

単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ遺伝子と
ガンシクロビルによる肝臓に対する
遺伝子治療における bystander effect の検討

奈良県立医科大学第3内科学教室

菊川政次

POSSIBLE MECHANISMS OF THE BYSTANDER EFFECT CAUSED BY
THE HERPES SIMPLEX VIRUS THYMIDINE KINASE AND GANCICLOVIR IN
THE TREATMENT FOR HEPATOCELLULAR CARCINOMA

MASAJI KIKUKAWA

The Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received August 19, 1998

Abstract: Because it appears impossible to transfer a suicide gene to all the cells of a cancer, existence of a bystander effect caused by a suicide gene and prodrug system is critical to achieve effective antitumor effects. In the present study, possible mechanisms of the bystander effect caused by the herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-*tk*) gene and ganciclovir (GCV) have been investigated not only *in vitro* but also *in vivo*. Murine and rat hepatocellular carcinoma (HCC) cells were retrovirally transduced with the HSV-*tk* gene. HSV-*tk*-transduced HCC cells were shown to be profoundly more sensitive to GCV compared to parental cells. HSV-*tk*-transduced cells exhibited marked cytotoxicity on parental cells in the presence of GCV. This *in vitro* bystander effect was shown to be substantially dependent on cell-to-cell contact. To investigate the *in vivo* bystander effect, parental HCC cells were mixed with HSV-*tk*-transduced counterparts and inoculated subcutaneously into syngeneic mice. When systemic GCV treatment was initiated 3 days after the inoculation, profound antitumor effects on preestablished tumors were observed, resulting in significant inhibition of tumor formation when only 5% of the inoculated cells were HSV-*tk*-transduced ones. Importantly, animals that did not develop tumors resisted subsequent rechallenge with parental HCC cells, indicating that tumor immunity was induced by the HSV-*tk*/GCV system. Furthermore, when GCV treatment was initiated after mice developed subcutaneous HCC tumors, profound antitumor effects were observed even on established tumors. When subcutaneous HCC tumors contained only 10% of HSV-*tk*-transduced cells, significant tumor eradication was induced by GCV treatment. Importantly, when animals with subcutaneously established HCC were given an intratumoral infusion of retroviruses carrying the HSV-*tk* gene followed by GCV treatment, significant tumor regression and prolonged survival period were achieved. These results indicate that the HSV-*tk*/GCV system can induce potent antitumor effects *in vivo* by eliciting the host's tumor immunity. (奈医誌. J. Nara Med. Ass. 49, 334~348, 1998)

Key words : gene therapy, herpes simplex virus thymidine kinase, ganciclovir, bystander effect, hepatocellular carcinoma

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進歩を遂げている。遺伝子マッキングプロトコールを含めると、既に2,500人以上が遺伝子の投与を受けており、その半数以上は癌を対象とした遺伝子治療である¹⁾。わが国においては、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^{2,3)}が発表され、1995年8月には先天性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。さらに、1998年7月には腎細胞癌患者に対する遺伝子治療の臨床試験が厚生省によって承認された。しかし、現状の遺伝子治療では、悪性腫瘍に対しては期待されたほどの効果が得られておらず、新たなブレイクスルーが必要とされており、基礎研究の充実が当面は重要であると考えられている¹⁾。

癌に対する遺伝子治療法としては、(1)癌細胞に癌抑制遺伝子や癌遺伝子のアンチセンス遺伝子を導入し、癌細胞の増殖を直接抑制する方法、(2)腫瘍浸潤リンパ球や癌細胞に種々のサイトカイン遺伝子や主要組織適合遺伝子複合体(MHC)などを導入し、癌細胞に対する宿主の腫瘍免疫を増強する方法、(3)癌細胞にsuicide遺伝子を導入した後にプロドラッグを投与し、癌細胞を死滅させる方法、(4)造血幹細胞に多剤耐性遺伝子を導入し、抗癌剤に対する耐性を獲得させた後により強力な化学療法を行う方法などが、積極的に研究されており、米国を中心に臨床試験が行われている¹⁾。

当教室では、以前よりレトロウイルスベクターを用いて、肝癌に対する遺伝子治療に関する基礎的検討を行っており、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、肝癌細胞に特異的に発現することを報告している⁴⁾。また、suicide遺伝子を用いた肝癌に対する遺伝子治療の基礎的研究として、単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ(HSV-*tk*)遺伝子をアルブミン遺伝子プロモーターの制御下に導入すると、肝癌細胞のみがプロドラッグによって選択的に傷害されること⁵⁾、さらにHSV-*tk* 遺伝子に対するプロドラッグとしては、アシクロビルよりもガンシクロビル(GCV)がより有効であることを報告している⁶⁾。

ところで、suicide 遺伝子とプロドラッグを用いた癌に対する遺伝子治療では、suicide 遺伝子が導入された癌細胞のみならず、遺伝子が導入されていない近傍の癌細胞もプロドラッグによって傷害されることが報告されている⁶⁻¹⁰⁾。この現象はbystander effect と呼ばれており、すべての癌細胞にsuicide 遺伝子を導入することが技術的に不可能な現状においては、どの程度強力なbystander effect を誘導し得るかが、癌に対する遺伝子治療の有効性を左右するといっても過言ではない。HSV-*tk* 遺伝子とGCVによるbystander effect には、HSV-*tk* 遺伝子導入細胞と非導入細胞の接触が必要であり、gap junction が重要な役割を担っていると考えられているが、bystander effect の詳細に関しては、未だ不明な点が多い。そこで著者は、マウスおよびラット肝癌細胞を用いて、HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムによって誘導されるbystander effect に関する基礎的検討を行うとともに、肝癌に対する遺伝子治療の可能性を検討した。

材料と方法

1) 組み換えレトロウイルスベクター

すべてのプラスミドは標準的な組み換えDNA技術¹¹⁾によって作成した。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に関しては、当教室のKuriyama¹²⁾らがすでに報告している。同ベクターはモロー株マウス白血病ウイルス由来のlong terminal repeat 間に、ネオマイシン耐性を与えるneomycin phosphotransferase 遺伝子、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、およびHSV-*tk* 遺伝子が組み込まれている(Fig. 1)。

2) 組み換えレトロウイルスベクターの産生法

両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PA 317細胞¹³⁾を 1×10^6 cells/cm²の密度で60 mm培養皿にまき、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条件下で培養した。翌日に、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¹⁴⁾によりPA 317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(GIBCO, Grand Island, NY)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PA 317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

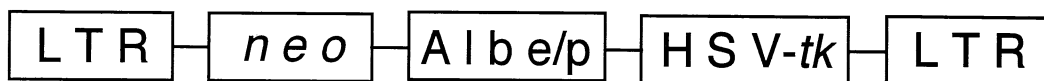


Fig. 1. Structure of the Alb e/p-pNT230 retroviral vector.

This recombinant retroviral vector contains the neomycin phosphotransferase (*neo*) gene, which confers G418 resistance on transfected cells, the murine albumin enhancer and promoter (Alb e/p) fragment, as an internal promoter, and the HSV-*tk* gene within two Moloney murine leukemia virus long terminal repeats (LTRs).

