

胆管異型上皮の有無およびHMGA 1 免疫染色の発現分布を検討する。

②肝内胆管癌培養細胞 2 種類 (HuCCT1,HuH28) にて作製した標本を用いて

HMGA 1 およびhLAT1,4F 2 hcの免疫染色を行い発現の有無を検討した。

C. 研究結果

①症例 1 では細胆管増生部位や小葉間胆管で HMGA 1 の発現がみられた。症例 2 では細胆管増生部位および結石存在部胆管周囲腺で HMGA 1 の発現がみられた。2 症例とも肝萎縮所見は認めず、胆管上皮に異型上皮所見は認められない。

②HuCCT 1 ではHMGA 1 およびhLAT1,4F 2 hc の高発現がみられた。HuH28は今回HMGA 1 の検討ができなかったが、hLAT1,4F 2 hcの高発現がみられた。

D. 考案

①切除肝標本はいずれも肝萎縮は認めないが、結石近傍や狭窄部でHMGA 1 が発現分布していることより悪性形質の獲得時期を考慮し、肝内結石症の治療法として可能な限り病変胆管を含めた肝切除術が治療の第一選択として妥当な治療と考えられる。切除断端の評価に十分注意すべきである。PTCSによる切石療法では、長期的な経過観察が必要と思われる。

②肝内胆管癌の培養細胞株でHMGA 1 および

hLAT1,4F 2 hcの発現がみられた。ただし、HuH28でのHMGA 1 の発現の有無は再検討を要す。今後これらの培養細胞株を用いて、hLAT 1 の機能発現の確認やhLAT 1 阻害剤の使用による腫瘍増殖抑制を検討する。

E. 結論

①今回の検討で、悪性形質の獲得時期と関連の強いHMGA 1 の発現がそれぞれの切除肝標本の肝内胆管の増生した細胆管部位や結石近傍や狭窄部位に分布して見られた。また、これまでの検討症例を含めて肝内結石症症例で非癌合併例の 8 例中 4 例 (50%) でHMGA 1 の発現が認められた。

②悪性形質の獲得時期と関連の強いHMGA 1 およびhLAT1,4F 2 hcの発現が肝内胆管癌由来の 2 種類の培養細胞株でみられることより、肝内結石症を背景とした胆管癌の発癌との相同性があると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

H. 知的財産権の出願登録状況

特になし

肝内結石症発癌症例のトランスポーター等発現の変化に関して

研究協力者 海野倫明

東北大学大学院 医学系研究科 外科病態学講座 消化器外科分野

研究要旨

われわれは有機アニオントランスポーター OATP群の一つ、Liver specific organic anion transporter -2 (LST-2) を単離し、その機能解析を進めている。その一つとしてリトコール酸 (LCA) が取り込まれCOX-2の転写が活性化されることがわかっており、われわれはLST-2がLCAを取り込むので癌化との関係が示してきた。今回の検討では、LST-2の肝内結石症における肝内胆管癌の発癌に関与は今回の検討では解明でなかったが、症例の追加で解明していきたい。また、gefinitibは胆管癌細胞株に対しても感受性の差はあるもののアポトーシス誘導機構は同様であり、今後も詳細な検討が必要である。

A. 研究目的

血中からの胆汁酸の取り込みのうち、主にタウロコール酸 (TCA) は、Na依存性に輸送するNTCPが担っており、残りの胆汁酸、各種ステロイドホルモン、甲状腺ホルモン、さらには抗生物質など外因性物質の取り込みには、Na非依存性に輸送するorganic anion transporter polypeptide (OATP) が重要な役割を果たしている。

当科では、このOATP群の一つ、Liver specific organic anion transporter-2 (LST-2) を単離し、その機能解析を進めている。その一つとしてリトコール酸 (LCA) が取り込まれCOX-2の転写が活性化されることがわかっており、われわれはLST-2がLCAを取り込むので癌化との関係が示してきた。さらにLST-2が乳癌とおよび大腸癌と予後が関連することを示してきた。そこで肝内結石症における発癌との関係を免疫染色にて検討するとともに、予後不良である肝内胆管癌の治療成績向上のため、標的治療薬のひとつであるgefinitibの肝内胆管癌細胞株における感受性などを検討し、今後の治療への架け橋となるべく基礎研究を行った。

B. 研究方法

1. 肝内結石症症例と肝内胆管癌合併肝内結石症のLST-2, COX-2の免疫染色
2. gefinitibの胆管癌細胞株 (TFK-1, HuCCT1) に対する感受性をMTSアッセイにて検討
3. gefinitibによるTFK-1に対するアポトーシスをTUNELにて検討。
4. gefinitibによるTFK-1におけるp27, Jab1の変化をWestern blotにて検討。
5. 肝内結石症症例と肝内胆管癌合併肝内結石症のLST-2, COX-2, p27, Jab1の免疫染色

C. 研究結果

LST-2 およびCox-2の発現

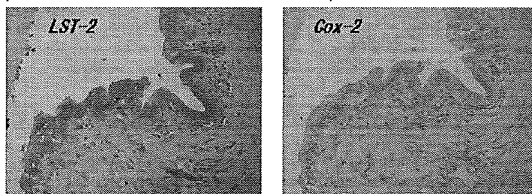
1990年-2004年の期間に当科で手術施行された肝内結石症のうち、肝内胆管癌 (ICC) 合併症例3例を含む9例に対して (表1)、LST-2及びCox-2の免疫染色を施行した (図1)。図1Aの肝内結石症症例では胆管上皮細胞にLST-2の発現を認めるが、Cox-2の発現は認められなかった。図2Bの肝内胆管癌合併肝内結石症の免疫染色ではLST-2の発現は認められるが、Cox-2は間質のみ発現を認

手術年	手術月	年齢	性別	診断
1999	2	83	F	hepatolithiasis with ICC
1999	8	75	M	hepatolithiasis with ICC
1992	12	56	M	hepatolithiasis with ICC

手術年	手術月	年齢	性別	診断
2001	5	48	F	hepatolithiasis
1998	6	40	M	hepatolithiasis
1996	5	63	M	hepatolithiasis
1996	7	73	M	hepatolithiasis
1994	6	69	F	hepatolithiasis
1994	10	72	F	hepatolithiasis

表1. 対象症例

A. Expression of LST-2& Cox-2 in Hepatolithiasis



B. Expression of LST-2& Cox-2 in Hepatolithiasis with ICC

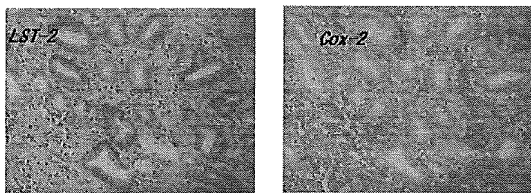


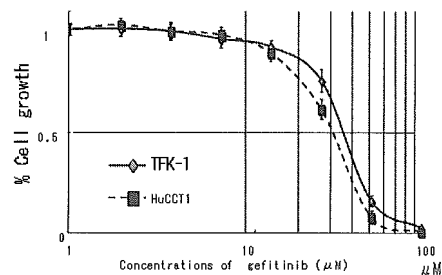
図1. LST-2およびCox-2の発現

めるため陰性と判断した。その結果を表2にまとめて見ると、今回検討した9例全てがCox-2の発現を免疫染色上確認できず、肝内胆管癌とLST-2およびCox-2の相関を検討することは出来なかった。

胆管癌細胞株に対する gefinitib の感受性およびアポトーシス (図2)

胆管癌細胞株TFK-1 およびHuCCT1 を用いてMTSアッセイ法を持ちいて感受性を検討した(図2A)。その結果、TFK-1 およびHuCCT1 とも感受性はほぼ同等で、IC50は30μM前後であり、感受性の高い肺癌細胞と比較すると約100倍程度感受性の差があった。しかし、感受性の差はあるもののdose dependentにアポトーシスが認められ(図2B)、gefinitibが機能的に働いていることが示唆され

A. TFK-1: 胆管癌細胞以下部, HuCCT1: 肝内胆管癌細胞株



B. Flowcytmetric TUNEL: TFK-1

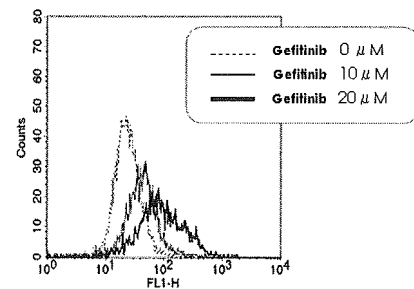


図2

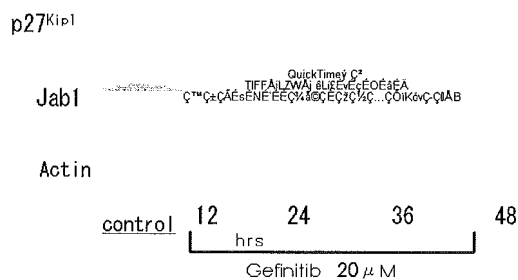


図3. gefinitibによるp27およびJab1の発現変化

た。

gefinitibによるp27およびJab1の発現変化

gefinitibがアポトーシスを誘導するときにp27が増加することは既にわかっており、そのことを確認するとともに、p27の発現をp27の蛋白安定化と考え、関与するJab1の変化を同時にWestern blotで確認した。その結果、図3の通りJab1が減少するとともにp27が増加して、p27の発現にJab1が関与していることが示唆された。

