

単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ遺伝子の
肝癌細胞特異的発現に基づく肝癌に対する
遺伝子治療の基礎的研究

奈良県立医科大学第3内科学教室

阪本 たけみ

BASIC INVESTIGATIONS OF GENE THERAPY FOR HEPATOMA
BASED UPON HEPATOMA CELL-SPECIFIC EXPRESSION OF THE HERPES
SIMPLEX VIRUS THYMIDINE KINASE GENE

TAKEMI SAKAMOTO

The Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received September 28, 1995

Abstract: Feasibility of gene therapy for hepatoma based upon hepatoma-cell specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-*tk*) gene was investigated. Alb e/p-pNT 230 retroviruses, which contain the HSV-*tk* gene under the transcriptional control of the murine albumin gene enhancer and promoter, were produced from ecotropic Psi 2 retroviral packaging cells. Infection of Alb e/p-pNT 230 retroviruses to hepatoma cells did not affect the cell proliferation at all. The retroviral-infected hepatoma cells, however, were susceptible to ganciclovir and acyclovir toxicity, while uninfected parental hepatoma cells were not. Ganciclovir was proven to exhibit much stronger cytotoxicity upon the retroviral-infected hepatoma cells than acyclovir. On the other hand, Alb e/p-pNT 230 retroviral-infected non-hepatoma cells were resistant to ganciclovir, and the sensitivity was more than 100-fold different as compared with the same retroviral-infected hepatoma cells, indicating the potential of hepatoma cell-specific elimination without affecting any other tissues by use of Alb e/p-pNT 230 retroviruses. Furthermore, when mice bearing a bulky established tumor consisting of Alb e/p-pNT 230 retroviral-infected hepatoma cells were treated with ganciclovir, complete tumor regression was observed in 11 of 14 mice. These results indicate the feasibility of gene therapy for hepatoma using the HSV-*tk* and ganciclovir system. Finally, 3 ganciclovir-resistant clones were established from 3 tumors that were not abrogated by ganciclovir treatment. These clones were proven not to lose the HSV-*tk* gene transferred by Alb e/p-pNT 230 retroviruses. The gene was, however, heavily methylated, and 5-azacytidine treatment partially restored the sensitivity of these 3 clones to ganciclovir, indicating that methylation plays an essential role in expression of the retrovirally transferred gene.

Index Terms

gene therapy, hepatoma, herpes simplex virus thymidine kinase, albumin gene promoter, retroviral vector

結 言

近年の著しい遺伝子工学の発達により、遺伝子治療に関する基礎研究は急速な発達を遂げ、欧米においてはすでに多数の臨床試験が開始されている^{1)~3)}。わが国においても、1993年4月に厚生省より、1994年1月には文部省より、遺伝子治療に関するガイドライン⁴⁾⁵⁾が発表され、1995年8月には、先天性の重症免疫不全症であるアデノシンデアミナーゼ欠損症の患者に対する遺伝子治療が開始された。

遺伝子治療は、当初、先天性の遺伝子疾患に対する治療法として考案されたが、その後、種々の悪性疾患や後天性免疫不全症候群などの後天性疾患に対しても応用が期待されている。特に、癌患者数は先天性遺伝子疾患の患者数より圧倒的に多いことより、癌の遺伝子治療に関する研究は積極的に推進されるべきである。現在、一般的に試みられている癌に対する遺伝子治療法は、担癌患者より癌細胞や腫瘍浸潤リンパ球を採取し、*ex vivo*において遺伝子を導入した後に再び同一患者に戻す方法である^{6)~8)}。*ex vivo* 遺伝子導入法は、標的細胞の採取に外科的手技を要し、臨床応用が容易な方法とは言い難い。*in vivo* 遺伝子導入法^{9)~14)}が確立されれば、癌に対する遺伝子治療はより臨床応用が容易になり、新局面を迎えられ考えられる。この際、いかにして外来遺伝子を標的細胞で特異的に発現させるかが重要な問題であるが、現在に至るまでこの問題に関する検討はほとんどなされていない。

当教室では以前より、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入に関する検討をおこなっており、アルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーター領域を内因性制御因子とするレトロウイルスベクターを用いると、レポーター遺伝子である大腸菌由来の β -galactosidase 遺伝子が、*in vitro* および *in vivo* において、肝癌細胞特異的に発現することを報告している¹⁵⁾。そこで著者は、アルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーター領域の制御下に、suicide 遺伝子であるヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ(HSV-*tk*)遺伝子を挿入したレトロウイルスベクターを作製し、肝癌に対する遺伝子治療に関する基礎的研究をおこなった。

方 法

1) 組換えレトロウイルスベクターの作製法

すべてのプラスミドは標準的な組み換えDNA技術¹⁶⁾

によって作製した。本研究に用いた Alb e/p-pNT 230 レトロウイルスベクターの作製法を Fig. 1 に示した。ネオマイシン耐性を与える neomycin phosphotransferase 遺伝子¹⁷⁾をモロニー株マウス白血病ウイルス由来の long terminal repeat 間を含む pIF 9171 プラスミド¹⁸⁾を、*Hpa* I 制限酵素で切断し *Bgl* II リンカーを接合した後に再度環状化した pIF-*Bgl* II プラスミドを作製した。HSV-*tk* 遺伝子を含む pMK プラスミド¹⁹⁾を *Pvu* II 制限酵素で切断し、*Bgl* II リンカーを接合した後に再度環状化した pMK-*Bgl* II プラスミドを作製した。pMK-*Bgl* II プラスミドを *Bgl* II 制限酵素で切断し、垂直型アガロースゲルを用いて HSV-*tk* 遺伝子断片を分離回収した。pIF-*Bgl* II プラスミドの *Bgl* II 部位に、上記 HSV-*tk* 遺伝子断片を T4 リガーゼを用いて挿入し、pNT 230 プラスミドを作製した。次に、マウス由来のアルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーター領域を含む Alb e/p-Bluescript プラスミド²⁰⁾を *Hind* III 制限酵素で切断し、アルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーター領域を回収した。この断片を pNT 230 レトロウイルスベクターの *Hind* III 部位へ挿入し、Alb e/p-pNT 230 レトロウイルスプラスミドを作製した。

2) 組換えレトロウイルスベクターの産生法

同種指向性のレトロウイルスのパッケージング細胞である Ψ 2 細胞²¹⁾を 1×10^4 cells/cm²の密度で 60 mm 培養皿へ撒き、10%胎児牛血清(FCS)、100 units/ml のペニシリンおよび 100 μ g/ml のストレプトマイシンを含む 5 ml の RPMI 1640 培養液を加え、37°C、5%CO₂の条件下で培養した。翌日、Alb e/p-pNT 230 レトロウイルスプラスミドをリン酸カルシウム法²²⁾により Ψ 2 細胞へ導入した。さらに 2 日間培養後、培養液へネオマイシンの類似物質である G 418(Sigma)を 1 mg/ml の濃度で添加し、G 418 耐性細胞を培養増殖させた。G 418 耐性の Ψ 2 細胞より培養液中に放出される Alb e/p-pNT 230 レトロウイルスを回収し、0.45 μ m poresize filter (Nalgene)濾過後、-70°C に凍結保存し、組換えレトロウイルスベクターとして以下の実験に用いた。

3) 培養細胞へのレトロウイルス感染法

培養実験には、BALB/c マウス由来の付着性肝癌細胞である BNL 1 ME A. 7 R. 1 細胞²³⁾、ラット由来の腹水肝癌細胞である JTC 16 P 3 細胞²⁴⁾、BALB/c マウス由来の NIH 3 T 3 線維芽細胞²⁵⁾、C 3 H/He マウス由来の MMT 06502 乳癌細胞を用いた。

各種細胞の培養は、60 mm 培養皿に 10%FCS、100

units/ml のペニシリンおよび 100 $\mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシンを含む 5 ml の RPMI 1640 を加え、37°C、5% CO_2 の条件下でおこなった。

レトロウイルスの感染法は、培養細胞に 8 $\mu\text{g/ml}$ の Polybrene(GIBCO) を含むウイルス液を種々の割合で添加し、37°C、5% CO_2 下で 3~6 時間感染させた。ウイ