回収し、0.45 μm の poresize の filter (Millipore Corp., Bedford, MA) で濾過後、 -70°C に凍結保存し、組み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。

なお、組み換えレトロウイルスのタイターは、Kuriyama⁴⁾らの方法に従い、BALB/c マウス由来の NIH 3 T 3 線維芽細胞¹⁵⁾ にレトロウイルスを感染させた後に G 418 を添加し、G 418 耐性のコロニー数を算定することにより、colony-forming units (CFU)/ml とし表した。

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¹⁶⁾、ラット由来の腹水肝癌細胞である JTC 16 P 3 細胞¹⁷⁾、さらに NIH 3 T 3 線維芽細胞を用いた。

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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 % CO_2 の条件下で培養した。レトロウイルス感染法は、培養細胞に 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Polybrene (Sigma, St. Louis, MO) を含むウイルス液を種々の割合で添加し、 37°C 、5 % CO_2 の条件下で 4 ~ 6 時間感染させた。ウイ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 HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞 (BNL-*tk* および JTC-*tk* 細胞) を樹立し以下の実験に用いた。

4) *in vitro* における GCV に対する感受性の検討

各種細胞株の GCV (F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) に対する感受性は MTT アッセイ¹⁸⁾ を用いて検討した。培養細胞を 1×10^3 cells/cm² の密度で 24-well 培養皿にまき、GCV を種々の濃度で添加し 3 日間培養した後に、3-(4, 5-Dimethylthiazol-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 dimethyl sulfoxide

(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を各 well に加え 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 添加時の吸光度 / GCV 非添加時の吸光度) $\times 100$

5) *in vitro* における bystander effect の検討

HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞をそれぞれの親株細胞に種々の割合で混合し、細胞が互いに接触する高細胞密度 (2×10^4 cells/cm²) (Fig. 2A)、あるいは細胞が互いに接触しない低細胞密度 (1×10^3 cells/cm²) (Fig. 2B) で 24-well 培養皿にまき、10 μM の GCV 存在下で 4 日間培養した後に、前述のごとく MTT アッセイを行い、下記のように細胞生存率を算定した。

細胞生存率 (%) = (親株細胞と HSV-*tk* 遺伝子導入細胞の混合培養時の吸光度 / 親株細胞のみの培養時の吸光度) $\times 100$

6) HSV-*tk* 遺伝子導入細胞の培養液の細胞傷害能の検討

HSV-*tk* 遺伝子導入細胞を 1×10^4 cells/cm² の密度で、60 mm の培養皿に 10 μM の GCV の存在あるいは非存在下に培養し、24 時間、48 時間および 72 時間後に培養液を回収し 0.22 μm の poresize の filter (Millipore Corp.) で濾過した。回収した培養液と新鮮な培養液を 1 : 1 で混合した溶液中に親株細胞を浮遊させ、 2×10^3 cells/cm² の密度でまいた後に 2 日間培養し、MTT アッセイを用いて、下記のように細胞生存率を算定した。

細胞生存率 (%) = (回収した細胞培養液を加えて培養した時の吸光度 / 新鮮な培養液のみで培養した時の吸光度) $\times 100$

7) HSV-*tk* 遺伝子導入細胞の破碎液の細胞傷害能の検討

2×10^3 cells の親株細胞あるいは HSV-*tk* 遺伝子導入細胞を 200 μl の培養液に浮遊させ、急速凍結溶解を 6 回

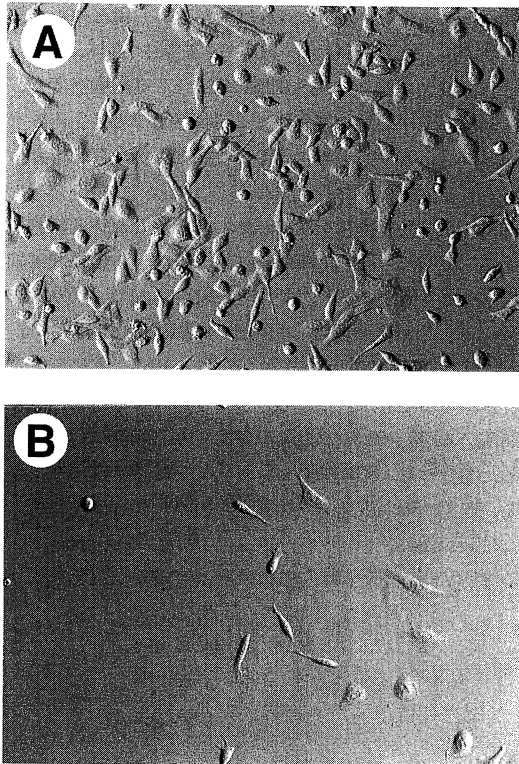


Fig. 2. Microscopic appearance of cultured cells. Mixtures of HSV-*tk*-transduced and untransduced cells were plated at a density of 2×10^4 cells/cm² at which most cells were in contact with one another (A) or at a density of 1×10^3 cells/cm² at which none of the cells were in contact (B). (Original magnification $\times 150$.)

繰り返し細胞を完全に破碎し、24-well 培養皿に 2×10^4 cells/well の濃度でまいた親株細胞の培養液に添加した。10 μ M の GCV 存在下あるいは非存在下でさらに 3 日間培養した後に、前述の MTT アッセイを用いて、下記のように細胞生存率を算定した。

細胞生存率(%) = (細胞破碎液添加時の吸光度 / 細胞破碎液非添加時の吸光度) $\times 100$

8) *in vivo* における bystander effect の検討

HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムにおける bystander effect が *in vivo* でも発現し、腫瘍形成が抑制されるかどうかを検討するために、BNL-*tk* 細胞および親株肝癌細胞を種々の割合で混合した後に、 1×10^7 cells/ml の細胞濃度に調節し、100 μ l を同系の BALB/c マウスの側腹部の皮下に接種した。接種 3 日目より体重当たり 50

mg/kg の GCV を連日 14 日間マウス腹腔内に投与し、腫瘍形成の有無を 90 日間観察した。

さらに、HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムによって誘導される bystander effect の抗腫瘍効果を検討するために、BNL-*tk* 細胞および親株肝癌細胞の混合液を前述のごとく BALB/c マウスの皮下に接種し、腫瘍径が 5 mm に達した時点より GCV (100 mg/kg) の腹腔内投与を連日 7 日間行い、腫瘍発育を 90 日間観察した。

9) HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムによる腫瘍免疫誘導に関する検討

上記実験において、90 日間の観察期間内に腫瘍形成を認めなかったマウスに、 1×10^6 cells の親株肝癌細胞のみを対側側腹部に再接種し、腫瘍形成の有無をさらに 90 日間観察した。

10) HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムを用いた *in vivo* 遺伝子治療による抗腫瘍効果の検討

親株マウス肝癌細胞 (2×10^6 cells/100 μ l) を同系の BALB/c マウス側腹部の皮下に接種し、腫瘍径が 5 mm に達した時点で、8 μ g/ml の濃度で Polybrene を含む 100 μ l の phosphate-buffered saline (PBS) あるいは 100 μ l の HSV-*tk* レトロウイルス液 (1×10^7 CFU/ml) を腫瘍内に直接接種した。2 日後より GCV (50 mg/kg/day) を連日 14 日間腹腔内に投与し、腫瘍容積を経時的に最長 90 日間測定した。なお腫瘍容積は Carlsson¹⁹⁾ の方法に従い、下記のように算定した。

腫瘍容積 (mm³) = [腫瘍長径 (mm) \times 腫瘍短径 (mm)²] \div 2

11) 統計学的解析

標準的な統計解析法である Student's *t*-test, χ^2 test および Wilcoxon test を用いて解析を行い、危険率 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結 果

1) HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞の *in vitro* における GCV に対する感受性

HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞の *in vitro* における細胞増殖能が、親株細胞のそれに比し差異を認めないことは、当教室の Kuriyama¹²⁾ らによってすでに報告されている。BNL-*tk* 細胞を種々の濃度の GCV 存在下に 3 日間培養すると、同細胞は濃度依存性に GCV に感受性を示し、5 μ M の GCV 添加によりすべての細胞が死滅した。GCV に対する感受性を 50% 増殖阻害濃度 (IC₅₀) で評価すると、約 80 nM であった。一方、親株肝癌細胞は GCV に耐性を示し、10 μ M の GCV を添加しても細胞は有意な傷害を被らなかった (Fig. 3A)。