肝内胆管癌合併肝内結石症におけるp27およびJab1の発現の検討(図4、表3)

LST-2、Cox-2の発現と同様の症例にてp27およびJab1の発現を免疫染色にて検討した。これま

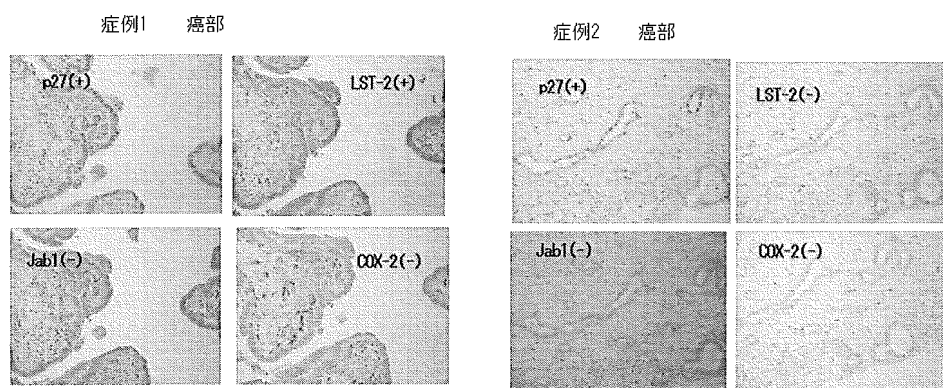


図4. ICC合併肝内結石症のp27, Jab1, LST-2, Cox-2の免疫染色

手術年	手術月	年齢	性別	診断	LST-2	Cox-2
1999	2	83	F	hepatolithiasis with ICC	+	-
1999	8	75	M	hepatolithiasis with ICC	-	-
1992	12	56	M	hepatolithiasis with ICC	-	-

手術年	手術月	年齢	性別	診断	LST-2	Cox-2
2001	5	48	F	hepatolithiasis	-	-
1998	6	40	M	hepatolithiasis	-	-
1996	5	63	M	hepatolithiasis	-	-
1996	7	73	M	hepatolithiasis	-	-
1994	6	69	F	hepatolithiasis	-	-
1994	10	72	F	hepatolithiasis	+	-

表2. LST-2および Cox-2の免疫染色のまとめ

での考えを総合すると、癌部においてはCox-2およびJab1が上昇し、p27およびLST-2が低下することになるが、実際は統一した見解が得られなかった(表3)。

D. 考察

LST-2が予後と相関することから研究を展開してきた。現在のところ乳癌、大腸癌では予後と相関する結果が出ており、胆汁酸のおよび炎症の関与する胆管上皮であれば、LST-2と何らかの関与が解明できると考えてきた。しかし、今回の検討では、免疫染色による結果が統一できるほど症例が集まらず、結論を出すまでには至らなかった。今後、症例を積み重ね、肝内結石症における肝内胆管癌の発癌

について検討を加えていきたい。

また分子標的治療薬として一躍有名になったgefitinibは、現在のところ肺癌にのみ適応があり、しかもLynchらの報告によりEGFRのexon19、21インフレームに遺伝子欠損例が高感受性であることが解明され、腺癌、女性、非喫煙者、日本人(東洋人)のみが適応となるかに思えた。しかし、上記変異を持っていても感受性の無いものや、Mellinghoffらのglioblastomaの報告でEGFR variant IIIおよびPTENが感受性に関与するなど、未だ分子標的治療薬の感受性には検討の余地が残されている。そのため、胆管癌に対する検討も施行しなければならないと考えている。

	手術年	手術月	年齢	性別	診断	LST-2	Cox-2	p27	Jab1
症例1	1999	2	83	F	hepatolithiasis with ICC	+	-	+	-
症例2	1999	8	75	M	hepatolithiasis with ICC	-	-	+	-
	1992	12	56	M	hepatolithiasis with ICC	-	-	-	-

	手術年	手術月	年齢	性別	診断	LST-2	Cox-2	p27	Jab1
	2001	5	48	F	hepatolithiasis	-	-	-	-
	1998	6	40	M	hepatolithiasis	-	-	-	-
	1996	5	63	M	hepatolithiasis	-	-	-	-
	1996	7	73	M	hepatolithiasis	-	-	-	-
	1994	6	69	F	hepatolithiasis	-	-	-	-
	1994	10	72	F	hepatolithiasis	+	-	-	-

表3. LST-2, COX-2, p27, Jab1免疫染色の結果

E. 結論

有機アニオントランスポーター LST-2 の肝内結石症における肝内胆管癌の発癌に関与は現在のところ不明である。また、gefinitibは胆管癌細胞株に対しても感受性の差はあるもののアポトーシス誘導機構は同様であり、今後も詳細な検討が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

H. 知的財産の出願・登録状況

肝内結石症に対するフィブラートによる新しい分子標的治療

研究協力者 正田 純一

筑波大学大学院人間総合科学研究科・消化器内科

研究要旨

ベザフィブラートはABCB4の肝発現レベルを増加させ、また毛細胆管膜への再配分を促すことにより、ヒトの肝細胞における胆汁中へのPCの分泌を促進することが示唆された。ベザフィブラートは毛細胆管膜のABCB4を分子標的として、その発現とその機能を賦活化することで胆汁中へのリン脂質の分泌を促進し、肝内結石症を含む種々のタイプの胆汁うっ滞性肝胆道疾患の有用な治療薬となる可能性があると考えられた。

A. 目的

フォスファチジルコリン（PC）は胆汁中の主たるリン脂質であるが、胆汁中においてコレステロール、胆汁酸とミセルを形成することにより、強い界面活性作用を有する疎水性胆汁酸から胆管上皮を保護している役割を演じている。

近年では肝細胞胆管側膜の透過機構を評価する方法論が確立され、肝より胆汁への分泌機構に関する知見が集積されてきた。肝細胞毛細胆管膜上に発現する輸送担体（トランスポーター）のうち多剤耐性P糖蛋白3（MDR3）あるいはATP binding cassette protein B4（ABCB4）はリン脂質の胆汁排泄を担当することが明らかとなっている（4）。PCトランスロケート活性を有するABCB4によるリン脂質の毛細胆管膜の透過は、胆汁中へのリン脂質分泌の律速段階と考えられている。ノックアウトマウスの解析より、ABCB4の発現および機能の低下した病態では胆嚢や肝内胆管におけるコレステロール胆石のリスクが上昇することが報告されている。また最近ではABCB4の発現および機能の低下により引き起こされる疾病として、進行性家族性胆汁うっ滞症3型（PFIC-3）、妊娠性胆汁うっ滞症、低リン脂質排泄量関連胆石症、原発性肝内結石症が報告

されている（図1）。これら疾患の存在は、リン脂質の胆汁中へのトランスポートの障害と肝胆道疾患の発症・進展との関連性を示す。

ABCB4の発現および機能の異常は胆汁うっ滞症や胆道結石症のリスクファクターとして解釈することが出来る。しかしながら日常臨床において、ABCB4の発現および機能の賦活化を誘導する薬物治療に関しては未だ有効な治療薬は見出されていない。最近の論文では、胆汁酸製剤のウルソデオキシコール酸、脂質代謝改善剤のフィブラート系薬剤やスタチン系薬剤が肝ABCB4の発現や機能を増加させることが動物実験にて報告されている。また少数例ではあるが、肝内胆管の進行性の非化膿性破壊がみられる原発性胆汁性肝硬変においてフィブラートが血中胆道系酵素値を低下させることが報告され、慢性胆汁うっ滞症に対する本剤の有用性が期待される。

B. 方法

肝内結石症に対するフィブラート系薬剤（ベザフィブラート）の有用性について検討を行うために、培養ヒト肝細胞（HepG2）ならびにヒト肝細胞キメラマウスを用いて本剤がABCB4の発現や機能に与