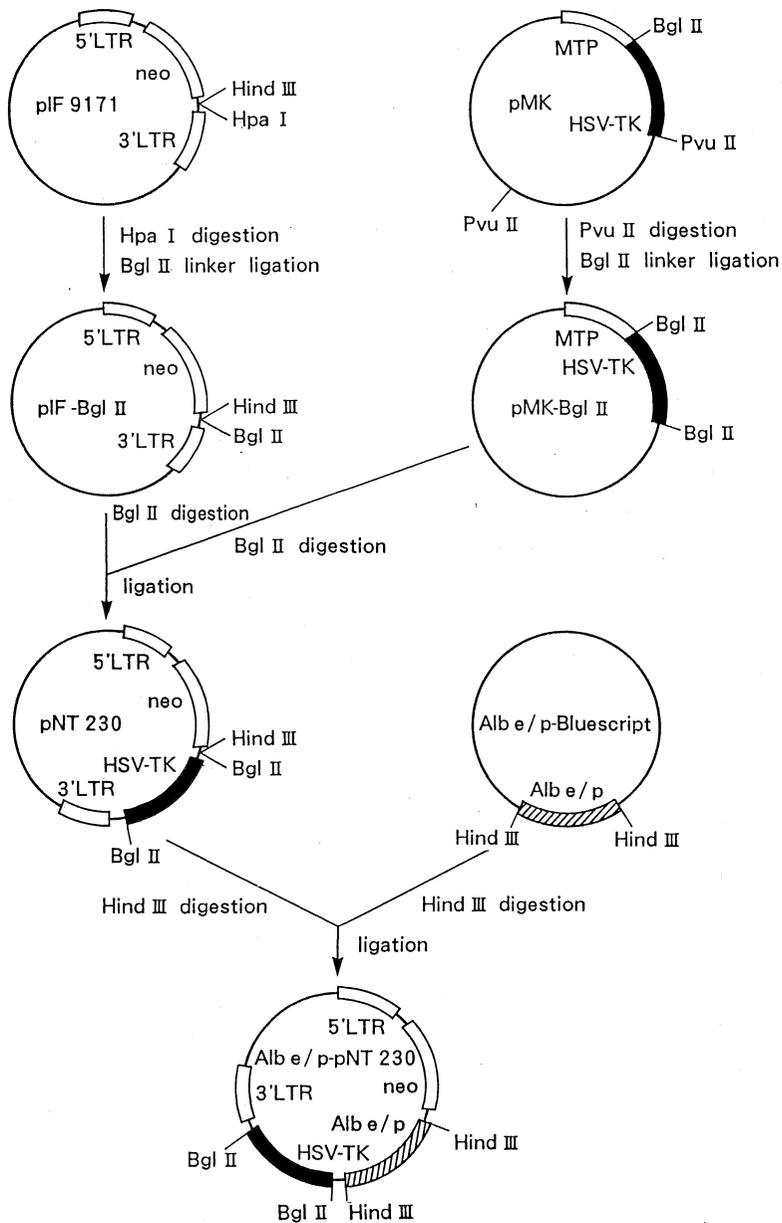


Fig. 1. Schematic drawing of the construction of the Alb e/p-pNT 230 retroviral vector.

Abbreviations used are as follows: LTR, long terminal repeat; neo, neomycin phosphotransferase; MPT, metallothionein promoter; HSV-TK, herpes simplex virus thymidine kinase; Alb e/p, albumin enhancer and promoter region.

ルス含有液を除いた後に新しい培養液を加え2日間培養後, G 418 を 1 mg/ml の濃度で添加し, G 418 耐性細胞株を樹立し以下の実験に用いた.

4) *in vitro* におけるガンシクロビル(GCV)およびアシクロビル(ACV)に対する感受性の検討

各種細胞株の GCV(Syntex Laboratories, Inc.)および ACV(Burroughs Wellcome Co.)に対する感受性は, MTT アッセイ²⁶⁾を用いて検討した. 培養細胞を 1×10^3 cells/cm² の密度で 24-well 培養皿に撒き, GCV あるいは ACV を種々の濃度で添加し3日間培養した後に, 3-(4, 5-diethylthiazolil-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)(Sigma)を 0.5 mg/ml の濃度で添加し, さらに3~4時間培養した後に MTT を含む培養液を除き, 1 ml のジメチルスルホキシドを加え10分間ゆっくりと振盪させ, 540 nm における吸光度を測定した. すべての実験を4回施行し, 細胞生存率は以下のように算出した.

細胞生存率(%) = (GCV あるいは ACV 添加時の吸光度 / GCV および ACV 非添加時の吸光度) × 100

5) *in vivo* における抗腫瘍効果の検討

BALB/c マウスの皮下に 1×10^6 個の HSV-*tk* 遺伝子導入 BNL 1 ME A. 7 R. 1 肝癌細胞あるいは親株細胞を接種し, 皮下肝癌の腫瘍径が約 20 mm に達した時点より, 25 mg/kg の GCV を 1 日 2 回, 14 日間腹腔内に投与し, 最大腫瘍径を測定することにより抗腫瘍効果を判定

した.

6) DNA 解析

培養細胞を 0.5% SDS および 100 μg/ml proteinase K により消化した後に, phenol/chloroform 法¹⁶⁾によりゲノム DNA を抽出し, TE buffer(pH 8.0)に溶解した. ゲノム DNA を *Bgl* II 制限酵素で切断し, 0.7% アガロースゲルを用いて電気泳動をおこない, DNA 断片をアガロースゲルからナイロン膜に写し取った. HSV-*tk* 遺伝子の *Bgl* II 断片をランダムプライミング法¹⁶⁾により ³²P-dCTP で標識しプローブとして用い, Southern プロットをおこなった. Alb e/p-pNT 230 レトロウイルスにより導入される遺伝子構造を Fig. 2 に示した. HSV-*tk* 遺伝子の両末端に *Bgl* II 部位が位置し, 5'末端側の *Bgl* II 部位より約 0.7 kb 下流に, HSV-*tk* 遺伝子内部では唯一の *Sma* I 部位が存在する.

7) Methylation アッセイ

ゲノム DNA を *Bgl* II 制限酵素で切断後, methylation sensitive な制限酵素である *Sma* I でさらに切断し, 0.7% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い, DNA 断片をアガロースゲルからナイロン膜に写し取った. 前述した HSV-*tk* 遺伝子の *Bgl* II 断片をプローブとして用い, Southern プロットをおこなった.

8) 5-azacytidine 処理による GCV に対する感受性の検討

DNA methyltransferase の阻害物質である 5-

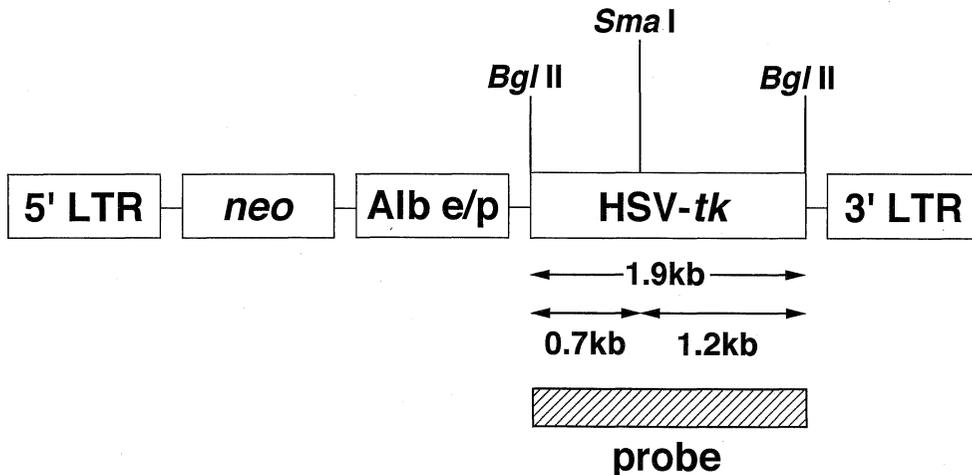


Fig. 2. Structure of the Alb e/p-pNT 230 retroviral vector. Abbreviations used are as follows: LTR, long terminal repeat; *neo*, neomycin phosphotransferase; Alb e/p, albumin enhancer and promoter region; HSV-*tk*, herpes simplex virus thymidine kinase.