さらに、ラット肝癌細胞についても同様の検討を行ったところ、JTC-*tk* 細胞も濃度依存性に GCV に感受性を示し、10 μ M の GCV 添加により細胞は完全に傷害され、IC₅₀ は約 100 nM であった。一方、親株肝癌細胞は GCV に耐性を示し、10 μ M の GCV を添加しても細胞生存率にまったく影響を認めなかった (Fig. 3B)。

2) *in vitro* における HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムによる bystander effect

そこで、HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞の GCV 存在下における親株肝癌細胞への傷害能、いわゆる bystander effect を *in vitro* において検討した。HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞を種々の割合で親株細胞に混合し、細胞が互いに接触する高細胞密度 (2×10^4 cells/cm²) でまき、親株細胞の増殖にはまったく影響を与えない 10 μ M の GCV 存在下で 3 日間培養したところ、BNL-*tk* 細胞は親株肝癌細胞に著明な傷害を示し、BNL-*tk* 細胞を 20%、40%、60%、80% の割合で混合培養すると、それぞれ約 30

%, 10%, 5%, 3% の親株細胞が生存し得たのみであった (Fig. 4A)。同様に、JTC-*tk* 細胞を 20%、40%、60%、80% の割合で親株細胞に混合し、高細胞密度でまき 10 μ M の GCV の存在下で 3 日間培養すると、それぞれ約 35%、15%、8%、5% の親株細胞が生存し得たのみであった (Fig. 4B)。

次に、同様の検討を細胞が互いに接触しない低細胞密度 (1×10^3 cells/cm²) において行ったところ、親株肝癌細胞はやはり傷害を被り、BNL-*tk* 細胞を 20%、40%、60%、80% の割合で混合した場合の親株細胞の生存率は、それぞれ 95%、70%、60%、55% と BNL-*tk* 細胞の割合に依存して低下した (Fig. 5A)。JTC-*tk* 細胞を同様に 20%、40%、60%、80% の割合で親株細胞に混合培養した場合にも、親株細胞の生存率はそれぞれ約 85%、65%、55%、50% と JTC-*tk* 細胞の割合に依存して低下した (Fig. 5B)。

3) HSV-*tk* 遺伝子導入細胞の培養液の親株細胞に対す

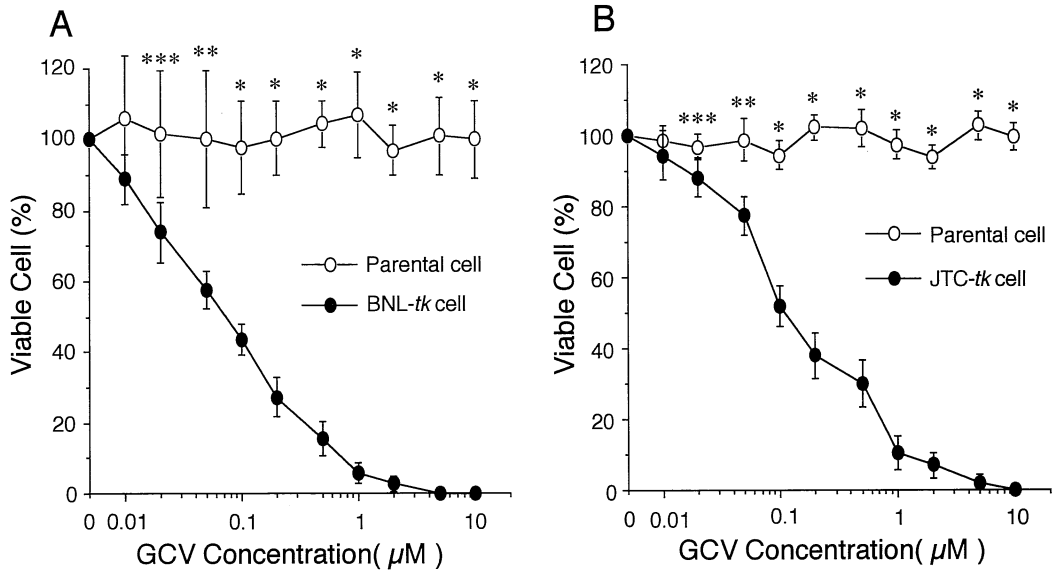


Fig. 3. Sensitivity of HSV-*tk*-transduced HCC cells to GCV.

BNL-*tk* cells (A) and JTC-*tk* cells (B), as well as the corresponding parental cells, were plated with various concentrations of GCV. After a 3-day incubation, cell survival ratio was determined by MTT assay. Each data point represents the mean \pm SD of 4 separate experiments. The symbols "*", "**" and "***" indicate that the survival rate of HSV-*tk*-transduced HCC cells was significantly different compared with that of the corresponding parental HCC cells at $p < 0.001$, $0.001 < p < 0.01$ and $0.01 < p < 0.05$, respectively, by Student's *t*-test.

る傷害能

HSV-*tk* 遺伝子導入細胞と親株細胞を細胞接触のない低細胞密度で培養した場合にも、親株細胞が傷害を被ったことより、HSV-*tk* 遺伝子導入細胞が GCV 存在下で何らかの細胞傷害性物質を産生している可能性が示唆された。そこで、HSV-*tk* 遺伝子導入細胞を親株細胞には傷害を示さない低濃度の GCV 存在下で培養した際の培養液を親株細胞に添加し、細胞傷害能を検討した。GCV 非存在下での BNL-*tk* 細胞の培養液は、親株細胞を傷害しなかったが、10 μ M の GCV 存在下で BNL-*tk* 細胞を 24 時間、48 時間、72 時間培養した際の培養液は親株細胞を傷害し、それぞれ約 25%、35%、30% の親株細胞が死滅した (Fig. 6)。

4) HSV-*tk* 遺伝子導入細胞の破砕液の親株細胞に対する傷害能

次に、HSV-*tk* 遺伝子導入細胞の破砕液が GCV 存在下あるいは非存在下で、親株細胞に傷害を与えるかを検討した。親株細胞の細胞破砕液を GCV 存在下あるいは非存在下で親株細胞に添加しても、親株細胞は有意な傷害を被らなかった。また、BNL-*tk* 細胞の破砕液を同様に GCV 存在下あるいは非存在下で親株細胞に添加培養しても、親株細胞はやはり有意な傷害を被らなかった (Table 1)。

5) *in vivo* における HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムによる bystander effect : 腫瘍形成抑制効果の検討

HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞と GCV による *in vivo*

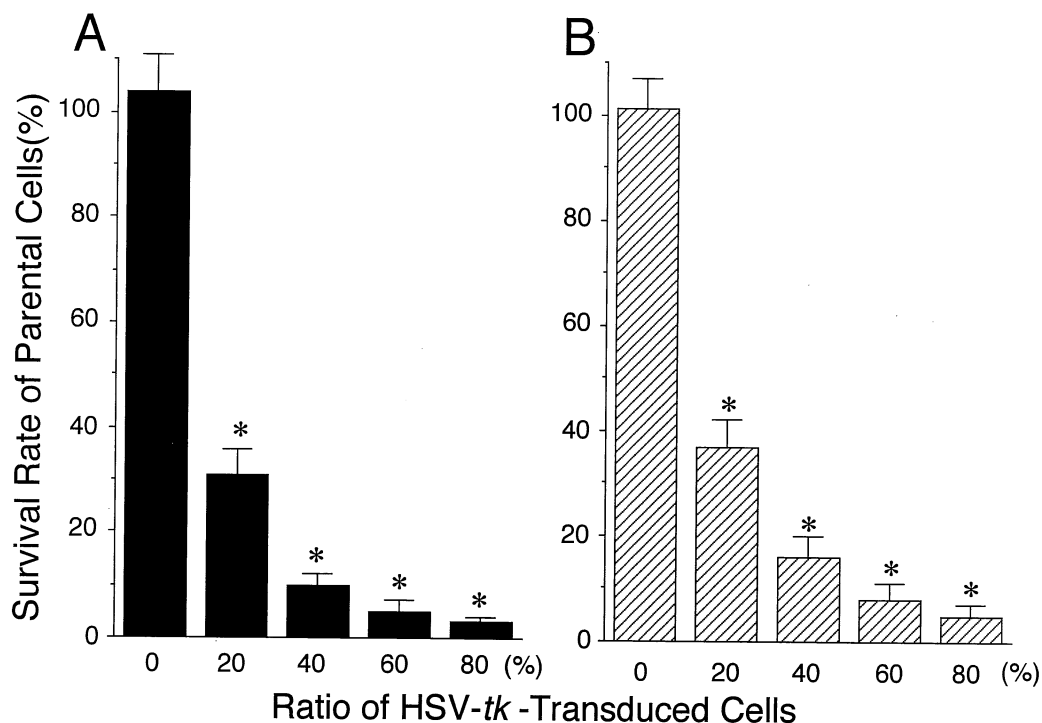


Fig. 4. Bystander effect in a high cell population.

