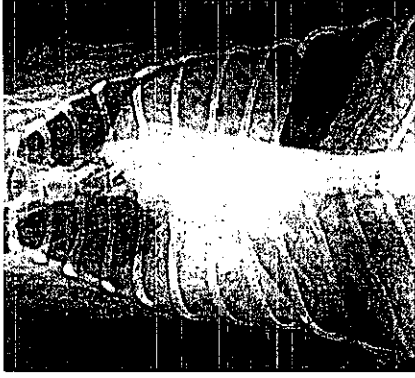
イヌp53遺伝子発現アデノウイルスベクター



骨肉腫腫瘍細胞株に対する細胞増殖抑制効果



腫瘍症例への投与



レントゲン所見

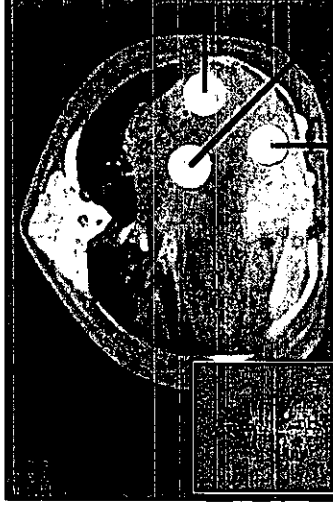


エコー下でのウイルスの投与



アイソレーター中での隔離

CTによる投与部位の決定



20010439

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。