azacytidine を、 $5 \mu\text{M}$ の濃度で培養細胞に添加し 2 日間培養後、5-azacytidine を含む培養液を取り除き、種々の濃度の GCV を含む培養液を加えさらに 3 日間培養し、前述の MTT アッセイを用いて生細胞数を算定した。

結 果

1) HSV-*tk* 遺伝子導入による肝癌細胞増殖能への影響

Alb e/p-pNT 230 レトロウイルスベクターによって HSV-*tk* 遺伝子が導入されたマウス肝癌細胞および親株肝癌細胞を、 1×10^3 cells/cm² の密度で撒き、トリパンブルー染色法を用いて生細胞数を経時的に算定した。Alb e/p-pNT 230 感染マウス肝癌細胞と親株肝癌細胞の増殖能には全く差を認めず、倍加時間は共に約 15 時間であった (Fig. 3 A)。

ラット肝癌細胞を用いて同様の検討をおこなったとこ

ろ、Alb e/p-pNT 230 感染ラット肝癌細胞と親株肝癌細胞の増殖能にはやはり有意差を認めず、倍加時間は共に約 15 時間であった (Fig. 3 B)。

2) Alb e/p-pNT 230 レトロウイルス感染肝癌細胞の *in vitro* における GCV に対する感受性

Alb e/p-pNT 230 レトロウイルス感染マウス肝癌細胞は GCV に感受性を示し、 $5 \mu\text{M}$ の GCV 添加によりすべての細胞が死滅し、50% 増殖阻害濃度 (IC₅₀) は約 80 nM であった。一方、親株肝癌細胞は GCV に耐性を示し、 $10 \mu\text{M}$ の GCV を添加しても細胞障害を被らず、IC₅₀ は約 $100 \mu\text{M}$ であり、Alb e/p-pNT 230 レトロウイルス感染マウス肝癌細胞と親株肝癌細胞の GCV に対する感受性には、1,000 倍以上の差を認めた (Fig. 4 A)。

さらに、ラット肝癌細胞についても同様の検討をおこなったところ、Alb e/p-pNT 230 レトロウイルス感染ラット肝癌細胞も GCV に感受性を示し、 $10 \mu\text{M}$ の GCV

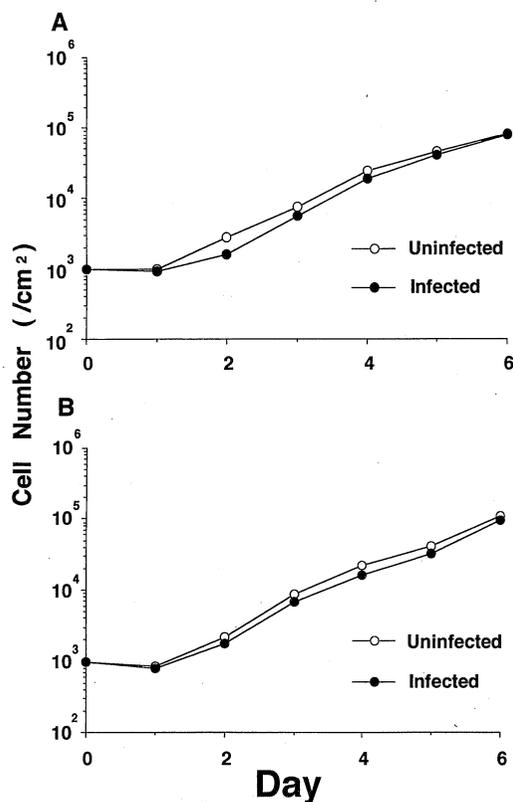


Fig. 3. Growth curve for Alb e/p-pNT 230 retroviral-infected and uninfected murine hepatoma cells (A) and rat hepatoma cells (B).

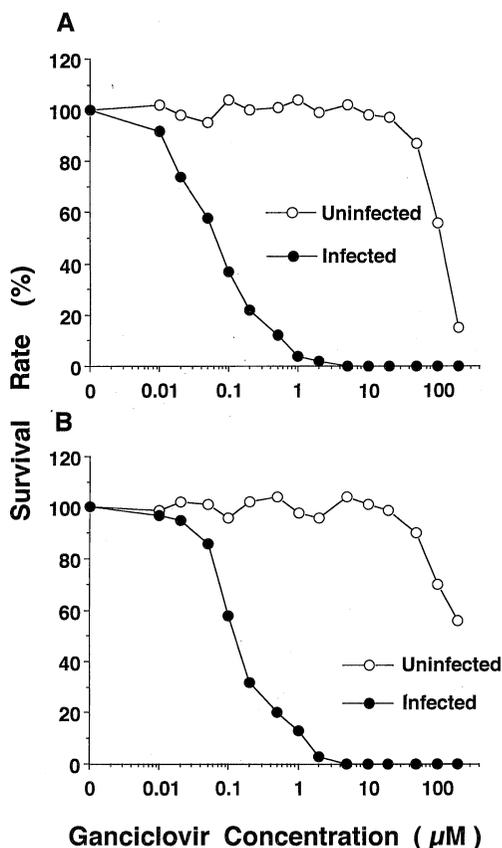


Fig. 4. Ganciclovir sensitivity of Alb e/p-pNT 230 retroviral-infected and uninfected murine hepatoma cells (A) and rat hepatoma cells (B).

添加により細胞は完全に障害され、IC₅₀は約 120 nM であった。一方、親株肝癌細胞は GCV に耐性を示し、10 μM の GCV を添加しても細胞生存率に影響は無く、IC₅₀ は約 200 μM であり、Alb e/p-pNT 230 レトロウイルス感染ラット肝癌細胞と親株細胞の GCV に対する感受性には、やはり 1,000 倍以上の差を認めた(Fig. 4 B)。

3) Alb e/p-pNT 230 レトロウイルス感染肝癌細胞の *in vitro* における ACV に対する感受性

さらに、ACV に対する感受性を検討したところ、Alb e/p-pNT 230 レトロウイルス感染マウス肝癌細胞は、ACV に対しても濃度依存性に感受性を示し IC₅₀ は約 5 μM であった。一方、親株肝癌細胞は ACV に耐性を示し、IC₅₀ は約 150 μM であり、両者の ACV に対する感受性には 30 倍の差を認めた(Fig. 5 A)。

Alb e/p-pNT 230 レトロウイルス感染ラット肝癌細胞も ACV に感染性を示し、IC₅₀ は約 6 μM であった。一

方、親株ラット肝癌細胞の IC₅₀ は約 200 μM であり、両者の ACV に対する感受性には 33 倍の差を認めた(Fig. 5 B)。

4) Alb e/p-pNT 230 レトロウイルス感染非肝癌細胞の GCV に対する感受性

次に、非肝癌細胞にも Alb e/p-pNT 230 レトロウイルスを感染させ、HSV-*tk* 遺伝子の導入をおこない、GCV に対する感受性を検討した。Alb e/p-pNT 230 レトロウイルスを感染させたマウス線維芽細胞およびマウス乳癌細胞は GCV に耐性を示し、今回検討した 10 μM までの GCV 濃度では、親株細胞と比較しても GCV に対する感受性に有意差を認めなかった(Fig. 6)。さらに、Alb e/p-pNT 230 レトロウイルスによって HSV-*tk* 遺伝子が導入された肝癌細胞と比較すると、GCV に対する感受性に少なくとも 100 倍以上の違いを認めた。

5) HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌に対する GCV の抗腫瘍

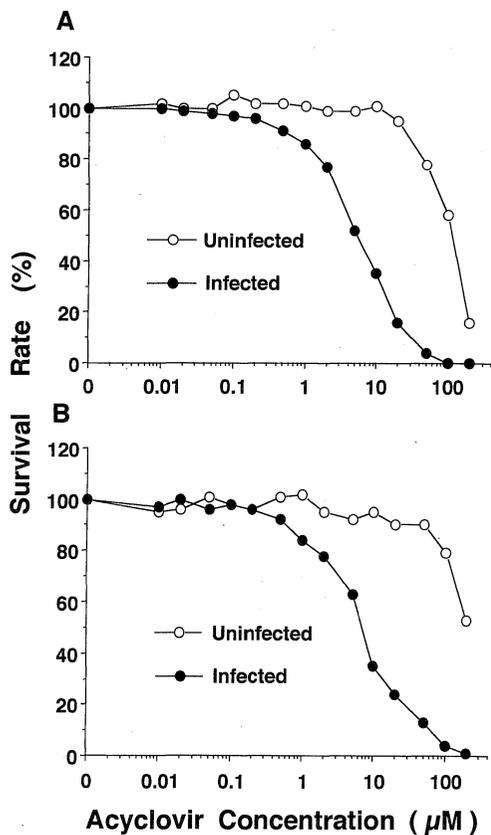


Fig. 5. Acyclovir sensitivity of Alb e/p-pNT 230 retroviral-infected and uninfected murine hepatoma cells (A) and rat hepatoma cells (B).