BNL-*tk* cells (A) and JTC-*tk* cells (B) were cocultured with the corresponding parental cells at varying ratios. Mixtures of cells were seeded at a density of 2×10^4 cells/cm² in the presence of 10 μ M GCV. After a 3-day incubation, survival rates of parental HCC cells were estimated. Each bar represents the mean \pm SD of four separate experiments. The symbol "*" indicates that survival rate is significantly different compared with that without HSV-*tk*-transduced cells at $p < 0.001$ by Student's *t*-test.

における bystander effect を検討するために、親株肝癌細胞と BNL-*tk* 細胞を 100 : 0, 75 : 25, 50 : 50, 25 : 75, 0 : 100 で混合した後にマウス皮下に接種し、GCV 投与群と GCV 非投与群における腫瘍形成の有無を 90 日間観察した。Table 2 に示すように、GCV 非投与群では、14 日以内にすべてのマウスに皮下腫瘍の形成を認めた。さらに、親株肝癌細胞のみを接種し GCV 投与を行った場合にも、14 日以内にすべてのマウスにおいて皮下腫瘍の形成を認めた。一方、BNL-*tk* 細胞を 25 %、50 %、75 %、100 % の割合で親株細胞に混合し GCV 投与を行った群では、それぞれ 11 %、0 %、13 %、0 % のマウスにおいて腫瘍形成を認めたのみであり、HSV-*tk* 遺伝子

/GCV システムは、*in vivo* においても強力な bystander effect を誘導し得ることが示された。以上、BNL-*tk* 細胞が 25 % 存在するのみでも、著明な腫瘍形成抑制効果が認められたため、次に BNL-*tk* 細胞の割合をさらに低下させ同様の検討を行った。BNL-*tk* 細胞の親株細胞への混合率を 2 %、5 %、10 %、15 % に低下させ GCV 投与を行ったところ、それぞれ 67 %、38 %、13 %、0 % のマウスに腫瘍形成を認めたのみで、HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞がわずか 5 % 存在するのみで、有意な腫瘍形成抑制効果が得られた (Table 3)。

6) *in vivo* における HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムによる bystander effect : 抗腫瘍効果の検討

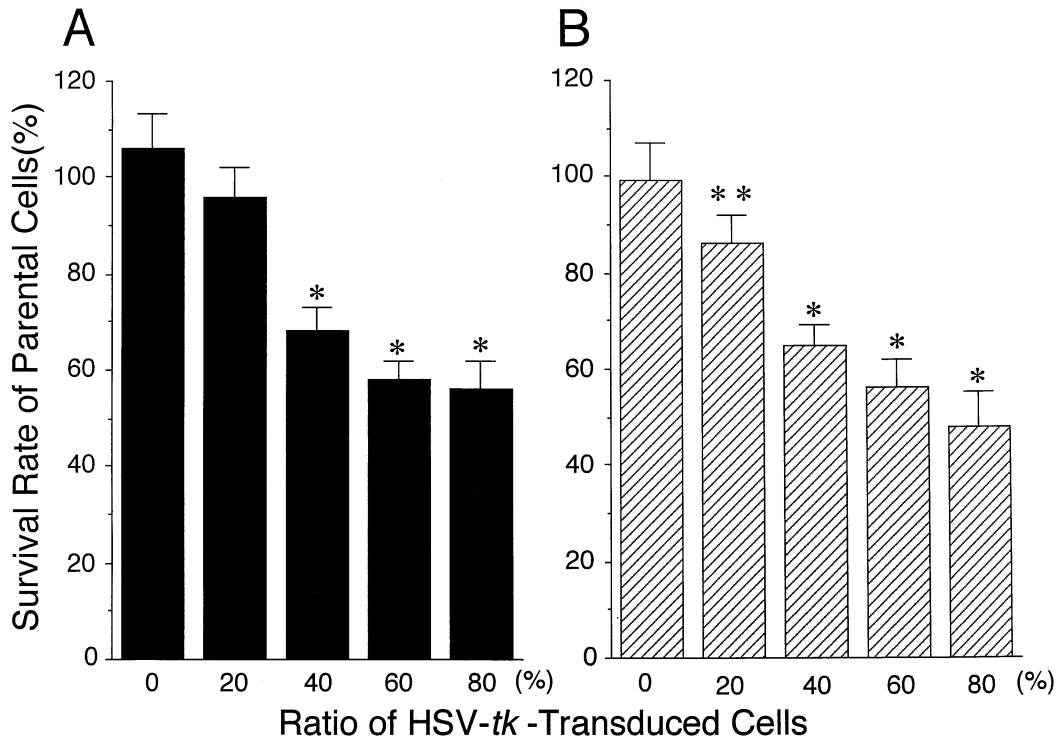


Fig. 5. Bystander effect in a sparse cell population.

BNL-*tk* cells (A) and JTC-*tk* cells (B) were cocultured with the corresponding parental cells at varying ratios. Mixtures of cells were seeded at a density of 1×10^3 cells/cm² in the presence of 10 μ M GCV. After a 3-day incubation, survival rates of parental cells were estimated. Each bar represents the mean \pm SD of four separate experiments. The symbols “*” and “**” indicate that survival rate is significantly different compared with that without HSV-*tk*-transduced cells at $p < 0.001$ and $0.001 < p < 0.05$, respectively by Student's *t*-test.

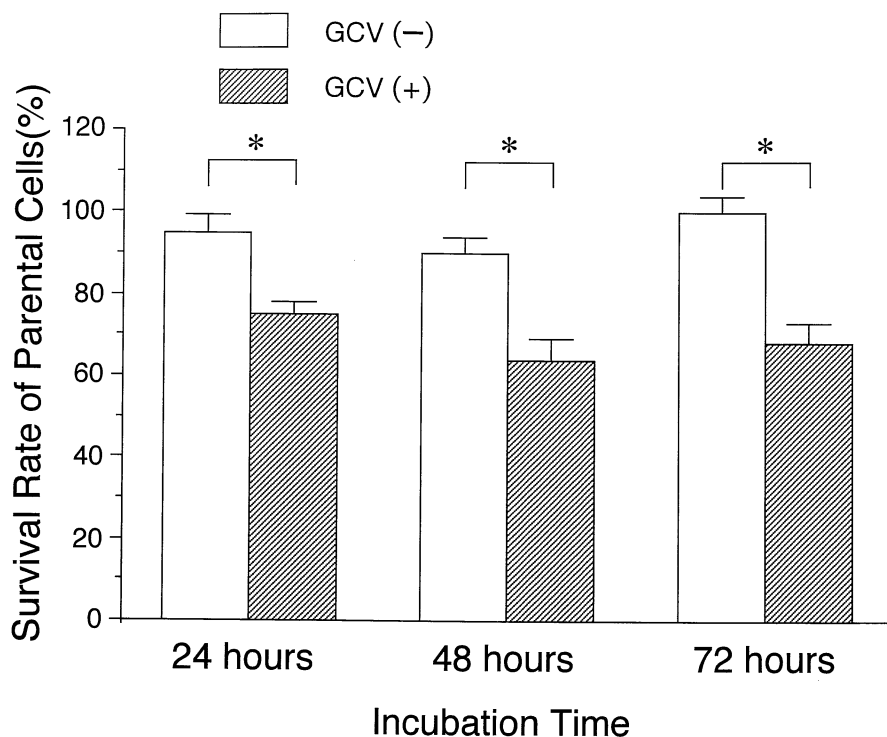


Fig. 6. Cytotoxicity of media conditioned by HSV-*tk*-transduced cells and GCV.