図 1

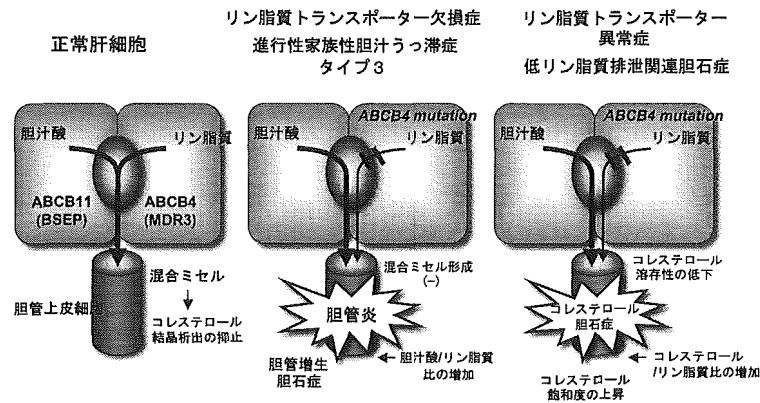


図 1

ABCB 4 の発現異常による胆汁中へのリン脂質分泌の低下は胆管炎や胆石形成を引き起こす

図 2

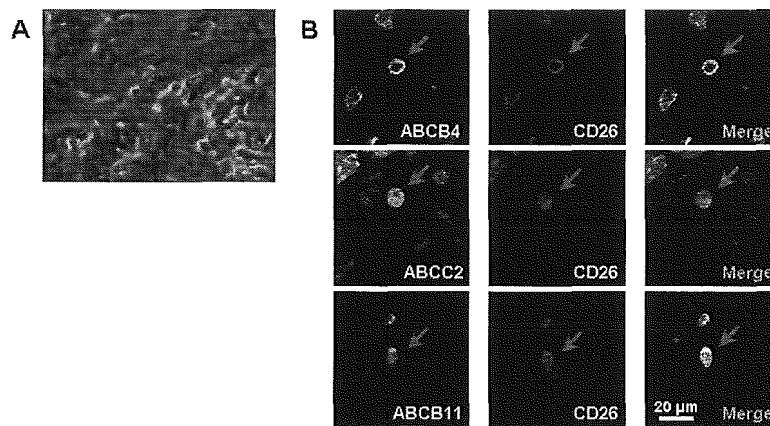


図 2

HepG 2 細胞における毛細胆管膜トランスポーターの発現

える影響についても解析を行った。

C. 結果・考察

HepG 2 細胞における毛細胆管膜トランスポーターの発現

コンフルエント状態のHepG 2 細胞は細胞間隙には異なるサイズの偽胆管を形成する (図 2 A)。ヒトABCB 4 (リン脂質トランスポーター)、ABCC 2 (有機陰イオントランスポーター) とABCB11 (胆汁酸トランスポーター) に対する特異抗体による免疫染色を施すとHepG 2 細胞の偽胆管にはこれ

ら毛細胆管膜トランスポーターが明瞭に染色された (図 2 B)。HepG 2 細胞ではこれらのトランスポーターは、毛細胆管のマーカータンパクであるCD26 と共局在していることが共焦点レーザー顕微鏡による観察にて確認することが出来た (図 2 B)。HepG 2 細胞におけるこれら毛細胆管膜トランスポーターの細胞内局在はヒト肝組織におけるトランスポーターの局在に類似していた。

ABCB 4 の細胞内局在に対するベザフィブラートの効果

HepG 2 の細胞数に対するABCB 4 陽性の偽胆管

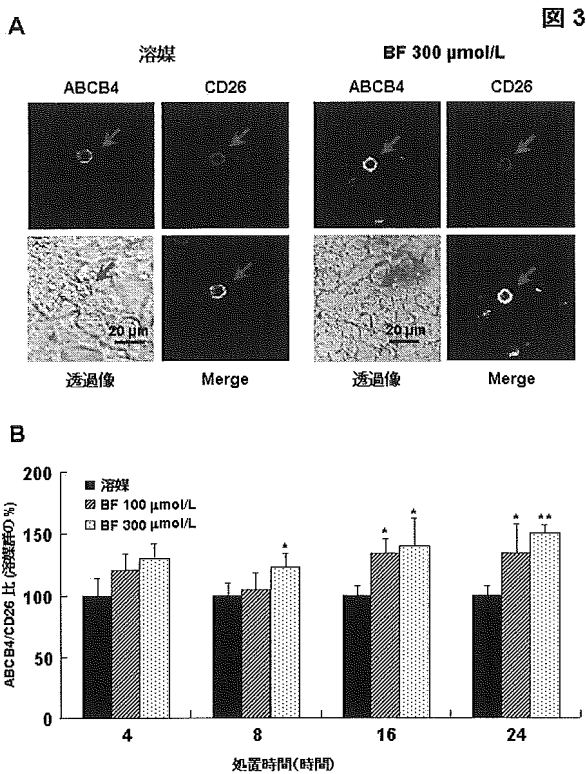


図3
ベザフィブラートによる肝細胞におけるABCB4 (MDR3) の細胞内局在の変化

数は少なく、その比は 0.024 ± 0.003 (平均±標準誤差、6例)であった。ベザフィブラート 300mmol/L の処置を施しても、その比は変化を認めなかった (0.024 ± 0.002 、6例)。しかしながら、ベザフィブラートを添加した細胞において偽胆管におけるABCB4の免疫蛍光量は顕著に増加した(図3A)。ベザフィブラートの 100mmol/L で処置した細胞では16および24時間で偽胆管におけるABCB4の免疫蛍光量が対照群に比べ最大134%まで増加した(図3B)。同様にベザフィブラート 300mmol/L の処置では、8、16および24時間で免疫蛍光量が増加した(図3B)。

C6-NBD-PCの偽胆管への局在変化におけるベザフィブラートの効果

ベザフィブラートによるHepG2細胞のABCB4の機能賦活化を確認するために、蛍光標識リン脂質であるC6-NBD-PCを用いてその偽胆管腔への分

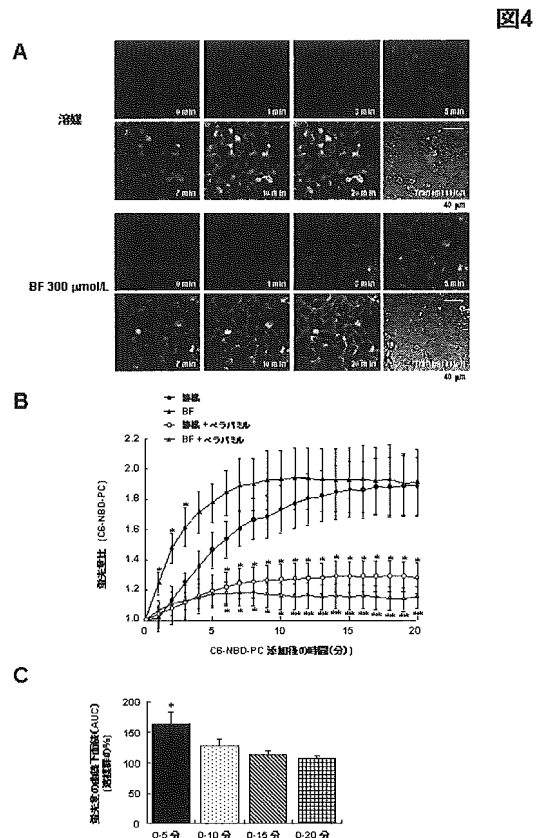


図4
ベザフィブラートによる肝細胞におけるリン脂質輸送と分泌動態の変化

泌動態を観察した。細胞の偽胆管腔への強力な蛍光の蓄積は共焦点レーザー顕微鏡により5から20分で確認された。その蛍光PCの局在部位はABCB4の染色部位にはほぼ一致していた(図4A)。共焦点レーザー顕微鏡を用いて偽胆管腔への蛍光PCの局在の経時変化におけるベザフィブラートの効果について検討した。蛍光PCの添加により蛍光のバックグラウンドが増加することは確認できるが、C6-NBD-PCは偽胆管腔への分配よりも他の細胞膜へ分布し、次に蛍光PCは偽胆管腔へ集積した(図4A)。図4Bに示すように、ベザフィブラートの 300mmol/L の処置はC6-NBD-PCの偽胆管腔への移動を対照群に比し有意に増加させた($P < 0.01$ 、反復測定ANOVA)。偽胆管腔のC6-NBD-PCの集積量はベザフィブラートの処置により3分間で対照群に比し有意に上昇した(図4B)。さらに5分間のPCの毛細胆管への流入量に相当する蛍光量の曲線下面積(AUCと略す)はベザフィブラート処置により