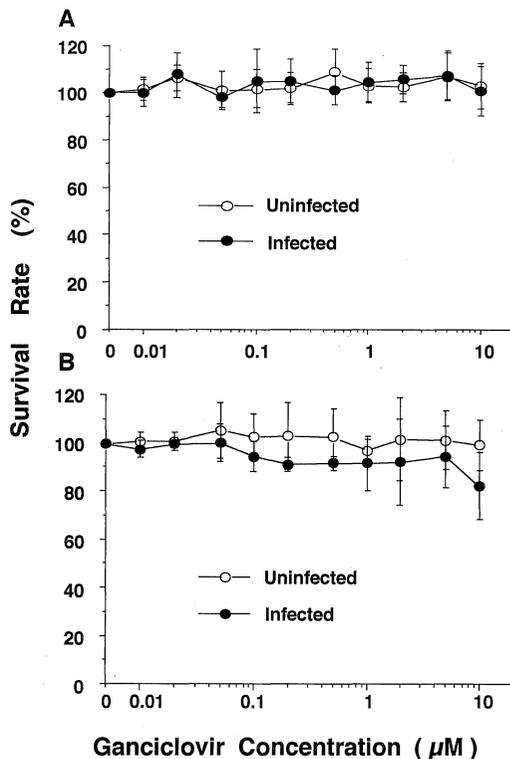


Fig. 6. Ganciclovir sensitivity of Alb e/p-pNT 230 retroviral-infected and uninfected murine fibroblasts (A) and murine mammary tumor cells (B).

効果

BNL1 ME A. 7 R. 1 マウス肝癌細胞を同系の BALB/c マウスの皮下に接種し、皮下肝癌の最大腫瘍径が 20 mm 前後に達した時点より、GCV の腹腔内投与をこなしたが、皮下肝癌は縮小することなく徐々に増大し、14 日後には腫瘍径は約 35 mm に達した (Fig. 7 A)。次に、

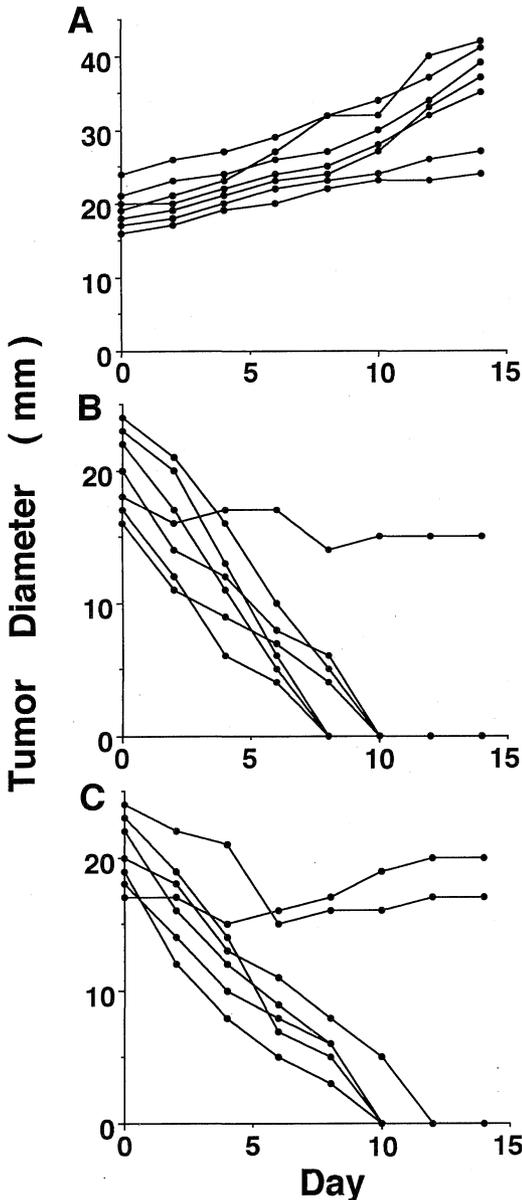


Fig. 7. Ganciclovir treatment for established wild type hepatomas (A) and Alb e/p-PNT 230 retroviral-infected hepatomas (B, C).

HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞を BALB/c マウスに接種し同様の検討をおこなったところ、初回実験では 7 匹中 6 匹のマウスにおいて、再実験では 7 匹中 5 匹のマウスにおいて、皮下肝癌の完全消失を認めた (Fig. 7 B, C)。また、残る 3 匹のマウスにおいても、GCV 投与期間内には有意な腫瘍の増大を認めなかった。GCV 投与により皮下肝癌が完全消失したマウスを Fig. 8 に示した。GCV 投与前には約 20 mm 大に発育していた皮下肝癌が、GCV 投与により完全縮小した。さらに、これらの皮下肝癌消失マウスは、その後 1 年間におよぶ観察をおこなっても腫瘍の再発を認めなかった。

6) GCV 抵抗性肝癌細胞の GCV および G 418 に対する感受性

GCV 投与をおこなっても皮下肝癌が消失しなかった 3 匹のマウスより、腫瘍を摘出し長期培養をおこない混入細胞を除去した後に、3 株の GCV 抵抗性肝癌細胞株、BNL-Refractory A, B, C を樹立した。これらの細胞株



Fig. 8. In the mouse bearing a bulky established subcutaneous hepatoma at the flank region (upper), the tumor was completely abrogated by ganciclovir treatment (lower).

の GCV に対する感受性を, *in vitro* において再検討したところ, BNL-Refractory A, B, C 細胞はいずれも GCV に耐性を示し, 10 μM の GCV を添加しても 80% 以上の細胞が生存しており, Alb e/p-pNT 230 レトロウイルス感染肝癌細胞と比較すると, GCV に対する感受性には約 1,000 倍の差を認めた. また, BNL-Refractory A, B, C 細胞と親株肝癌細胞の GCV に対する感受性には有意差を認めなかった (Fig. 9).

Alb e/p-pNT 230 レトロウイルスベクターにより HSV-*tk* 遺伝子を導入した肝癌細胞には, neomycin phosphotransferase 遺伝子も同時に導入されているので G 418 に耐性を示す. そこで, BNL-Refractory 細胞株の G 418 に対する感受性を検討した. Alb e/p-pNT 230 感染肝癌細胞は G 418 に耐性を示したが, BNL-Refractory A, B, C 細胞はいずれも G 418 に感受性を示し, 親株肝癌細胞と比較しても G 418 に対する感受性に有意差を認めなかった (Fig. 10).

7) GCV 抵抗性肝癌細胞の DNA 解析

BNL-Refractory 細胞株の GCV 抵抗性獲得の機序を解明するために, まず HSV-*tk* 遺伝子欠損の有無を検討した. BNL-Refractory A, B, C 細胞, 親株肝癌細胞さらに Alb e/p-pNT 230 レトロウイルス感染肝癌細胞よりゲノム DNA を抽出し, *Bgl* II 制限酵素で切断後, HSV-*tk* 遺伝子断片をプローブとして Southern ブロットをおこなった. 親株肝癌細胞のゲノム DNA は HSV-*tk* 遺伝子とハイブリッドを形成しなかったが, BNL-Refractory A, B, C 細胞のゲノム DNA は, Alb e/p-pNT 230 感染肝癌細胞のゲノム DNA と同様に, HSV-*tk* 遺伝子とハイブリッドを形成した 1.9 kb のバンドを認めた (Fig. 11).