BNL-*tk* cells were cultured with or without 10 μ M GCV. Conditioned media were harvested after 24 hours', 48 hours' and 72 hours' culture, passed through a 0.22- μ m filter, and then added to cultures of parental HCC cells at a 50% concentration. After a 2-day incubation, cytotoxicity of the conditioned media on parental cells was examined. Cytotoxicity was estimated by comparing the number of live cells cultured in conditioned media with that cultured in normal media. The open bars and diagonally striped bars represent cell survival rates by addition of media conditioned without and with GCV, respectively. Values are means \pm SD of four separate experiments. The symbol "*" indicates that the values are significantly different between the groups at $p < 0.001$ by Student's *t*-test.

Table 1. Cytotoxicity of cell lysate

Lysed cells	Survival rates of parental cells (%) ^a	
	GCV (+)	GCV (-)
Parental cells	99 \pm 6	95 \pm 6
BNL- <i>tk</i> cells	94 \pm 9	97 \pm 7

^aResults are expressed as means \pm SD

Table 2. Inhibition of tumor formation by HSV-*tk*/GCV system- I

Parental cells : BNL- <i>tk</i> cells	Tumor incidence (%)	
	GCV (-)	GCV (+)
100 : 0	8/8 (100)	8/8 (100)
75 : 25	8/8 (100)	1/9 (11)*
50 : 50	8/8 (100)	0/9 (0)*
25 : 75	8/8 (100)	1/8 (13)*
0 : 100	8/8 (100)	0/8 (0)*

*Tumor incidence is significantly less compared to the control at $p < 0.01$ using χ^2 test.

Table 3. Inhibition of tumor formation by HSV-*tk*/GCV system-II

Inoculated cells		Tumor incidence (%)	
Parental cells : BNL- <i>tk</i> cells		GCV (-)	GCV (+)
98	: 2	8/8 (100)	6/9 (67)
95	: 5	8/8 (100)	3/8 (38)**
90	: 10	8/8 (100)	1/8 (13)*
85	: 15	8/8 (100)	0/8 (0)*

*, **Tumor incidence is significantly less compared to the control at $p < 0.01$ and $0.01 < p < 0.05$, respectively, using χ^2 test.

Table 4. Antitumor effect by HSV-*tk*/GCV system

Parental cells : BNL- <i>tk</i> cells		Tumor eradication rate (%)
100	: 0	0/10 (0)
95	: 5	4/10 (40)
90	: 10	7/10 (70)*
80	: 20	6/10 (60)*
60	: 40	8/10 (80)*

*Tumor eradication is significantly higher compared to the control at $p < 0.05$ using χ^2 test.

次に、親株肝癌細胞と BNL-*tk* 細胞を 95:5, 90:10, 80:20, 60:40 の割合で混合した後にマウス皮下に接種し、形成された皮下肝癌の大きさが 5 mm に達した時点から GCV 治療を開始したところ、それぞれ 40%, 70%, 60%, 80% のマウスにおいて、腫瘍の完全消失を認め、BNL-*tk* 細胞の割合が 10% 以上で有意に高い腫瘍消失率を認めた (Table 4)。さらにこれらの腫瘍消失を誘導し得たマウスでは、90 日間の観察期間中に腫瘍の再発を認めなかった。

Table 5. Acquisition of tumor immunity

Pretreatment		Tumor incidence (%)	
Parental cells	BNL- <i>tk</i> cells	Parental cells	B lymphoma cells
75	: 25	1/8 (10)	7/7 (100)
50	: 50	0/9 (0)	9/9 (100)
25	: 75	3/7 (43)	4/4 (100)
0	: 100	6/8 (75)	2/2 (100)

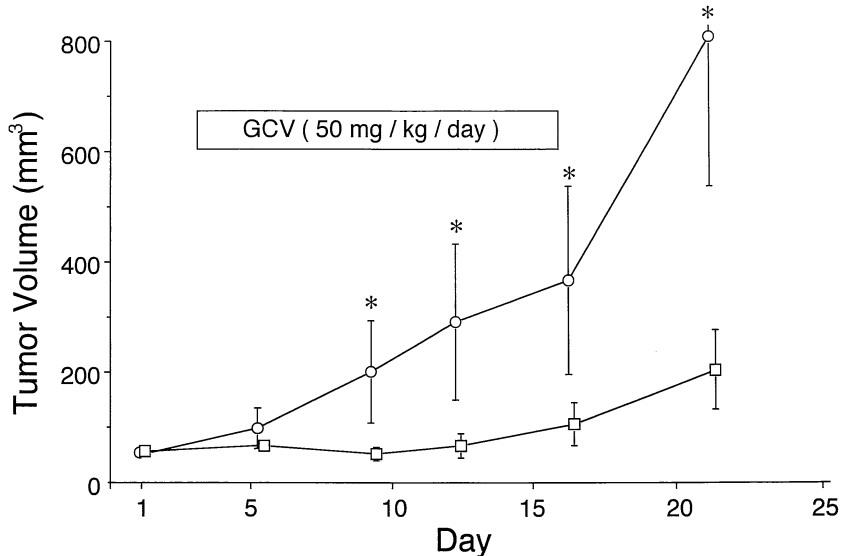


Fig. 7. Antitumor effect on established HCC tumors.

Syngeneic mice were inoculated subcutaneously with 2×10^6 HCC cells suspended in $100 \mu\text{l}$ of PBS. When mice developed established HCC tumors with a diameter of > 5 mm, they were given an intratumoral injection of PBS (○, $n=8$) or 1×10^6 CFU of HSV-*tk*-carrying retroviruses (□, $n=8$). Two days after the injection, animals were administered intraperitoneally with GCV (50 mg/kg/day) daily for 14 consecutive days. Each data point represents the mean \pm SD.

7) HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムによる腫瘍免疫の誘導

HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムを用いた癌に対する遺伝子治療において、腫瘍免疫の誘導がみられるかを検討するために、Table 2 に示した実験において腫瘍形成を認めなかったマウスの対側側腹部に、親株細胞(1×10^6 cells/ $100 \mu\text{l}$)のみを再接種した。BNL-*tk* 細胞を 25%, 50%, 75%, 100% の割合で含む親株肝癌細胞を接種し、GCV 投与により腫瘍形成を阻止されたマウスに親株肝癌細胞を再接種しても、それぞれ 13%, 0%, 43%, 75% のマウスに腫瘍形成を認めたのみで (Table 5), これらのマウスは親株肝癌に対する腫瘍免疫を獲得していることが示された。さらに、この腫瘍免疫は、BNL-*tk* 細胞のみを接種していたマウスよりも、BNL-*tk* 細胞と親株肝癌細胞を混合接種したマウスに、より強力に誘導される傾向が認められた。

次に、親株肝癌に対する腫瘍免疫を獲得したこれらのマウスに、同系マウス由来の B リンパ腫細胞(1×10^6 cells/ $100 \mu\text{l}$)を皮下接種したところ、すべてのマウスに腫瘍形成を認め、この腫瘍免疫は親株肝癌に特異的であることが示された。

8) *in vivo* 遺伝子導入法による抗腫瘍効果の検討

次に、HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムによる肝癌に対する *in vivo* 遺伝子治療の可能性を検討するために、親株肝癌細胞のみによって形成された皮下肝癌が、5 mm に達した時点で *in vivo* 遺伝子治療を開始した。Fig. 7 に示すように、GCV の腹腔内投与のみを行ったコントロール群では、すべてのマウスにおいて腫瘍は縮小することなく急速に増大した。一方、HSV-*tk* レトロウイルスを直接腫瘍内に接種し、GCV 投与を行うと、腫瘍の発育は有意に抑制され、10 匹中 4 匹のマウスにおいて腫瘍の一時的な縮小を認めた。さらに、GCV 投与期間中には腫瘍は有意な発育を示さなかったが、投与終了後に腫瘍は徐々に増大した。Fig. 8 に示すように、コントロール群では GCV 投与開始後 35 日以内にすべてのマウスが死亡したが、HSV-*tk* レトロウイルスを接種した群では、GCV 投与開始から 45 日を経過しても、50% のマウスが生存しており、HSV-*tk* 遺伝子を用いた *in vivo* 遺伝子治療によりマウスの生存率は有意に延長した。

考 察

HSV-*tk* 遺伝子発現と GCV 投与による細胞傷害の機序を Fig. 9 に示した。HSV-*tk* 遺伝子を発現している細胞へ GCV を投与すると、GCV は HSV-*tk* 酵素により

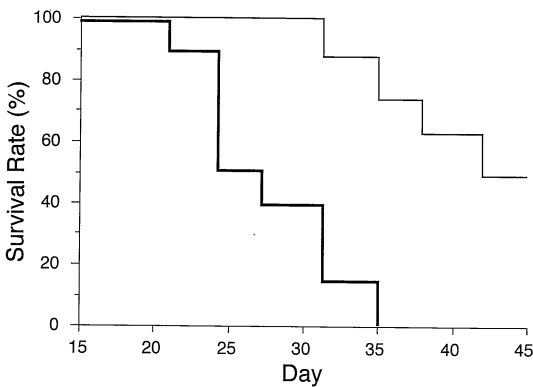


Fig. 8. Survival rate of mice. On day 1, mice bearing established subcutaneous HCC tumors with a diameter of >5 mm were given an intratumoral injection of PBS (bold line, n=8) or 1×10^6 CFU of HSV-*tk*-carrying retroviruses (thin line, n=8). From day 3 to day 16, animals were administered intraperitoneally with GCV (50 mg/kg/day). Survival rates were significantly different between the groups at $p < 0.001$ by Wilcoxon test.

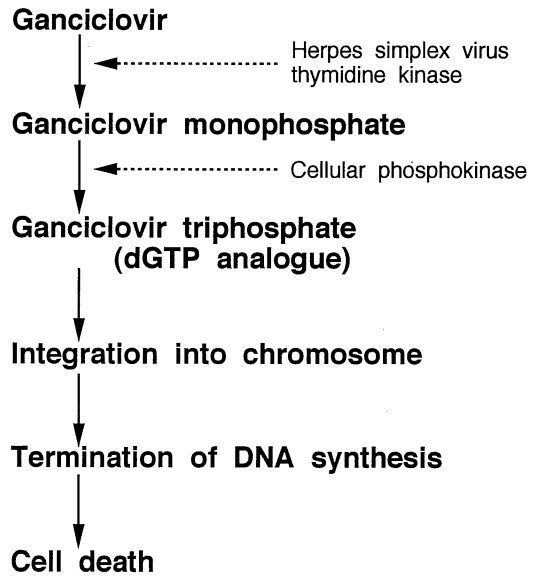


Fig. 9. Mechanism of cytotoxicity induced by HSV-*tk* gene expression and GCV treatment.

一リン酸化合物へ変換される。GCV 一リン酸化合物は、さらに細胞由来のリン酸化酵素により三リン酸化合物へ代謝される。GCV 三リン酸化合物は、デオキシ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、哺乳動物細胞のチミジンキナーゼは GCV を基質としないため、GCV はリン酸化されず細胞は傷害を被らない。GCV はサイトメガロウイルス感染症、単純ヘルペスウイルス感染症さらに帯状疱疹ウイルス感染症に対する抗ウイルス剤として、広く臨床に使用されている薬剤であり人体に対する安全性に関しては十分な検討がなされている。

今回の肝癌細胞を用いた検討において、HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞である BNL-*tk* 細胞および JTC-*tk* 細胞は共に、GCV に濃度依存性に感受性を示したが、それぞれの親株肝癌細胞は GCV に耐性を示した。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²⁰⁾ されているが、本研究において、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るが、親株肝癌細胞には全く影響を与えないことが示された。

ところで、HSV-*tk* 遺伝子と GCV を用いた遺伝子治療では、HSV-*tk* 遺伝子発現細胞の近傍に存在する遺伝子非発現細胞も傷害を被る、いわゆる bystander effect と呼ばれる現象が惹起されることが報告されている⁶⁻⁸⁾。Bystander effect によって癌部に接する正常組織に対する傷害が誘導される可能性も否定できないが、どのような遺伝子導入法を用いても、標的とするすべての癌細胞への遺伝子導入が技術的に不可能である現状において、強力な bystander effect の存在が、癌に対する有効な遺伝子治療を行うために不可欠と考えられる。HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムによる bystander effect の詳細な機序に関しては未だ不明であるが、HSV-*tk* 遺伝子発現細胞と非発現細胞の接触が bystander effect の誘導には必要であり、細胞接触によって形成される gap junction を通じて細胞傷害性物質が、HSV-*tk* 遺伝子発現細胞から非発現細胞に伝達される機序が想定されている。

gap junction は細胞間の情報伝達機構として重要な役割を演じており、種々の電解質や分子量 1,000 dalton あるいは直径 1.5 nm 以下の分子は、gap junction を介して細胞間を自由に移動できる。GCV は細胞膜を通過し細胞内に入ることができるが、GCV のリン酸化合物は細胞膜を通過し得ないことが報告されている²¹⁾。一方、リン酸化された GCV の分子量は 350~540 dalton であり、gap

junction を通じて隣接細胞へ移動することは可能と考えられる。

Bi²²⁾ らはヒト線維肉腫細胞を用いて、HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムにおける bystander effect のメカニズムを検討しており、HSV-*tk* 遺伝子導入細胞と親株細胞を 1:1 に混合し高細胞密度で培養した場合には、約 80% の親株細胞が死滅したが、低細胞密度で培養した場合には bystander effect は誘導されず、HSV-*tk* 遺伝子導入細胞と非導入細胞の物理的な接触が bystander effect の誘導にとって必須であると報告している。さらに Bi²²⁾ らは、³H ラベルした GCV を用いて、GCV の代謝物は細胞が互いに接触している時のみ細胞間を移動し得ることを報告している。

本研究において著者は、HSV-*tk* 遺伝子発現細胞の破砕液と GCV を同時に親株細胞に添加しても、親株細胞は傷害されないことを示した。このことは、HSV-*tk* 遺伝子発現細胞の破砕液に含まれる HSV-*tk* 酵素、さらに同酵素によってリン酸化された GCV 一リン酸は、親株細胞の細胞膜を通過し得ないために、親株細胞が傷害されなかったことを示唆している。これらの結果を総括すると、HSV-*tk* 遺伝子発現細胞内に侵入した GCV が、HSV-*tk* 酵素によってリン酸化され、GCV リン酸化合物が gap junction を介して隣接細胞に侵入することによって、HSV-*tk* 遺伝子と GCV システムによる bystander effect が誘導されると推測される。