図5

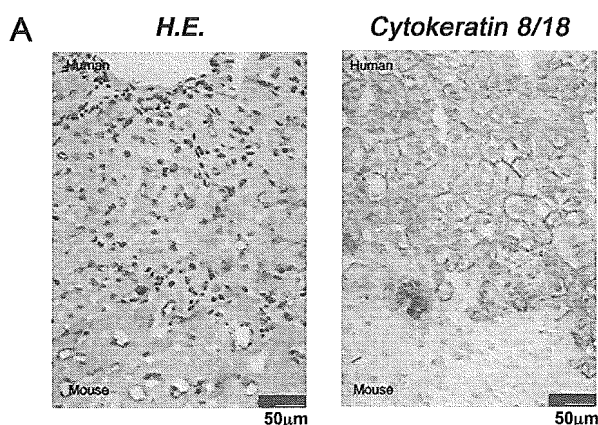


図5

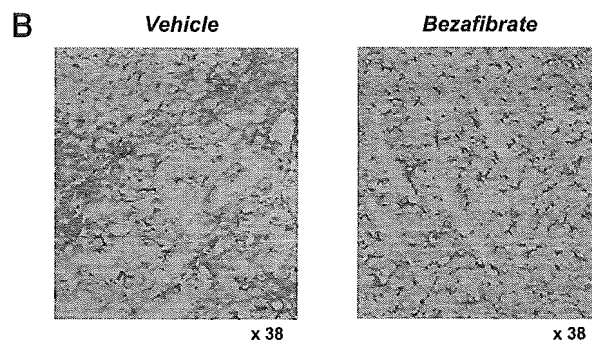


図 5

ベザフィブラートによるヒト肝キメラマウスのABCB 4 (MDR 3) 発現に与える影響

対照群に比し有意に上昇した ($163 \pm 21\%$; $P < 0.05$)。また、10分間においてもベザフィブラート処置群は上昇傾向を示した。 ($120 \pm 15\%$; $P = 0.07$) (図 4 C)。ABCトランスポーターの阻害薬であるベラパミル (50 mmol/L) の処置した細胞では (16、17)、ベザフィブラートにより誘発されるC 6-NBD-PCの偽胆管腔への集積作用が抑制された (図 4 B)。この結果より、ベザフィブラートは偽胆管膜のABCB 4を増加させ、その結果として、PCの偽胆管腔へのトランスポートを促進させることが示唆された。

ヒト肝細胞キメラマウスにおけるABCB 4 発現に与えるベザフィブラートの効果

ベザフィブラートのヒト肝細胞におけるABCB 4の発現レベル (細胞内局在) に与える影響について検討した。in vivoモデルとしてヒト肝細胞キメラマウス (免疫不全と肝不全マウスの交配により作製したマウスの肝臓にヒト肝細胞を移入して作製したヒト肝組織を有するマウス、フェニックス社より購入) を実験に要した。本動物の肝臓においては、ヒトおよびマウス肝細胞の両者が混在するよりヒト肝組織の識別を行うために、ヒトサイトケラチン 8/18抗体を用いた (図 5 A)。ベザフィブラートの1週間の経口投与により、本マウスのヒト肝組織におけるABCB 4 蛋白発現量は顕著に増加した。また免疫組織化学において、ベザフィブラートは肝細胞の

毛細胆管膜におけるABCB 4 発現レベルを顕著に増加させた (図 5 B)。

このことより、ベザフィブラートはヒト肝細胞において、ABCB 4の蛋白合成を増加させるのみならず、ABCB 4 蛋白の胆管膜へのredistributionを増加することより、胆汁中へのリン脂質分泌促進すると考えられた。肝内結石症では肝ABCB 4の発現低下によるリン脂質の肝内輸送ならびに胆汁排泄機構にかかわる異常が存在することが明らかとなっている。本症におけるベザフィブラートの使用は胆汁中へのリン脂質の分泌増加は胆汁酸とのミセル形成を安定化し、疎水性胆汁酸による胆管上皮細胞の障害を軽減し、胆管炎の病態を改善しうるものと考えられた。

D. 結論

ベザフィブラートはABCB 4の肝発現レベルを増加させ、また毛細胆管膜への再配分を促すことにより、ヒトの肝細胞における胆汁中へのPCの分泌を促進することが示唆された。ベザフィブラートは毛細胆管膜のABCB 4を分子標的として、その発現とその機能を賦活化することで胆汁中へのリン脂質の分泌を促進し、肝内結石症を含む種々のタイプの胆汁うっ滞性肝胆道疾患の有用な治療薬となる可能性があると考えられた。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究業績

1. Yamamoto, M., Shoda, J.: Inchin-ko-to and its ingredients as a potential therapeutic approach for the treatment of cholestatic liver diseases. *Drugs of the future* 30:1092-1101, 2006.
2. Shoda, J., Osuga, T.: Molecular pathogenesis of hepatolithiasis - A type of low phospholipid-associated cholelithiasis. *Frontiers in Bioscience* 11:669-675, 2006.
3. Shoda, J., Tanaka, N., Osuga, T.: Epidemiology and molecular pathogenesis of primary hepatolithiasis. In: *The Proceedings of Falk Symposium 139 × Gallstones: Pathogenesis and Treatment*, Paumgartner G, Keppler D, Leuschner U, Stiehl A, eds. Kluwer Academic Publishers Dordrecht/Boston/London, pp. 69 - 83, 2005.
4. Chiba, T., Tokuyue, K., Matsuzaki, Y., Sugahara, S., Chuganji, Y., Kagei, K., Shoda, J., Hata, M., Abei, M., Igaki, H., Tanaka, N., Akine Y.: Proton beam therapy for hepatocellular carcinoma: A retrospective review of 162 patients. *Clin Cancer Res* 11:3799-3805, 2005.
5. Yamada, T., Arai, T., Iwahashi, N., Kamiya, J., Nagino, M., Oda, K., Shoda, J., Suzuki, H., Sugiyama, Y., Nimura, Y.: Impaired expression of hepatic multidrug resistance protein 2 is associated with posthepatectomy liver failure in patients with biliary tract carcinoma. *Langenbeck Archives of Surgery* 390:421 - 429, 2005.
6. Ikegami, T., Matsuzaki, Y., Fukushima, K., Shoda, J., Olivier, L.J., Bouscarel, B., Tanaka, N.: Suppressive effect of ursodeoxycholic acid on Type IIA phospholipase A 2 expression in HepG 2 cells. *Hepatology* 41:896-905, 2005.
7. Nabetani, T., Tabuse, Y., Tsugita, A., Shoda, J.: Proteomic analysis of livers of patients with primary hepatolithiasis. *Proteomics* 5:1043 - 1061, 2005..
8. Ishida, H., Togayachi, A., Sakai, T., Iwai, T., Hiruma, T., Sato, T., Okubo, R., Kudo, T., Gotoh, M., Shoda, J., Tanaka, N., Narimatsu, H.: A novel b1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (b 3 Gn-T 8) , which synthesizes poly-N-acetyllactosamine, is dramatically upregulated in colon cancer. *FEBS Lett* 579:71-78, 2005.
9. 正田純一、稲田洋一. 肝内結石症と胆汁中リン脂質異常. *肝胆膵* 51:607-616, 2005.10.
10. 正田純一、稲田洋一. フィブラートの肝臓における作用を探る. *動脈硬化性疾患治療の新たなストラテジー* 先端医学社 160-169, 2005.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

ムチン分解による結石治療の可能性

研究協力者 佐々木睦男
弘前大学 医学部 第二外科 教授

研究要旨

臨床例に於いてもS-S結合開裂剤、タンパク分解酵素、多糖類分解酵素は酸性糖タンパク質を有効に分解することが知られている。これまでの実験的検討でも、これら製剤により肝内および総胆管結石は縮小、脆弱化した。また、これらの薬剤はすでに数十年にわたり臨床応用されておりその安全性は確認済みであり、すぐに臨床応用可能であると考えられる。胆道誘導チューブからの直接投与、すなわち胆道内遺残結石の洗い出しや胆道内粘液の洗浄では良好な効果が確認された。また薬剤の内服投与では、胆汁中のタンパク質濃度が低下することより有効性を発揮する可能性も示唆された。

A. 研究目的

肝内結石症は難治性の疾患であり数次の治療にもかかわらず再発を繰り返す。肝内結石症患者胆汁中には粘液の主体をなすムチン型酸性糖タンパク質がきわめて多量に存在することが確認されている。この酸性糖タンパク質と肝内結石症患者胆汁およびカルシウムイオン、エンドβグルクロニダーゼ存在下にこれらを混合するとビリルビンカルシウム成分を含む沈殿が生成されることを確認している。したがって、この酸性糖タンパク質は結石生成にきわめて重要な要素と考えられた。また、酸性糖タンパク質を分解するにはS-S結合開裂剤、タンパク分解酵素、多糖類分解酵素が有効でこれらにより沈殿は著明に抑制された。

今回の研究目的は酸性糖タンパク質を分解するS-S結合開裂剤、タンパク分解酵素、多糖類分解酵素の薬剤が実際の肝内結石症症例でその有効性があるかどうかを確認し、臨床応用の実用性を検討するのが目的である。

B. 臨床応用例

症例は72歳 女性で既往歴に胃癌（術後）、くも膜下出血（術後）とパフォーマンスステータスの低い患者である。心窩部痛と発熱があり黄疸を指摘され入院。腹部CT、ERCPにて総胆管ない左右肝管内に多数の結石を認めた。当初は充満する結石のためERCPによる胆管上流の造影も不良であった。ガイドワイヤー下にENBDチューブを挿入し、そのチューブより1日2回ピソルボン液10ml、プロナーゼ2万単位、塩化リゾチーム50mgを投与した。7日間投与し同時に碎石を終了し3日間休薬した。その後3日間内服で1日あたりピソルボン6T、ダーゼン30mg、塩化リゾチーム270mgを投与し胆汁中のタンパク質濃度を測定した。