8) GCV 抵抗性肝癌細胞における HSV-*tk* 遺伝子の methylation の検討

次に, BNL-Refractory 細胞株のゲノム DNA における HSV-*tk* 遺伝子の methylation の有無に関して検討した. ゲノム DNA を *Bgl* II 制限酵素で切断後, methylation sensitive な *Sma* I 制限酵素でさらに切断し,

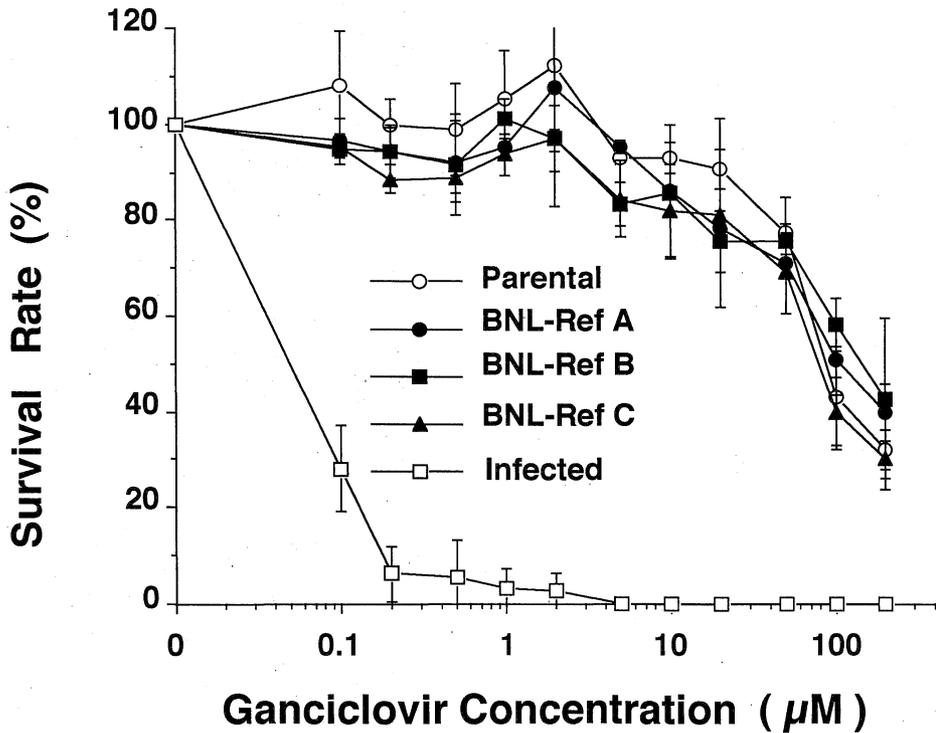


Fig. 9. Ganciclovir sensitivity of BNL-Refractory A, B, C cells, parental hepatoma cells and Alb e/p-pNT 230 retroviral-infected hepatoma cells.

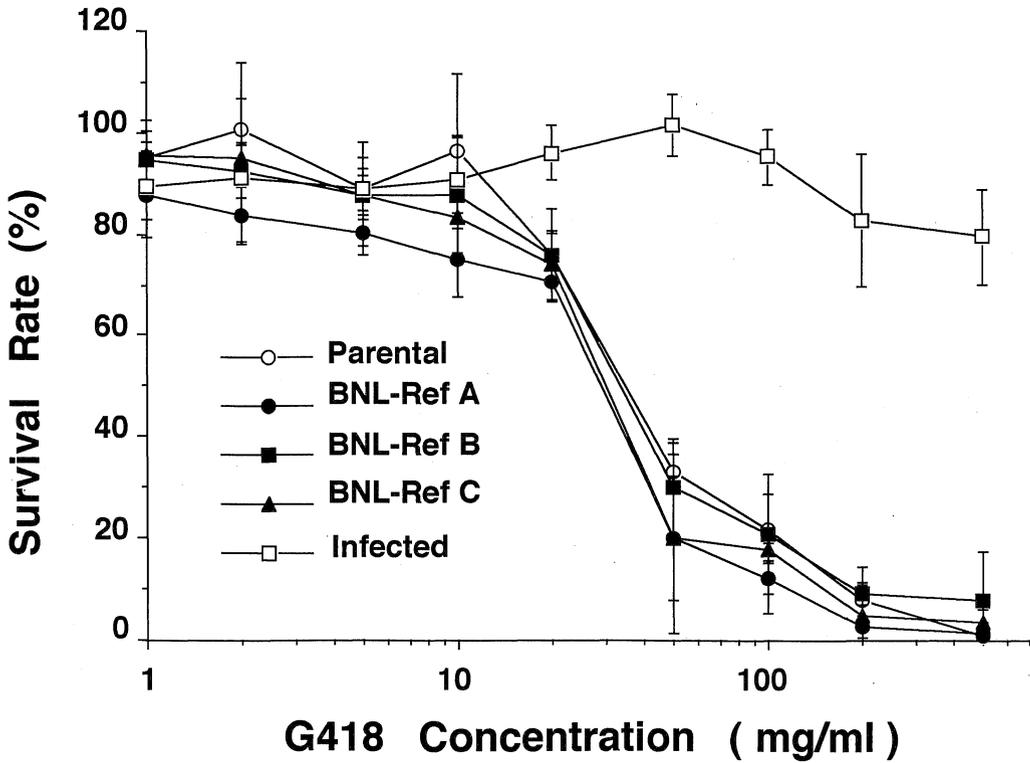


Fig. 10. G418 sensitivity of BNL-Refractory A, B, C cells, parental hepatoma cells and Alb e/p-pNT 230 retroviral-infected hepatoma cells.

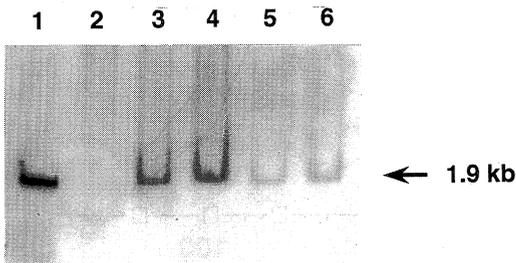


Fig. 11. Southern blot analysis of cellular genomic DNA digested by *Bgl* II restriction enzyme. Lane 1, Alb e/p-pNT 230 retroviral plasmid; lane 2, parental hepatoma cell; lane 3, BNL-Refractory A; lane 4, BNL-Refractory B; lane 5, BNL-Refractory C; lane 6, Alb e/p-pNT 230 retroviral-infected hepatoma cell.

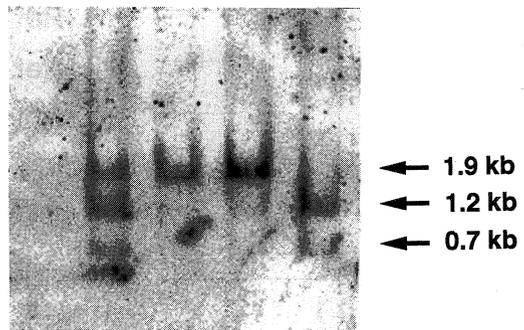


Fig. 12. Southern blot analysis of cellular genomic DNA digested by both *Bgl* II and *Sma* I restriction enzymes. Lane 1, parental hepatoma cell; lane 2, BNL-Refractory A; lane 3, BNL-Refractory B; lane 4, BNL-Refractory C; lane 5, Alb e/p-pNT 230 retroviral-infected hepatoma cell.