一方、著者は本研究において、細胞接触を認めない低細胞密度で培養した場合にも、弱いながら bystander effect が誘導されることを示した。しかし、低細胞密度においても、HSV-*tk* 遺伝子導入細胞と親株細胞の接触が全く存在しないとは言えない。そこで著者は、HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞を親株細胞の増殖には影響を与えない低濃度の GCV 存在下に培養した培養液が、親株細胞を傷害し得ることも示した。これらの結果は、GCV 存在下において HSV-*tk* 遺伝子導入細胞は、細胞膜を通過し得る何らかの細胞傷害能を有する物質を産生していることを示唆している。前述したように、HSV-*tk* 遺伝子発現細胞が GCV によって死滅した後に、HSV-*tk* 酵素が親株細胞内に入るとは考え難く、GCV リン酸化合物は細胞膜を通過しないことも前述した。しかし Prisbe²¹⁾ らは、GCV リン酸化合物のなかで GCV 環状リン酸のみが細胞膜を通過できる事を報告している。したがって、低細胞密度における HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムの bystander effect の機序として、HSV-*tk* 遺伝子導入細胞内で産生された GCV 一リン酸が、グアノシン一リン酸をグアノシン環状リン酸に変換する酵素によって GCV

環状リン酸に変換され、この GCV 環状リン酸が細胞死に際し、培養液中に放出されることが考えられる。ところで、HSV-*tk* 遺伝子と GCV によって誘導される細胞傷害は、apoptotic death であるとの報告が最近なされている²³⁾。したがって、HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムの細胞接触の無い状態での bystander effect の機序として、HSV-*tk* 遺伝子導入細胞が GCV によって死滅する際に apoptotic vesicle を放出し、この apoptotic vesicle が endocytosis によって HSV-*tk* 遺伝子非導入細胞に取り込まれ、細胞死が誘導される可能性も推測される。

さらに著者は本研究において、HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムは、*in vivo* においても肝癌細胞に強力な bystander effect を誘導し得ることを報告した。すなわち、BNL-*tk* 細胞を 50% の割合で親株細胞に混合した後に皮下接種し、GCV を腹腔内投与すると腫瘍形成は完全に抑制された。さらに BNL-*tk* 細胞が 25% 含まれる場合には 9 匹中 1 匹、10% では 8 匹中 1 匹、5% では 8 匹中 3 匹に腫瘍形成を認めるのみであり、わずか 2% BNL-*tk* 細胞が含まれる場合でも腫瘍形成は 9 匹中 6 匹にとどまった。ところで著者は、本研究に使用したマウス肝癌細胞は、わずか 5×10^4 cells の細胞を同系マウスに接種しても、100% のマウスに腫瘍が形成されることを確認している。したがって、接種細胞 (1×10^6 cells) の 5% が生存すればすべてのマウスに腫瘍が形成されるはずである。HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムは、*in vitro* の高細胞密度条件下で、強力な bystander effect を示したが、HSV-*tk* 遺伝子導入細胞が 40% 存在しても約 10% の親株細胞は生存し得た。これらの成績は、HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムによる bystander effect が、*in vitro* におけるよりも *in vivo* において遥かに強力に誘導されることを示唆している。したがって、*in vivo* における bystander effect には、*in vitro* の実験系において示唆された GCV リン酸化物の gap junction を介した隣接細胞への移動と細胞膜通過可能な細胞傷害性物質の産生以外に、さらに付加的な機序が関与していることが示唆された。

Barba²⁴⁾ らおよび Vile²⁵⁾ らは、HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムによる *in vivo* における腫瘍発育の抑制作用には、T 細胞由来の腫瘍免疫が関与していることを報告している。さらに Vile²⁵⁾ らは、HSV-*tk* 遺伝子を導入したメラノーマ細胞を同系マウスに接種し GCV 投与を行うと、腫瘍形成が阻止されるのみならず、親株メラノーマ細胞に対する腫瘍免疫が誘導されることを報告している。本研究においても、HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞を接種し GCV 投与を行ったマウスでは、その後の親株肝癌細胞

の再接種による腫瘍形成が阻止されたが、その腫瘍免疫効果は親株肝癌に特異的であった。これらの成績は、HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムが、*in vivo* において宿主の腫瘍免疫能を増強し得る可能性を示唆している。

HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムによる宿主の腫瘍免疫活性化機序の詳細は不明であるが、以下のような推論がなされる。まず第一に、suicide 遺伝子発現癌細胞がプロドラッグ投与により短期間に死滅する際に、癌細胞由来の抗原が多量に血中に放出され、宿主に効果的な抗原提示を行った可能性が考えられる。すなわち、死滅癌細胞に対する炎症反応が抗原提示細胞を活性化し、親株癌細胞に対する強力な腫瘍免疫を誘導し得たことが推測される。第二の可能性として、suicide 遺伝子によって発現される異種蛋白質に対する免疫応答が、癌細胞に対する腫瘍免疫を誘導したという推論も成り立つ。すなわち、suicide 遺伝子発現により癌細胞内で産生された異種蛋白質に対する免疫応答では、suicide 遺伝子が発現しない癌細胞は直接的には攻撃されないが、異種蛋白質が一種の superantigen として作用し、polyclonal に活性化されたリンパ球の一部が、癌細胞由来の抗原に交叉反応した可能性も考えられる。本研究では、HSV-*tk* 遺伝子発現によって産生された HSV-*tk* 酵素に対する免疫反応が誘導されたか否かに関する検討は行っていないが、HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞と親株肝癌細胞を混合接種したマウスにおいて、HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞のみを接種したマウスに優る強力な親株肝癌細胞に対する腫瘍免疫が誘導されたことは興味深い。このことは、suicide 遺伝子が発現する癌細胞が宿主の免疫反応によって傷害される際に、親株細胞が同時に存在する方が、親株腫瘍に対するより強い免疫反応が惹起される可能性を示している。

本研究において示されたこれらの結果は、すべての癌細胞に HSV-*tk* 遺伝子が導入されなくても、有効な抗腫瘍効果を得ることができるという報告⁹⁾ を支持するとともに、HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムを用いることにより、腫瘍に対する有効な免疫反応を誘導し得ることを示唆している。以上の結果より、一部の肝癌細胞に HSV-*tk* 遺伝子を導入できれば、有効な抗腫瘍効果が得られると考え、*in vivo* 遺伝子導入法を用いた遺伝子治療の可能性を検討した。

現在一般的に試みられている遺伝子治療プロトコールは、体内より遺伝子導入を行うための標的細胞を採取し、*in vitro* において遺伝子導入を行った後に、再び体内に戻す *ex vivo* 遺伝子治療と呼ばれる方法である。この方法では、標的細胞の採取に外科的手技を要するため、臨

床応用が容易とは言い難い。特に進行癌患者では、標的細胞採取のための手術が困難なことが多く、*ex vivo* 遺伝子治療は実用的ではない。したがって、*in vivo* 遺伝子導入法が確立されれば、臨床的な癌に対する遺伝子治療がより容易になり、研究は新局面を迎えると考えられる。この際重要なことは、標的とする癌細胞にいかにして選択的に遺伝子発現を誘導するかである。特に、suicide 遺伝子を用いた遺伝子治療においては、癌細胞選択的な遺伝子発現を誘導することが不可欠である。