C. 結果

ENBDチューブからのピソルボン液、プロナーゼ、塩化リゾチームの投与により胆管内の結石間に間隙が生じるようになり、結石周辺部が平滑となり全体に結石の縮小が認められた（図1、図2）。また実

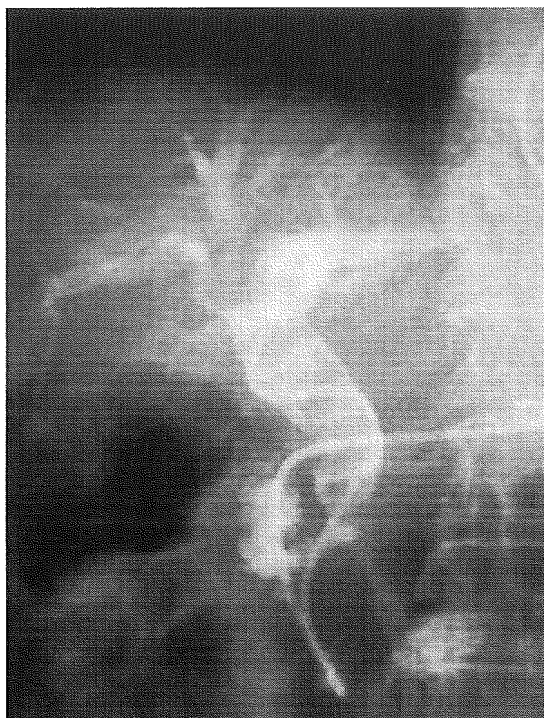


図1
ENBD挿入時胆道造影：結石は総胆管内、肝管内に充満し間隙は少なく、碎石鉗子の挿入は困難であった。

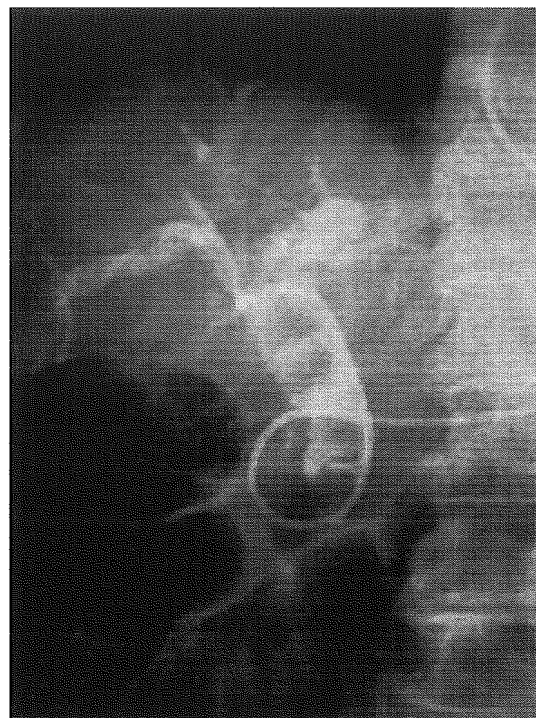


図2
ビスルボン液、プロナーゼ、塩化リゾチーム投与後5日目の胆道造影：結石間の間隙が増加し、結石辺縁も平滑化、結石の縮小化認められる。

際に挿入不能であった碎石鉗子が容易に挿入可能となり、碎石を完了した。

胆汁中のタンパク質濃度は碎石終了時には約 $10\mu\text{g/ml}$ であったが、ビスルボン液、プロナーゼ、塩化リゾチームの中止により約 $13\mu\text{g/ml}$ と上昇した。また、内服によるビスルボン、ダーゼン、塩化リゾチームの投与により胆汁中タンパク質濃度は $8\mu\text{g/ml}$ と低下した（図3）。

D. 考察および結論

今回の結果より臨床例に於いても酸性糖タンパク質を分解するにはS-S結合開裂剤、タンパク分解酵素、多糖類分解酵素が有効であり、これらにより肝内および総胆管結石は縮小、脆弱化した。また、これらの薬剤はすでに数十年にわたり臨床応用されておりその安全性は確認済みであり、これらの方法はすぐに臨床応用可能であると考えられる。

今回確認された結果は胆汁への直接投与に相当す

るものであり具体的には胆道内直接投与で胆道内遺残結石の洗い出しや胆道内粘液の洗浄効果が確認された。これら薬剤の内服により、肝内結石やその再発が予防できるかどうかであるが、内服投与により胆汁中のタンパク質濃度が低下することより、これら薬剤の内服も有効な可能性がある。

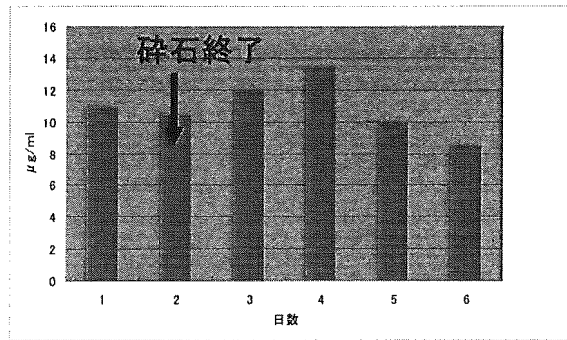
E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

- 1) 吉原秀一、佐々木睦男。日常診療の指針 肝内結石症治療法の開発。外科治療 2005;92(5):1060-1.
- 2) Yoshihara S, Kon A, Kudo D, Nakazawa H, Kakizaki I, Sasaki M, Endo M, Takagaki K. A hyaluronan synthase suppressor, 4-methy-

ムチン分解による胆汁中タンパク質の変化



→
 ビソルボン(+)
 プロナーゼ(+)
直接投与

→
 ビソルボン(+)
 セラペプターゼ(+)
 塩化リゾチーム(+)
内服投与

図 3

lumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells. FEBS Lett 2005;579 (12) : 2722-6.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

二つの自殺遺伝子を組み込んだ腫瘍選択的増殖型 アデノウイルスによる胆管癌の遺伝子治療

研究協力者 本田和男

愛媛大学医学部第一外科

研究要旨

胆管癌は化学療法や放射線療法の効果が乏しいため、根治手術が不可能な場合は予後不良である。

我々は、ヒト胆管癌細胞株HuCCCT1に対して、大腸菌のuracil phosphoribosyltransferase (UPRT) 遺伝子と Herpes simplex virus-1 thymidine kinase (HSV-tk) 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター AxCAUT を作製し、5-fluorouracil (5-FU)、ganciclovir (GCV) の抗腫瘍効果を培養細胞系と動物モデルで検討した。さらにE1B-55kDを欠損した腫瘍選択的増殖型ウイルスに、両遺伝子を組み込んだAxE1CAUTを用いて抗腫瘍効果を検討した。

培養胆管癌細胞において、5-FU、GCVの薬剤感受性は、アデノウイルスAxCAUTのmultiplicity of infection (MOI) 数が増加するに伴い増強していた。さらに5-FU、GCVは単独投与よりも併用投与で、より薬剤感受性が増加していた。腫瘍選択的増殖型ウイルスAxE1CAUTはMOI数の増加に伴い抗腫瘍効果を示した。

アデノウイルスAxCAUTを投与されたマウス皮下担癌モデルにおいても、5-FU、GCVは単独投与群と比較して併用投与で抗腫瘍効果を示した。さらに腹膜播種モデルにおいて、AxE1CAUT投与群はAxCAUT投与群に比べ有意に生存率を延長させた。

胆管癌に対する自殺遺伝子療法は、UPRT/5-FU、HSVtk/GCVを組み合わせることで、より有効な治療となる可能性が示された。さらに腫瘍選択的増殖型アデノウイルスベクターに2種類の自殺遺伝子を組み込んだAxE1CAUTを用いると、ウイルス自体の腫瘍融解作用に加えて、薬剤感受性遺伝子を発現させることにより強力な抗腫瘍効果を示した。

A. 研究目的

胆道癌はアメリカ合衆国においては全悪性新生物の約2%であるが、日本においては全悪性新生物死亡数の5.2%を占める癌である。胆道癌は、胆管壁内を浸潤増殖することがあり、自覚症状に乏しく早期に発見されるのは患者の約10%である。従って、発見時には根治手術困難な事が多く、胆道癌に対する化学療法や放射線療法の効果も乏しいため、5年生存率は10%、平均生存期間は1.5年と予後は不良で