HSV-*tk* 遺伝子をプローブとして Southern ブロットをおこなった。1.9 kb の HSV-*tk* 遺伝子は, *Sma* I 制限酵素により 1.2 kb と 0.7 kb の断片に切断されるため, Alb e/p-pNT 230 レトロウイルス感染肝癌細胞のゲノム DNA では, 1.9 kb のバンドは消失し, 1.2 kb と 0.7 kb のバンドを認めた。一方, BNL-Refractory A 細胞に導入された HSV-*tk* 遺伝子は, *Sma* I 制限酵素で完全には切断されず, 1.9 kb, 1.2 kb, 0.7 kb のバンドを認めた。また, BNL-Refractory B および C 細胞内の HSV-*tk* 遺伝子は, *Sma* I 制限酵素では全く切断されず, 1.9 kb のバンドを認めたのみであった(Fig. 12)。以上より, BNL-Refractory 細胞株においては, Alb e/p-pNT 230 レトロウイルスベクターにより導入された HSV-*tk* 遺伝子が, メチル化されていることが示された。

9) 5-azacytidine 添加による GCV 感受性の回復

次に, DNA methyltransferase を阻害し, DNA の脱

メチル化を誘導する 5-azacytidine の投与により, BNL-Refractory A, B, C 細胞の GCV に対する感受性が回復するかを検討した。BNL-Refractory A, B, C 細胞, Alb e/p-pNT 230 レトロウイルス感染肝癌細胞, 親株肝癌細胞に 5 μ M の濃度で 5-azacytidine を添加し 2 日間培養した後, 種々の濃度の GCV を添加しさらに 3 日間培養をおこない, 生細胞数を算定した。BNL-Refractory A, B, C 細胞は, 5-azacytidine 処理により GCV に対する感受性を部分的に回復し, 親株肝癌細胞と比較すると, 5 μ M 以上の GCV 濃度において感受性に有意差を認めた(Fig. 13)。

考 察

近年の分子生物学のめざましい発達と細胞培養技術の進歩により, 遺伝子治療に関する研究は急速な発展を遂げ, 欧米を中心に臨床治験が開始されている。現在おこ

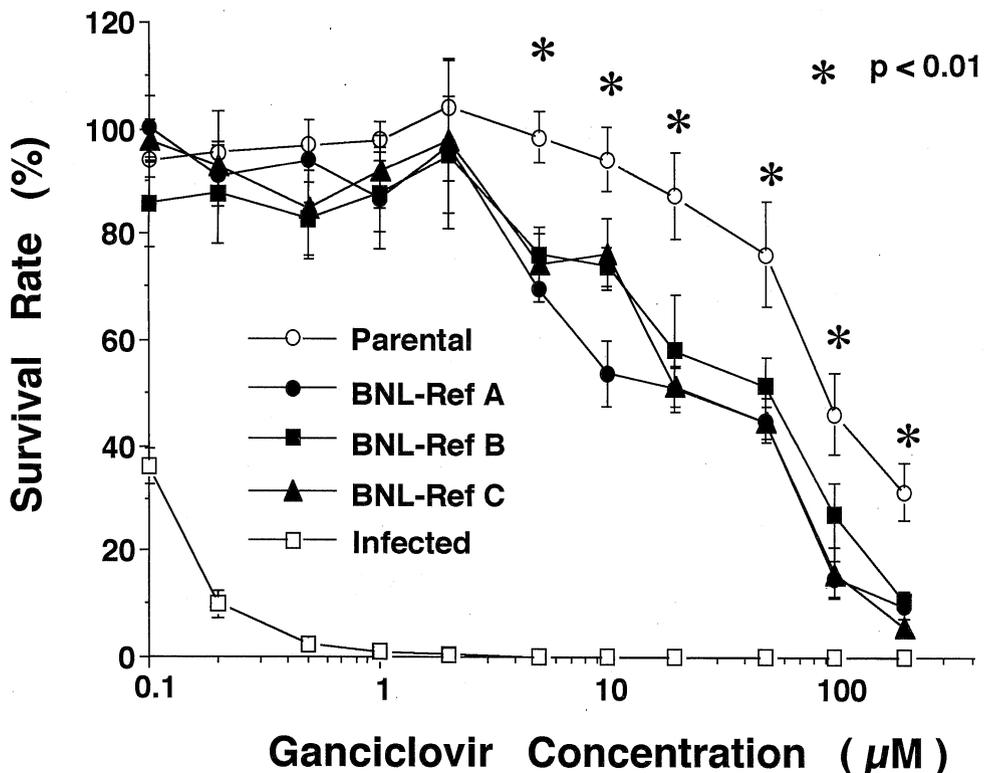


Fig. 13. Ganciclovir sensitivity after 5-azacytidine treatment of BNL-Refractory A, B, C cells, parental hepatoma cells and Alb e/p-pNT 230 retroviral-infected hepatoma cells. The symbol "*" represents that values of BNL-Refractory A, B, C cells are significantly different from that of parental hepatoma cells at $p < 0.01$ by Student's *t* test.

なわれている遺伝子治療の臨床試験の半数以上は、悪性腫瘍を対象としており、嚢胞性線維症に対する遺伝子治療を除き、組換えレトロウイルスをベクターとして使用している。レトロウイルスは、増殖期の細胞にのみ感染し、静止期にある細胞には感染しないという性質²⁷⁾を有しており、癌に対する遺伝子治療に適したベクターと考えられている。しかし、*in vivo* 遺伝子導入法を用いて、癌に対する遺伝子治療をおこなおうとすれば、骨髓細胞や腸管上皮細胞などの増殖期にある正常細胞にもレトロウイルスが感染し、外来遺伝子が導入発現される可能性が存在する。特に、*in vivo* 遺伝子導入法を用いて細胞障害性を有する遺伝子を導入し、癌に対する遺伝子治療をおこなう場合には、標的とする癌細胞特異的な遺伝子発現法を確立することが不可欠である。

当教室ではすでに、アルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーター領域を内因性のプロモーターとして、レポーター遺伝子である大腸菌の β -galactosidase 遺伝子を発現するレトロウイルスベクターを用いれば、骨髓細胞や正常肝細胞に影響することなく、肝癌細胞特異的にレポーター遺伝子の発現を誘導し得ることを確認している¹⁰⁾。そこで著者は、レトロウイルスベクターを用いた肝癌に対する遺伝子治療の基礎的研究として、suicide 遺伝子導入とプロドラッグ投与による肝癌に対する細胞障

害性ならびに抗腫瘍効果を検討した。

suicide 遺伝子としては、glioma^{28), 29)}, adenocarcinoma³⁰⁾, melanoma³¹⁾などの細胞株に対してすでに有用性が示されている HSV-*tk* 遺伝子を使用した。HSV-*tk* 遺伝子導入とプロドラッグ投与による細胞障害の機序を Fig. 14 に示した。HSV-*tk* 遺伝子を発現している細胞へ、抗ウイルス剤として臨床的にも使用されている GCV や ACV を投与すると、両プロドラッグは HSV-*tk* 酵素により一リン酸化物へ変換される。これらの一リン酸化物はさらに、細胞由来のリン酸化酵素により三リン酸化物へ代謝される。これらの三リン酸化物は、デオキシングアノシン三リン酸の類似物質であるため、DNA 合成に際して DNA ポリメラーゼ活性を阻害し、さらに染色体内に取り込まれることにより DNA 鎖の伸展を終結させ細胞死を誘導する。一方、哺乳類細胞のチミジンキナーゼは GCV や ACV を基質としないため、プロドラッグである GCV や ACV はリン酸化されず細胞は障害を被らない。

本研究においては、アルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーター領域の制御下に、HSV-*tk* 遺伝子が発現されるように構築した Alb e/p-pNT 230 レトロウイルスベクターを作製し、種々の細胞株へ遺伝子導入をおこなない、プロドラッグとして使用した GCV および

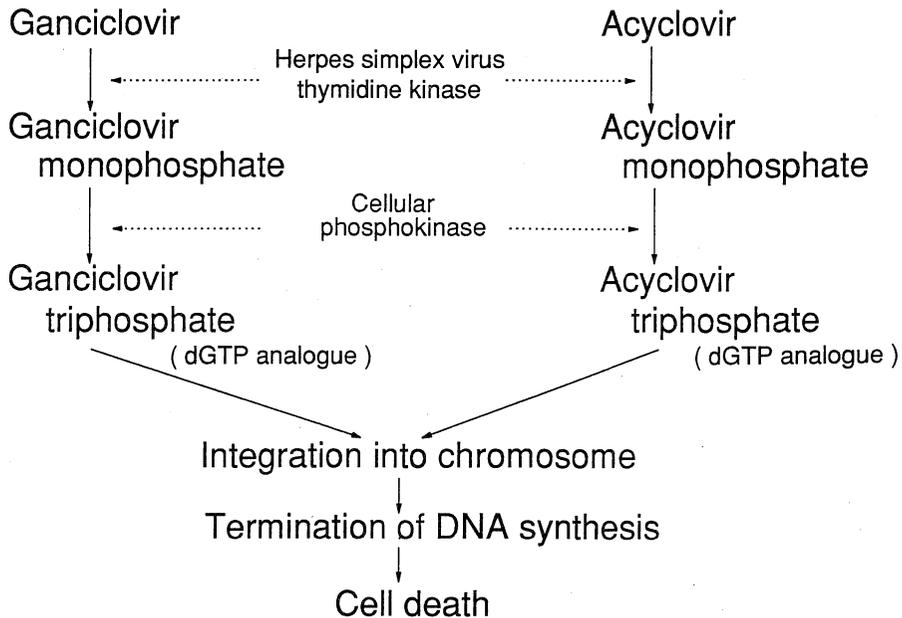


Fig. 14. Mechanism of cytotoxicity induced by the HSV-*tk* gene expression and prodrug treatment.

