

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	腫瘍制御科学領域婦人科腫瘍学教育研究分野 氏名 小林麻美
<p>(論文題目)</p> <p>Gene therapy for ovarian cancer using carbonyl reductase 1 DNA with a polyamidoamine dendrimer in mouse models.  (カルボニル還元酵素 1 DNA とポリアミドアミン dendrimer 複合体を用いた卵巣癌マウスモデルの遺伝子治療)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p><b>【諸言】</b>  クロフィブリン酸の卵巣癌に対する抗腫瘍効果は腫瘍内で Carbonyl reductase 1 (CBR1) の発現誘導による血管新生の抑制とアポトーシスの促進の結果である。マウス卵巣癌細胞内で CBR1 を強発現させると腫瘍は自然退縮し、siRNA で腫瘍内の CBR1 をノックダウンさせると腫瘍の増殖と転移が促進される。本研究では polyamidoamine (PAMAM) dendrimer を用いた CBR1 DNA の卵巣癌への効率的な導入法と、CBR1 と PAMAM dendrimer の複合体を用いた卵巣癌治療への応用を検討した。</p> <p><b>【方法】</b>  本研究ではヒト卵巣漿液性腺癌から樹立した細胞株の HRA と DISS を使用した。  1) HRA、DISS に PAMAM dendrimer を用いて CBR1 DNA を導入した。GFP タグ付きの DNA を用いて、癌細胞への DNA の導入状況を蛍光顕微鏡で確認した。N/P 比 (dendrimer の窒素残基数と DNA のリン酸基数の比) を 5:1~30:1 に設定し、効率的な N/P 比の検討を行った。さらにウエスタンブロット法で CBR1 DNA を導入した癌細胞での CBR1 の発現レベルを N/P 比と導入時間で比較した。  2) N/P 比を 5:1~25:1 として CBR1 DNA と dendrimer 複合体を癌細胞に導入し、癌細胞の増殖能の差異を吸光度法で比較した。  3) 癌性腹膜炎のマウスモデルを用いて CBR1 の抗腫瘍効果を検討した。8 週齢のヌードマウスに HRA を腹腔内投与することで癌性腹膜炎モデルを作製した。コントロール群 (n=5) と CBR1 DNA 導入群 (n=5) の 2 群に分け、コントロール群には PBS のみを隔日投与し、CBR1 DNA 導入群には CBR1 DNA と dendrimer の複合体を隔日投与した。癌細胞を腹腔内投与した当日を Day0 として Day1 よりそれぞれの薬液投与を開始し、生存期間と腹腔内所見を比較した。コントロール群では Day25 に全例死亡し、DNA 導入群では Day24 以降に薬液の投与を中止し、自然経過観察とした。</p> <p><b>【結果】</b>  1) CBR1 DNA 導入から 48 時間後まで CBR1 DNA の取り込みが増加し、種々の N/P 比の中で 20:1 が最も良好だった。さらにウエスタンブロット法で、コントロールの細胞よりも CBR1 DNA を導入した細胞で CBR1 の発現が増強している事を確認し、HRA、DISS とともに CBR1 の発現は N/P 比が 20:1、導入時間が 48 時間の場合で最も良好だった。  2) HRA、DISS で N/P 比 20:1 および 25:1 の際に細胞増殖が有意に抑制された。</p>	

3) マウス癌性腹膜炎モデルにおいて、コントロール群では Day 25 までに全例死亡した。一方、Day 25 の時点で CBR1 DNA 導入群では全例生存していた。Day 24 以降は CBR1 DNA 導入を中止して経過を観察した。CBR1 DNA 導入を中止して 8 日目に 1 例死亡し、Day 50 までに全例死亡した。コントロール群と比較して CBR1 DNA 導入群の生存日数は統計学的にも有意に延長した ( $P < 0.01$ )。またコントロール群では高度の播種性病巣と血性腹水の貯留を呈していたのに対し、CBR1 DNA 導入群では播種病巣も腹水貯留も軽微であった。

#### 【考察】

CBR1 が卵巣癌の増殖と転移に関与していることは臨床データや動物実験等で確かめられてきた。クロフィブリン酸を投与することで卵巣癌での CBR1 の発現が増強して、アポトーシスによる癌細胞の死滅、血管新生を抑制することによる転移増殖の減少から、抗腫瘍効果が生じる。しかし高用量のクロフィブリン酸の摂取による体重減少や横紋筋融解等の副作用も存在する。したがって CBR1 DNA を癌細胞に直接デリバリーする遺伝子治療の開発に着目した。CBR1 DNA と PAMAM dendrimer を結合させ、癌細胞に選択的にデリバリーする条件を見出すことができた。卵巣癌の癌性腹膜炎マウスモデルに CBR1 DNA と PAMAM dendrimer の複合体を投与することで、生存期間が有意に延長することと腹腔内播種や腹水の貯留を抑制することが確認できた。さらに、CBR1 DNA と dendrimer の複合体の投与によって体重減少などの副作用は認められなかった。

#### 【結論】

癌性腹膜炎マウスモデルに CBR1 DNA と PAMAM dendrimer の複合体を腹腔内投与すると、生存期間の有意な延長が認められた。CBR1 DNA と dendrimer 複合体は進行卵巣癌の新たな遺伝子治療戦略となり得ることが示唆された。