ある。

癌細胞に対して細菌やウイルス由来の代謝酵素遺伝子を導入し、その後宿主に毒性の低いprodrugを投与することにより遺伝子導入細胞を傷害する Gene directed Enzyme/Prodrug therapy (GDEPT) は、自殺遺伝子療法 (suicide gene therapy) と呼ばれている。現在最もおこなわれているGDEPTはherpes simplex virus thymidine kinase / ganciclovir (HSVtk/GCV) therapyである。HSVtkはGCVを細胞内でganciclovir monophos-

phateに変換し、その後毒性のあるganciclovir triphosphateへと変換する。Ganciclovir triphosphateは細胞内でDNAの合成阻害を引き起こす。哺乳類の細胞はこのHSVtk遺伝子を欠損しているため、GCVはHSVtk遺伝子を導入された細胞でのみ毒性を引き起こす。

5-fluorouracil (5-FU) は、消化器癌に対して最も頻繁に使用されている薬剤であるが胆管癌に対する効果は乏しく胆道系の腫瘍に対する効果は約0~20%にしかすぎない。さらに抗癌剤による化学療法は、しばしば薬剤の耐性が認められる。大腸菌のuracil phosphoribotransferase (UPRT) はpyrimidine salvage 酵素の一つで、5-FUを直接5-fluoro-2'-urimidine-5'-monophosphate (FUMP) に変換する。一方哺乳類の細胞はUPRTを持たないために、FUMPに変換されるのに高濃度の5-FUが必要で、2つ以上の過程を必要とする。今回、我々は、UPRTとHSVtkの両者を同時に発現させる自己複製不能アデノウイルスベクター AxCAUTを作製しヒトの胆管癌細胞株に導入した。そして細胞培養系と動物実験モデルで、5-FU、GCV投与による薬剤感受性を比較検討した。

これに加えて、さらに新しいoncolytic gene therapyの手法を応用した。胆管癌にはp53, p16をはじめとした遺伝子異常を示すことが多い。P53機能に障害を有する癌に対する治療として、tumor-specific replication能力を持つmutant viruses (ONYX-015) を用いたoncolytic gene therapyが現在注目を浴びている。ONYX-015は、E1B55K領域を欠如した変異アデノウイルスで、p53機能が正常な細胞では増殖しないが、p53機能異常を有する癌細胞内では増殖を繰り返し、癌細胞を破壊するreplication-selective oncolytic adenovirusである。我々はこのONYX-015と構造が類似したAxE1AdにUPRT、HSVtk遺伝子を組み込んだアデノウイルスAxE1CAUTを作製し、ヒト胆管癌細胞株に対する抗腫瘍効果を検討した。

B. 研究方法

培養細胞株

ヒトの胆管癌であるHuCCT1と線維芽細胞であるWI-38は、Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan) より入手した。HuCCT1はmutated p53を持っており、5% CO₂下、10% Fetal Bovine Serum (FBS) 入りのRPMI1640培地で継代した。WI-38は10% FBS入りのDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) で継代した。

ウイルスの増殖に必要なHuman embryonic kidney 293 cells (HEK-293) はthe American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) から入手し、5% CO₂下、10% FBS入りのDMEMで継代した。

遺伝子組換えアデノウイルス

本実験で使用したアデノウイルスベクターは、アデノウイルス5型のウイルスゲノムのE1A、E1B、E3の遺伝子領域を削除しCAGプロモーターと外来遺伝子を組み込んで作製した。

AxCAUTはコスミドベクター pAdex1cwのSwaIのクローニングサイトに大腸菌のUPRT、HSV-tkのcDNAを含むpCAUTと、CAGプロモーターを挿入し作製した。コントロールとして使用したAxCALacZは同様にコスミドベクター pAxcwitのSwaIのクローニングサイトに大腸菌のβガラクトシダーゼのcDNAとCAGプロモーターを挿入して作製した。

一方AxE1CAUTはpSK (Xh) E1AdBのSalI/HindIIIにCAUTを挿入しpSKd (Xh) E1AdB-CAUTを作製した。このDNAクローンをコスミドベクター pAdex1cwのSwaIのクローニングサイトに挿入し作製した。

これらのウイルスを大量調整し、AxCAUT、AxCALacZはRCA混入が無いことを確認、塩化セシウムによる濃度勾配超遠心分離により精製し、力価を測定し使用した。

X-gal 染色によるβ-Galactosidase 遺伝子の発現の確認

アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率を検討するため、胆管癌細胞株HuCCT1に対して大

腸菌の β -galactosidase をエンコードした AxCA-LacZ を 0.1、1、10、100 multiplicity of infection (MOI) の濃度で 24 時間培養し感染させた。その後培地を交換し 5% FCS 入りの RPMI1640 培地で 4 日間培養した。X-gal 染色をおこない X-gal 陽性細胞の比率を百分率で求めた。

胆管癌細胞株 (HuCCT1) に対する UPRT 遺伝子と HSV-tk 遺伝子の定量解析

Replication defective adenovirus (RDAd) と Conditionally replicating adenovirus (CRAd) の HuCCT1 に対する遺伝子発現量を検討するため、種々の MOI でアデノバクターを感染させリアルタイム PCR で遺伝子の相対発現量を測定した。胆管癌細胞株 (HuCCT1) に対して、RDAd である AxCAUT と腫瘍 CRAd である AxE1CAUT を MOI of 0.1、1、10、100 で感染させ 5% FCS 入りの RPMI1640 培地で 24 時間培養した。その後培地を交換し、さらに 4 日間培養した。細胞を回収し TRI-ZOL® Reagent (Invitrogen, CA) を用いて total RNA を抽出した。Total RNA を SYBR RT-PCR Kit (TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) を用い RT 反応を行った。RT 反作用プライマーは random 6 mer を使用した。検量線を作成し検量線の範囲内で、検体の大腸菌 UPRT 遺伝子、HSVtk 遺伝子および標準遺伝子 GAPDH の発現相対定量を行った。定量 PCR には Smart Cycler version 2 (TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) および SYBER RT-PCR Kit (Perfect Real Time, TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) を用いて、増幅された 2 本鎖 DNA 中に入り込んだ SYBER Green 1 を検出し Ct 値 (Threshold Cycle) を算出した。検出 Ct 値を検量線にあて発現相対量を算出した。各検体をそれぞれ標準遺伝子 GAPDH で補正し、さらに AxCAUT 0.1 MOI 感染時の UPRT 遺伝子発現量を 1 とし相対発現量を比較検討した。PCR で用いたプライマーは大腸菌 UPRT 遺伝子が GGGACTGATGCGTGAGCAA、GCCGTTCCAGCCTTCGATA であり、HSV-tk 遺伝子は TGACTTACTGGCGGGTGCTG、CCATTGTTATCTGGGCGCTTG で、ヒト標準遺

伝子 GAPD は GCACCGTCAAGGCTGAGAAC、ATGGTGGTGAAGACGCCAGT を用いた。

培養胆管癌細胞の 5-FU と GCV に対する感受性

ウイルスの感染濃度と薬剤感受性の変化を検討するため、in vitro で検討を行った。胆管癌細胞を 96 穴のプレートで 1 ウェル毎に 2×10^3 個まき、5% FBS 入りの RPMI 1640 で培養した。細胞を AxCA-LacZ、AxCAUT、AxCAE1UT の 0.1、1、10、100 MOI で 24 時間感染させた後、培地を 5-FU、GCV 入りの培地で 4 日間培養した。そして細胞の生存率を Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) を用いて測定した。テトラゾリウム塩である WST-1 は、生細胞のミトコンドリアの呼吸鎖に存在する還元酵素によりホルマジン色素に変換される。そこでこのホルマジン色素を Model 550 Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, CA) を用いて吸光度を測定し定量し細胞の生存率を測定した。

CRAd の正常細胞に対する細胞障害作用を測定するため AxE1CAUT と AxCALacZ を WI-38 に 0.1、1、10、100 MOI で感染させ 24 時間後に培地を交換し、4 日間 5% FBS 入りの RPMI1640 培地で培養し、同様に WST-1 assay を用いて細胞生存率を測定した。

ヌードマウスの皮下担癌モデルでの検討

メスの BALB-c nu/nu (5 週齢) を日本クレア (Tokyo, Japan) より購入し、愛媛大学の the Department of Biological Resources at the Integrated Center for Sciences (INCS) で飼育した。

FBS 無しの RPMI 1640 培地 $100 \mu\text{l}$ で懸濁した HuCCT1 1×10^7 個をヌードマウスの右側腹部に皮下注射してマウス皮下担癌モデルを作成した。約 3 週間後 Tumor volume (TV) が $200 \sim 250 \text{mm}^3$ に達したときに、これらのマウスを無作為に以下の 5 グループに分類した。TV は次の式で計算した。(TV = $0.4 \times \text{diameter} \times \text{width}^2$)

- 1) intratumor (i.t.) injection of PBS ($100 \mu\text{l}$),
- 2) i.t. injection of AxCAUT followed by intraperitoneal (i.p.) 5-FU,
- 3) i.t. injection of Ax-

CAUT followed by i.p. GCV、4) i.t. injection of AxCAUT followed by i.p. 5-FU and i.p. GCV、5) i.t. injection of AxE 1 CAUT followed by i.p. 5-FU and i.p. GCV