ACV に対する感受性を検討した。レトロウイルスベクターを用いて HSV-*tk* 遺伝子を導入したのみでは、細胞障害性は認められず、HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞と親株肝癌細胞の増殖能には全く違いを認めなかった。しかし、HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞は、プロドラッグ投与により著明な障害を被った。

HSV-*tk* 遺伝子を用いた癌に対する遺伝子治療の臨床応用を考えた場合、プロドラッグの選択も重要な問題である。GCV と ACV はそれぞれ、サイトメガロウイルス感染症および単純ヘルペスウイルス、帯状疱疹ウイルス感染症に対する抗ウイルス剤として、臨床投与が広くおこなわれている薬剤であり、安全性に関する種々の検討もなされている。今回の肝細胞癌を用いた検討において、HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞は、GCV に対しても ACV に対しても濃度依存性に感受性を示したが、親株細胞と比較すると、GCV に対する感受性には、1,000 倍以上の違いを認めたが、ACV に対する感受性には約 30 倍の相違を認めたのみであった。GCV の臨床使用においては、血中濃度は $2 \mu\text{M}$ 以上に維持されることが報告³²⁾されているが、この GCV 濃度は HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞をほぼ完全に死滅させ、親株細胞には全く影響を与えない濃度であった。一方、ACV の臨床投与例においては、血中濃度は $4 \mu\text{M}$ 以上に維持されており³³⁾、この ACV 濃度は、親株細胞に影響することなく約 40% の HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞を死滅させ得る濃度であった。以上より、GCV と ACV は共に、HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞を障害するのに有効なプロドラッグであるが、本法を用いた遺伝子治療の臨床応用に際しては、GCV の方がより強力な細胞障害を惹起し得ることが示唆された。

レトロウイルスは血球細胞や線維芽細胞をはじめとする応答的な増殖期細胞に感染することが報告³⁴⁾されており、*in vivo* 遺伝子導入法においてレトロウイルスベクターを用いれば、多くの細胞が増殖期にある骨髄細胞や腸管上皮細胞などの正常細胞へも外来遺伝子が導入発現される危険性が存在する。そこで、アルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーターの制御下に、HSV-*tk* 遺伝子が発現されるように構築した Alb e/p-pNT 230 レトロウイルスベクターを、マウス線維芽細胞や乳癌細胞などの非肝癌細胞に感染させ HSV-*tk* 遺伝子を導入し、GCV に対する感受性を検討した。これらのレトロウイルス感染非肝癌細胞は GCV に耐性を示し、 $10 \mu\text{M}$ の GCV を添加しても、親株細胞と比較し生存率に有意差を認めなかった。さらに、これらのレトロウイルス感染非肝癌細胞の GCV に対する IC_{50} は、今回検討した $10 \mu\text{M}$ を上回り、レトロウイルス感染肝癌細胞と比較し、GCV に対

する感受性には少なくとも 100 倍以上の違いを認めた。これらの結果より、アルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーターの制御下に HSV-*tk* 遺伝子を発現するレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入をおこなない、プロドラッグとして GCV を投与すると、増殖期にある正常細胞を障害することなく、肝癌細胞を選択的に死滅させ得ることが示唆された。

次に、HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞を同系マウスに接種し、皮下肝癌が十分に発育した後に GCV の腹腔内投与をおこなったところ、体重減少などの明らかな副作用を認めることなく、14 匹中 11 匹のマウスにおいて皮下肝癌の完全消失を認めた。したがって、肝癌内へ効率的に HSV-*tk* 遺伝子を導入できれば、腫瘍の縮小を誘導し得ることが示唆された。現在のところ、レトロウイルスベクターの遺伝子導入効率は低く、皮下腫瘍モデルを用いた検討においては、導入効率は 10-70% 程度と報告³⁵⁾されている。しかし、本研究に用いたレトロウイルスベクターは、他の細胞に影響することなく肝癌細胞特異的に HSV-*tk* 遺伝子の発現を誘導し得るので、レトロウイルスを反復感染させたりウイルス産生細胞自体を投与することも可能で、これらの手技により遺伝子導入効率を向上させ得ると考えられる。

DNA のメチル化と脱メチル化が、遺伝子発現の調節において重要な役割を果たしていることに関しては、すでに数多くの研究がなされており³⁶⁾、housekeeping 遺伝子や分化誘導遺伝子も、メチル化によって遺伝子発現の調節を受けていることが報告³⁷⁾されている。さらに、レトロウイルスを初めとする種々のウイルスは、宿主細胞に感染後、ウイルスゲノム遺伝子が高率にメチル化されることも報告³⁸⁾されている。また、レトロウイルスベクターを用いて外来遺伝子の導入をおこなった場合にも、導入遺伝子がメチル化され遺伝子発現が停止することが報告³⁹⁾されている。著者も本研究において、GCV 投与をおこなっても皮下肝癌の消失を認めなかったマウスより GCV 抵抗性肝癌細胞株を樹立し、GCV 抵抗性獲得の機序を検討したところ、これらの細胞では HSV-*tk* 遺伝子の欠落は認められず、HSV-*tk* 遺伝子がメチル化されていることが示された。さらに、DNA methyltransferase を阻害し、DNA の脱メチル化を誘導する 5-azacytidine⁴⁰⁾処理により、GCV 抵抗性肝癌細胞の GCV に対する感受性が部分的に回復したことより、レトロウイルスベクターを用いて導入した HSV-*tk* 遺伝子の発現消失に、DNA のメチル化が深く関与していることが示唆された。今後、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療において、導入遺伝子のメチル化による遺伝子

発現の消失が問題になることも予想されるが、今回の検討より、5-azacytidine 処理をおこなうことにより、導入遺伝子の発現を回復し得る可能性が示唆された。

近年、本邦においては、肝癌による死亡者数が男性を中心に著増している。肝癌患者の大多数は、基礎疾患として重篤な肝硬変を合併しているため、外科的治療の適応となることは少なく、経カテーテル的肝動脈塞栓療法や経皮的エタノール注入療法などの保存的療法が施行されている。しかし、これらの治療法による成績は、必ずしも満足できるものではなく、革新的な治療法の開発が望まれている。今後さらに検討を重ねる必要があるが、アルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーター領域の制御下に HSV-*tk* 遺伝子を発現するレトロウイルスベクターと GCV を用いた遺伝子治療は、肝癌に対する有望な治療法になり得ると考えられる。

結 語

肝癌に対する遺伝子治療の基礎的研究として、suicide 遺伝子導入とプロドラッグ投与による細胞障害性さらに抗腫瘍効果に関する検討をおこなった。HSV-*tk* 遺伝子がアルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーター領域の制御下に発現されるように構築した Alb e/p-pNT 230 レトロウイルスベクターを作製し、種々の細胞株へ遺伝子導入をおこない、プロドラッグとして GCV あるいは ACV を投与し、以下のごとき結果を得た。

1. Alb e/p-pNT 230 レトロウイルスを肝癌細胞に感染させ HSV-*tk* 遺伝子を導入させたが、レトロウイルス感染肝癌細胞の増殖能は親株細胞に比し有意差を認めず、倍加時間は約 15 時間であった。

2. Alb e/p-pNT 230 レトロウイルス感染肝癌細胞は GCV に濃度依存性に感染性を示し、10 μ M の GCV 添加により全細胞が死滅したが、親株細胞は抵抗性を示し、GCV に対する感受性には 1,000 倍以上の差違を認めた。また、Alb e/p-pNT 230 レトロウイルス感染肝癌細胞は、ACV に対しても濃度依存性に感受性を示したが、親株細胞と比較すると ACV に対する感受性には約 30 倍の差違を認めたのみであった。