Adeno-vector (2 x10⁸PFU) またはPBSを投与した3日後にALZET Osmotic Pumps (DURECT, CA) を腹腔内に埋め込み5-Fu (10mg/kg/day)、GCV (5 mg/kg/day) を14日間持続投与した。腹腔内投与開始日より3、7、10、14日に腫瘍体積を測定した (n=5)。薬剤腹腔内投与開始時の腫瘍体積を1とし相対的な比を求め、その変化を投与ウイルス、投与薬剤の違いで比較検討した。

ヌードマウスの癌性腹膜炎モデルでの検討

HuCC1 を 1 x10⁷個、BALB-c nu/nuマウスの腹腔内に注入し、10日間飼育して腹膜播種モデルを作製した。HuCC1 接種後10日目に、これらのマウスをランダムに以下の3グループに分類した (n=8)。a) i.p. injection of PBS (200 μ l)、b) i.p. injection of AxCAUT (2 x10⁸PFU) in PBS (200 μ l)、c) i.p. injection of AxE 1 CAUT (2 x10⁸PFU) in PBS (200 μ l)

ウイルス又はPBS投与3日後より、5-FU 10mg/kg/dayとGCV 5 mg/kg/dayをsingle shotで連日7日間腹腔内投与した。薬剤投与開始日からの生存期間を測定した。

C. 研究結果

AxCALacZを用いたX-gal染色による β -Galactosidase 遺伝子の発現

胆管癌細胞株HuCC1に対するAxCALacZの β ガラクトシダーゼ発現率はMOI数が増加するに伴い増大し100 MOIでは細胞の50%以上に β ガラクトシダーゼの発現が認められた。(表1)

UPRT遺伝子とHSV-tk遺伝子の発現の定量的解析

RDAdとCRAdのHuCC1に対する遺伝子発現量を検討するため、種々のMOIでアデノベクターを感染させリアルタイムPCRで外来遺伝子発現量を

測定した。

RDAdであるAxCAUTを種々のMOI数で感染させた場合、UPRT、HSVtkどちらもその発現はほぼ1対1であった。MOI数が増加するに伴いUPRT遺伝子、HSVtk遺伝子のどちらもmRNAの発現が増加し、100 MOIでUPRTは12170倍、HSVtkは14480倍であった。

さらにCRAdであるAxE 1 CAUTもUPRT遺伝子、HSVtk遺伝子のどちらもその発現はほぼ1対1であった。さらにAxCAUTと比較して同じMOI数感染させてもUPRT遺伝子、HSVtk遺伝子のmRNA発現は増加しており、0.1 MOI感染時でUPRT遺伝子は163.2倍、HSVtk遺伝子は133倍であり、100 MOI感染時にはUPRT遺伝子は35180倍、HSVtk遺伝子は35553倍であった。(図1)

アデノベクターによる胆管癌細胞の薬剤感受性の変化

アデノウイルス非投与時において、GCVには抗腫瘍効果がないために、5-FU単独投与時と5-FU、GCV併用投与時にはほぼ同様の細胞生存率を示した。(図2)

AxCAUTを投与した時、AxCAUTのMOI数と5-FU、GCVそれぞれの薬剤に対する細胞生存率の関係は、アデノベクターのMOI数を増加させるに従って5-FU、GCVとも細胞生存率が単独投与併用投与にかかわらず、低下していた(図3、図4)。

AxCAUTを100 MOIで感染させた際の細胞生存率は、5-FU、GCV単独投与群と比較して5-FU/GCV併用投与群では薬剤濃度に対する細胞生存率は低下していた。(図5)

AxCAUTを感染させた時の50%細胞阻害濃度(IC₅₀)は、アデノウイルスのMOI数が増加するにつれて感受性が増強していた。胆管癌細胞に対する薬剤の感受性(IC₅₀)は、非感染細胞でAxCAUT(100 MOI)では5-FU単独投与群で0.41、GCV単独投与群で0.71であった。一方、5-FUとGCVの併用投与群でIC₅₀は0.056と併用投与でより効果が認められた(表2)。

それ自体で腫瘍融解作用を持つAxE 1 CAUTを

表1. Transduction rate with AxCALacZ

MOI	0.1	1	10	100
X-gal 陽性率 (%)	1.55 ± 0.32	2.33 ± 1.53	13.15 ± 6.83	51.6 ± 8.47

図1. UPRT遺伝子、HSV-tk遺伝子の相対的発現量

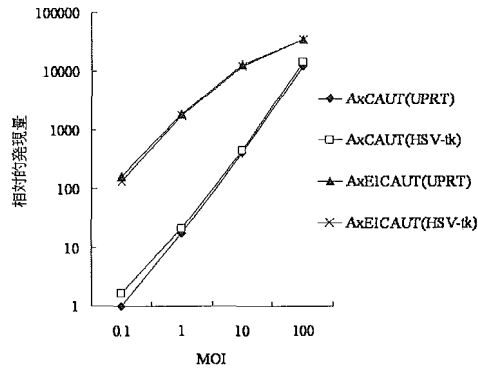


図2. Drug sensitivity of HuCCT1 cells

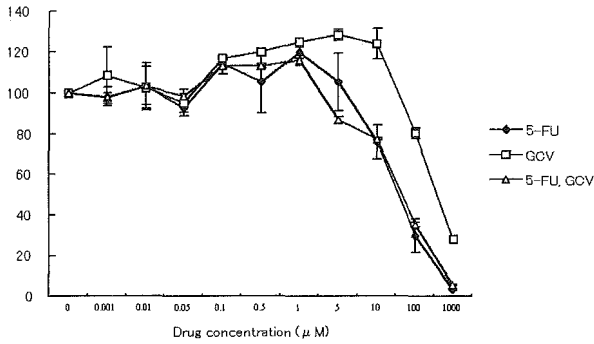


図3. Drug sensitivity of AxCAUT-infected HuCCT1 cells to 5-FU

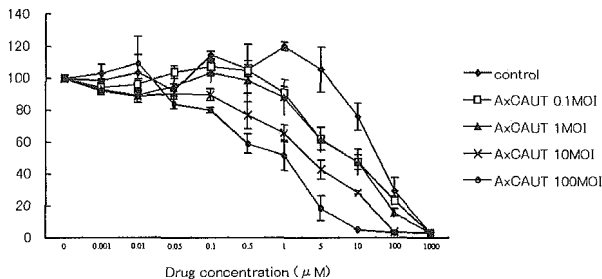


図4 Drug sensitivity of AxCAUT-infected HuCCT1 cells to GCV

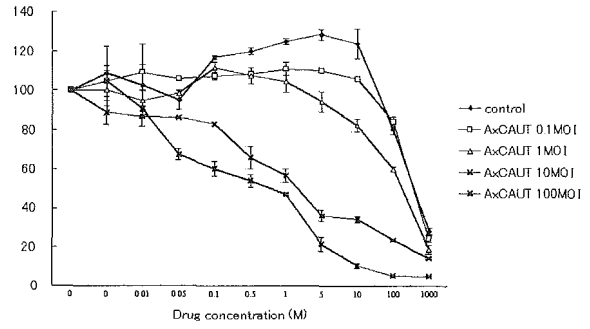


図5. Drug sensitivity of AxCAUT-infected HuCCT1(100 MOI)

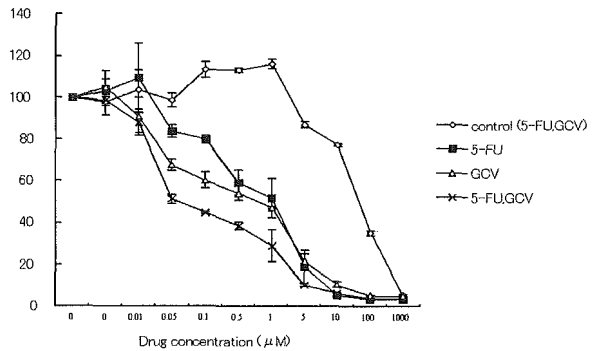


表2. IC50 of 5-FU and GCV in AxCAUT-infected HuCCT1 cells

	5-FU	GCV	5-FU,GCV
uninfected	30	377	36
0.1 MOI	8	340	9
1 MOI	8	153	3.3
10 MOI	2.9	1.6	0.41
100 MOI	0.41	0.709	0.056

感染させた場合には、5-FU、GCVが投与されていなくてもMOI数が増加するにつれて細胞の生存率は低下していた。0.1 MOIでは細胞生存率はほぼ100%であったが、100 MOIでは5-FU、GCVを投与しなくても約23%であり薬剤を投与するにつれて細胞生存率もさらに低下していた。一方線維芽細胞、WI-38にAxE1 CAUTを投与した場合は、MOI数を増加しても細胞生存率はAxCALacZと差を認める事ができなかった。(図6、図7)。

図6. Sensitivity of AxE1CAUT-infected HuCCT1 cells to 5-FU/GCV

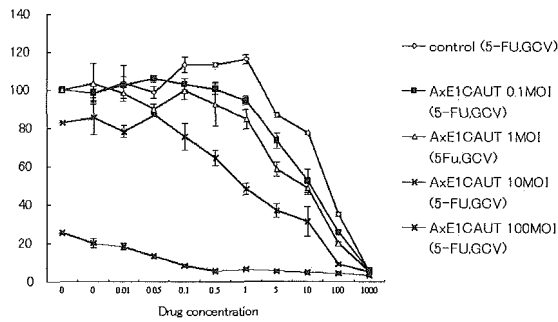
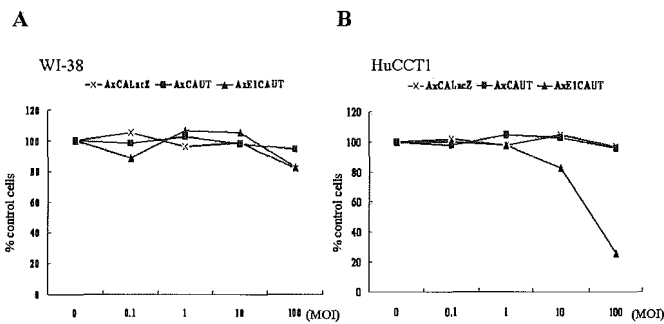


図7. アデノウイルスベクターと細胞生存率



ヌードマウスの皮下担癌モデルでの検討

マウス皮下担癌モデルにPBSを投与した場合は、腫瘍体積が約200mm³となった時点から計測を開始後、そのサイズは急速に増大し2週間後に約3.9倍になった。AxCAUT投与群において5-FU、GCV単独投与群の2週間後の腫瘍サイズはそれぞれ3.02、1.98倍に増大した。一方AxCAUT/5-FU、GCV併用投与群の2週間後の腫瘍サイズは1.26倍で、AxE1CAUT/5-FU、GCV併用投与群の2週間後の腫瘍サイズは0.95倍であった。AxCAUT投与群では2) i.t. injection of AxCAUT followed by i.p. 5-FU、3) i.t. injection of AxCAUT followed by i.p. GCVと比較して4) i.t. injection of AxCAUT followed by i.p. 5-FU and i.p. GCV群では二週間後のTVは有意に低下していた。投与されたアデノウイルスベクターの違いで検討すると、皮下担癌モデルでは、4) AxCAUT/5-FU,GCV投与群と5) AxE1CAUT/5-FU,GCV投与群間で有意差は認められな

図8. マウス皮下担癌モデルに対する抗腫瘍効果

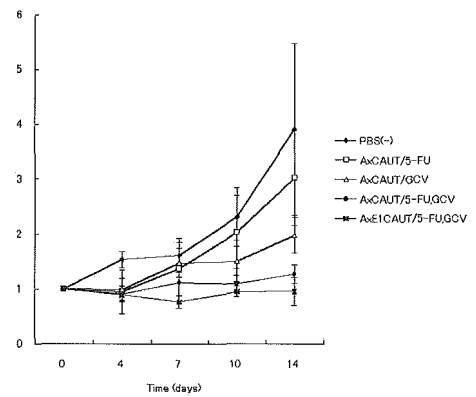
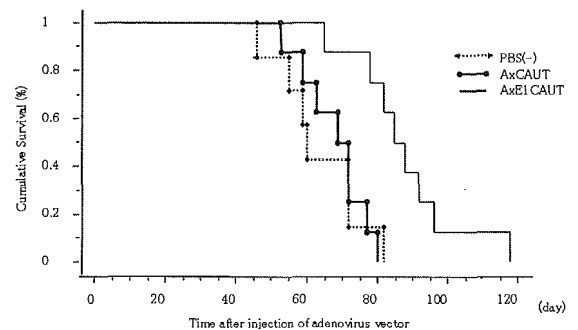


図9. 腹膜播種モデルにおける生存曲線



かった。(図8)

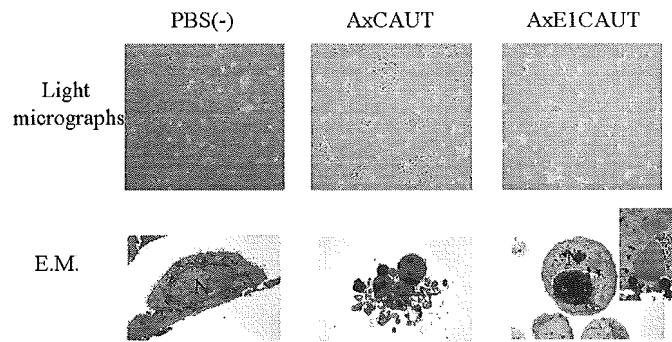
ヌードマウスの癌性腹膜炎モデルでの検討

腹膜播種モデルにおいてアデノウイルス、PBS投与後の生存率は、それぞれa) PBS (-) 投与群で63.6日b) AxCAUT投与群で68.1日c) AxE1CAUT投与群で86.3日であった。a) PBS (-) 投与群とb) AxCAUT投与群では生存率に有意差を認めなかったが、c) AxE1CAUT投与群は他の2群と比較して有意に生存期間の延長が認められた。(図9)

D. 考察

消化器癌に対するGene directed enzyme/prodrug therapy (GDEPT) は、単純に複製不能アデノウイルスを使用するとあまり有効な効果はえられていない。まず我々は、UPRT gene、HSVtk geneの作用機序の異なる遺伝子を同時に発現させるアデノウイルスベクターを用いて胆管癌細胞に対するdouble suicide gene therapyの可能性を

図10. Micrographs of HuCCT1 cells



検討した。

複製不能アデノウイルスであるAxCAUTをHuCCT1細胞に感染させ遺伝子導入した場合、UPRT遺伝子、HSVtk遺伝子のmRNAはほぼ1対1であり、MOI数が増加するに伴いUPRT、HSVtkのどちらもmRNAの発現が増加していた。5-FU、GCVをそれぞれ単独投与した場合、ウイルスのMOI数と細胞生存率の関係は、低いMOI数では薬剤感受性も低く、MOI数を増加させると薬剤感受性も増加し、100 MOI感染時、5-FU単独投与ではコントロール群と比較してIC50は約1/73、GCV単独投与では1/530であった。このことからGDEPTによる遺伝子治療を行うには、目的遺伝子の十分な発現が必要であると考えられた。

一方、投与薬剤の違いで検討すると、AxCAUTを100 MOI感染させた場合において、IC₅₀は5-FU単独投与時0.41 μM、GCV単独投与時0.709 μMと比較して5-FU、GCV併用投与では、0.056 μMと併用投与でより効果が認められた。さらに皮下担癌モデルにおいても5-FU/GCV併用投与群が単独投与と比較して有意に抗腫瘍効果を示した。

今回我々の研究で使用したAxE1CAUTはウイルスの感染初期に発現する遺伝子のうちE1B-55Kを欠失させている。E1B-55Kはp53と結合することによりp53の機能を抑制する。従ってp53の機能が正常な細胞ではこのウイルスは複製せず、p53変異あるいは欠失のある細胞では複製し細胞を傷害する。この制限増殖型アデノウイルスAxE1CAUTは、real time PCRによるとAxCAUTと比較して同じMOI数を感染させた場合でもUPRT遺伝子、HSV-

tk遺伝子のmRNAの発現はMOI数が増加するに伴い増加し、さらに0.1 MOIでもRDAであるAxCAUTと比較して100倍以上発現していた。光学顕微鏡ではAxE1CAUTを感染させた場合HuCCT1細胞にはcytopathic effectを認めた。電子顕微鏡像においてもAxE1CAUTは核内の封入体が認められ腫瘍細胞内でアデノウイルスの増殖が示唆された。(図10)

AxE1CAUTのoncolytic作用について検討すると、薬剤を投与しない場合、AxCAUTは細胞融解作用が認められないためMOI数を増加しても細胞生存率はほぼ100%であったが、AxE1CAUTはMOI数が増加するにつれて細胞の生存率は低下しており100 MOI感染時では約23%であった。一方、ヒトのfibroblast cell lineに対して、AxE1CAUTはMOI数を増加しても複製不能アデノウイルスであるAxCALacZと比較して細胞の生存率に有意差を認めなかった。このことは、制限増殖型アデノウイルスであるAxE1CAUTは、p53に異常をもつ癌細胞においてはMOI数を増加させるに伴い腫瘍融解作用と薬剤感受性増強作用により、AxCAUTと比較してより強力に抗腫瘍作用を示すと考えられた。

マウス皮下担癌モデルにおいてHSVtk/GCV療法とUPRT/5FU療法はそれぞれ単独で行った場合よりも併用した場合でより効果的であった。投与ウイルスの違いで検討すると、AxCAUTとAxE1CAUTを用いてdouble suicide gene therapyを行った場合、両群間に有意差を認めなかった。このことは局所注入のように十分な量のアデノウイルスを直接投与でき、目的組織に外来遺伝子を発現させるこ