3. Alb e/p-pNT 230 レトロウイルスを線維芽細胞や乳癌細胞などの非肝癌細胞に感染させ、HSV-*tk* 遺伝子を発現させたが、これらの非肝癌細胞は GCV に抵抗性を示し、10 μ M の GCV を添加しても細胞は有意な障害を被らず、Alb e/p-pNT 230 レトロウイルス感染肝癌細胞と比較すると、GCV に対する感受性には 100 倍以上の差違を認めた。

4. 親株肝癌細胞をマウス皮下に接種し、皮下肝癌が形

成された後に GCV の腹腔内投与をおこなったが、皮下肝癌は消失することなく増大した。一方、Alb e/p-pNT 230 レトロウイルス感染肝癌細胞を接種した場合には、GCV 投与により 14 匹中 11 匹のマウスにおいて、皮下肝癌の完全消失を認めた。

5. GCV 投与をおこなっても皮下肝癌の消失を認めなかったマウスより、GCV 抵抗性肝癌細胞を樹立した。これらの細胞株は培養系に戻しても、やはり GCV に抵抗性を示したが、導入された HSV-*tk* 遺伝子は脱落しておらず、メチル化されていることが判明した。さらに、脱メチル化作用を有する 5-azacytidine 処理により、これらの GCV 抵抗性肝癌細胞株の GCV に対する感受性は部分的に回復した。

6. 以上より、アルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーターを内因性の制御因子とするレトロウイルスベクターを用いて、HSV-*tk* 遺伝子を導入し GCV 投与をおこなえば、増殖期にある正常細胞に影響することなく、肝癌細胞に特異的な細胞障害を誘導し得ることが示唆された。さらに、HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌が *in vivo* において完全消失したことにより、本法を用いた肝癌に対する遺伝子治療の有用性が示唆された。

(本論文の要旨は、1994 年度の国際肝臓学会議、第 36 回日本消化器病学会ワークショップにおいて発表した。稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜った恩師辻井 正学長ならび福井 博教授に深甚の謝意を捧げるとともに、ご助言、御校閲を賜った病態検査学教室中野 博教授ならび腫瘍病理学教室小西陽一教授に深謝いたします。

また、本研究の遂行にあたって常に御指導、御助力をいただいた栗山茂樹博士ならびに御助力をいただいた教室の諸兄に感謝の意を表します。)

なお、本研究は文部省科研費一般研究(B)07457141 の援助をうけた。

文 献

- 1) Thompson, L. : Science 258 : 744, 1992.
- 2) Miller, A. D. : Nature 357 : 455, 1992.
- 3) Morgan, R. A. and Anderson, W. F. : Annu. Rev. Biochem. 62 : 191, 1993.
- 4) 厚生省大臣官房 : 遺伝子治療臨床研究に関するガイドラインについて, 1993.
- 5) 文部省学術審議会特定領域推進分科会 : 大学等における遺伝子治療臨床研究に関するガイドライン, 1994.

- 6) **Friedmann, T.** : Hum. Gene. Ther. **1** : 175, 1990.
- 7) **Weatherall, D. J.** : Nature **349** : 275, 1991.
- 8) **Ledley, F. D.** : Hepatology **18** : 1263, 1993.
- 9) **Culver, K. W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E. H. and Blaese, R. M.** : Science **256** : 1550, 1992.
- 10) **Yao, S. -N. and Kurachi, K.** : Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89** : 3357, 1992.
- 11) **Williams, R. S., Johnston, S. A., Riedy, M., Devit, M. J., McElligott, S. G. and Sanford, J. C.** : Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88** : 2726, 1991.
- 12) **Wu, G. Y., Wilson, J. M., Shalaby, F., Grossman, M., Shafritz, D. A. and Wu, C. H.** : J. Biol. Chem. **266** : 14338, 1991.
- 13) **Yang, N. S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B. and McCabe, D.** : Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87** : 9568, 1990.
- 14) **Nabel, E. G., Plautz, G. and Nabel, G. J.** : Science **249** : 1285, 1990.
- 15) **Kuriyama, S., Yoshikawa, M., Ishizaka, S., Tsujii, T., Ikenaka, K., Kagawa, T., Morita, N. and Mikoshiba, K.** : Cell. Struct. Funct. **16** : 503, 1991.
- 16) **Sambrook, J., Fritsch, F. F. and Maniatis, T.** : Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- 17) **Eglitis, M. A., Kantoff, P., Gilboa, E. and Anderson, W. F.** : Science **230** : 1395, 1985.
- 18) **Ikenaka, K., Nakahira, K., Nakajima, K., Fujimoto, I., Kagawa, T., Ogawa, M. and Mikoshiba, K.** : New Biologist **4** : 53, 1992.
- 19) **Brinster, R. L., Chen, H. Y., Trumbauer, M., Senear, A. W., Warren, R. and Palmiter, R. D.** : Cell **27** : 223, 1981.
- 20) **Pinkert, C. A., Ornitz, D. M., Brinster, R. L. and Palmiter, R. D.** : Gene. Dev. **1** : 268, 1987.
- 21) **Mann, R., Mulligan, R. C. and Baltimore, D.** : Cell **33** : 153, 1983.
- 22) **Chen, C. and Okayama, H.** : Mol. Cell. Biol. **7** : 2745, 1987.
- 23) **Patek, P. Q., Collins, J. L. and Cohn, M.** : Nature **276** : 510, 1978.
- 24) **Katsuta, H., Takaoka, T. and Yasumoto, S.** : J. Natl. Cancer Inst. **51** : 1841, 1973.
- 25) **Jainchill, J. L., Aaronson, S. A. and Todaro, G. J.** : J. Virol. **4** : 549, 1969.
- 26) **Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell J. B.** : Cancer Res. **47** : 936, 1987.
- 27) **Miller, D. G., Adam, M. A. and Miller, A. D.** : Mol. Cell. Biol. **10** : 4239, 1990.
- 28) **Takamiya, Y., Short, M. P., Moolten, F. L., Fleet, C., Mineta, T., Breakefield, X. O. and Martuza, R. L.** : J. Neurosurg. **79** : 104, 1993.
- 29) **Barba, D., Hardin, J., Ray, J. and Gage, F. H.** : J. Neurosurg. **79** : 729, 1993.
- 30) **Caruso, M., Panis, Y., Gagandeep, S., Houssin, D., Salzmann, J. -L. and Klatzmann, D.** : Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90** : 7024, 1993.
- 31) **Vile, R. G. and Hart, I. R.** : Cancer Res. **53** : 3860, 1993.
- 32) **Sommadossi, J. -P., Bevan, R., Ling, T., Lee, F., Mastre, B., Chaplin, M. D., Nerenberg, C., Koretz, S. and Buhles, Jr., W. C.** : Rev. Infect. Dis. **10**(Suppl 3) : S 507, 1988.
- 33) **Blum, M. R., Liao, S. H. T. and Miranda, P. D.** : Am. J. Med. **73**(Suppl 1) : 186, 1982.
- 34) **Cone, R. D. and Mulligan, R. C.** : Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81** : 6349, 1984.
- 35) **Ram, Z., Culver, K. W., Walbridge, S., Blaese, R. M. and Oldfield, E. H.** : Cancer Res. **53** : 83, 1993.
- 36) **Doerfler, W.** : Ann. Rev. Biochem. **52** : 93, 1983.
- 37) **Jaenisch, R. and Jahner, D.** : Biochemica et Biophysica Acta **782** : 1, 1984.
- 38) **Chumakov, I., Stuhlmann, H., Harbers, K. and Jaenisch, R.** : J. Virol. **42** : 1088, 1982.
- 39) **Challita, P. -M. and Kohn, D. B.** : Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91** : 2567, 1994.
- 40) **Jones, P. A. and Taylor, S. M.** : Nucleic Acids Res. **9** : 2933, 1981.