当教室では、*in vivo* 遺伝子導入法を用いた肝癌に対する遺伝子治療の確立を目指して基礎的研究を重ねている。すなわち、アルブミン遺伝子のプロモーターを内因性プロモーターとするレトロウイルスベクターを用いて、レポーター遺伝子である大腸菌の β -galactosidase 遺伝子を *in vivo* において導入すれば、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報告している^{4,26)}。さらに、アルブミン遺伝子の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レトロウイルスベクターを用いて、遺伝子導入を行い GCV を投与すれば、線維芽細胞や乳癌細胞などの非肝癌細胞を傷害することなく、肝癌細胞のみを選択的に傷害し得ることも報告している^{5,27)}。そこで今回著者は、アルブミン遺伝子のプロモーターの制御下に HSV-*tk* 遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターを用いて、*in vivo* 遺伝子治療による肝癌に対する抗腫瘍効果を検討した。

同系マウスに接種した親株肝癌の腫瘍径が 5 mm に達した時点で、HSV-*tk* レトロウイルスを腫瘍内に接種し GCV 治療を行ったところ、腫瘍発育の著明な抑制と生存率の有意な延長を認め、明確な抗腫瘍効果を観察することができた。今回の検討では腫瘍の消失を誘導することはできなかったが、こうした *in vivo* 遺伝子治療を繰り返し施行すれば、より有効な治療効果を誘導し得ると考えられる。

近年、本邦においては、肝癌による死亡者数が著増している。肝癌患者の大多数は、基礎疾患として重篤な肝硬変を有しているため、外科的治療の対象となる例は一部に過ぎず、多くの症例に経カテーテルの肝動脈塞栓療法や経皮的エタノール注入療法、経皮的マイクロ波凝固療法などが行われている。これらはある程度の有効性を示すものではあるが、腫瘍免疫の誘導は期待できず、多中心性発癌、早期再発など克服すべき問題は多い。より有効な治療法の開発が切望されている現在、遺伝子治療は腫瘍免疫の誘導という観点からも注目される治療法と言える。

以上、臨床応用をめざしたさらなる基礎的検討が必要であるが、HSV-*tk* 遺伝子導入と GCV 治療は、強力な bystander effect と宿主の腫瘍免疫を誘導し得ることより、臨床応用可能な肝癌に対する *in vivo* 遺伝子治療法となり得る可能性が示唆された。

結 語

肝癌に対する *in vivo* 遺伝子治療の可能性を検討するために、レトロウイルスベクターを用いた HSV-*tk* 遺伝子導入と GCV 投与による *in vitro* における細胞傷害能、さらに *in vivo* における抗腫瘍効果を検討し、以下のとき結果を得た。

1. HSV-*tk* 遺伝子導入肝癌細胞は、細胞が互いに接触する高細胞密度において、GCV 存在下で近傍の親株肝癌細胞を強力に傷害した。さらにこの bystander effect は、細胞が全く接触しない低細胞密度においても観察し得た。
2. HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムは、肝癌モデルマウスにおいて、*in vitro* よりも遙かに強力な bystander effect を誘導することによって、著明な抗腫瘍効果を示した。さらに HSV-*tk* 遺伝子/GCV システムは、親株肝癌に対する腫瘍免疫を誘導し得ることが示された。
3. HSV-*tk* 遺伝子導入と GCV 投与による治療法は、*in vivo* 遺伝子治療においても有効な抗腫瘍効果を示したことより、臨床応用可能な肝癌に対する治療法となり得る可能性が示唆された。

(本論文の要旨は、第 10 回アジア太平洋消化器病学会、第 33 回日本肝臓学会総会、第 56 回日本癌学会総会において発表した。

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師辻井 正奈良県立医科大学名誉教授ならびに福井 博教授に深甚の謝意を捧げるとともに、御校閲、御助言を賜りました病態検査教室中野 博教授ならびに腫瘍病理学教室小西陽一教授に深謝いたします。さらに、本研究の遂行にあたり常に御指導、御助力をいただきました栗山茂樹博士に感謝いたします。また終始、御協力いただきました第 3 内科教室の諸兄に感謝の意を表します。)

なお、本研究は文部省科学研究費基盤研究(B)(課題番号 07457141)の援助を受けた。

文 献

- 1) Ross, G., Erickson, R., Knorr, D., Motulsky, A. G., Parkman, R., Samulski, J., Straus, S. E. and

- Smith, B. R. : Gene therapy in the United States: a five-year status report. *Hum. Gene Ther.* **7**: 1781-1790, 1996.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Kuriyama, S., Yoshikawa, M., Ishizaka, S., Tsujii, T., Ikenaka, K., Kagawa, T., Morita, N. and Mikoshiba, K. : A potential approach for gene therapy targeting hepatoma using a liver-specific promoter on a retroviral vector. *Cell Struct. Funct.* **16**: 503-510, 1991.
- 5) Kuriyama, S., Nakatani, T., Sakamoto, T., Masui, K., Tominaga, K., Yoshikawa, M., Fukui, H. and Tsujii, T. : Retrovirus-mediated gene therapy toward hepatoma using a liver-specific promoter (Abstract). *Hepatology* **19**: 88I, 1994.
- 6) Kuriyama, S., Nakatani, T., Masui, K., Sakamoto, T., Tominaga, K., Yoshikawa, M., Fukui, H., Ikenaka, K. and Tsujii, T. : Evaluation of prodrugs ability to induce effective ablation of cells transduced with viral thymidine kinase gene. *Anticancer Res.* **16**: 2623-2628, 1996.
- 7) Moolten, F. L. : Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res.* **46**: 5276-5281, 1986.
- 8) Culver, K. W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E. H. and Blaese, R. M. : *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* **256**: 1550-1552, 1992.
- 9) Kuriyama, S., Masui, K., Sakamoto, T., Nakatani, T., Tominaga, K., Fukui, H., Ikenaka, K., Mullen, C. A. and Tsujii, T. : Bacterial cytosine deaminase suicide gene transduction renders hepatocellular carcinoma sensitive to the prodrug 5-fluorocytosine. *Int. Hepatol. Commun.* **4**: 72-79, 1995.
- 10) Kuriyama, S., Masui, K., Sakamoto, T., Nakatani, T., Kikukawa, M., Tsujinoue, H., Mitoro, A., Yamazaki, M., Yoshiji, H., Fukui, H., Ikenaka, K., Mullen, C. A. and Tsujii, T. : Bystander effect caused by cytosine deaminase gene and 5-fluorocytosine *in vitro* is substantially mediated by generated 5-fluorouracil. *Anticancer Res.* in press.
- 11) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. : *Molecular cloning. A laboratory manual.* 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- 12) Kuriyama, S., Yoshikawa, M., Tominaga, K., Nakatani, T., Sakamoto, T., Fukui, H., Ikenaka, K. and Tsujii, T. : Gene therapy for the treatment of hepatoma by retroviral-mediated gene transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase. *Int. Hepatol. Commun.* **1**: 253-259, 1993.
- 13) Mann, R., Mulligan, R. C. and Baltimore, D. : Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* **33**: 153-159, 1983.
- 14) Miller, A. D. and Rosman, G. J. : Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Bio Techniques* **7**: 980-990, 1989.
- 15) Jainchill, J. L., Aaronson, S. A. and Todaro, G. J. : Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J. Virol.* **4**: 549-553, 1969.
- 16) Patek, P. Q., Collins, J. L. and Cohn, M. : Transformed cell line susceptible or resistant to *in vivo* surveillance against tumorigenesis. *Nature* **276**: 510-511, 1978.
- 17) Katsuta, H., Takaoka, T. and Yasumoto, S. : Toxic metabolites released from rat hepatoma cells in culture. I. effects of metabolites of hepatomas on various cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**: 1841-1844, 1973.
- 18) Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. : Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**: 936-942, 1987.
- 19) Carlsson, G., Gullberg, B. and Hafström, L. : Estimation of liver tumor volume using different formulas-An experimental study in rats. *J. Cancer Res. clin. Oncol.* **105**: 20-23, 1983.

- 20) **Sommadossi, J-P., Bevan, R., Ling, T., Lee, F., Mastre, B., Chaplin, M. D., Nerenberg, C., Koretz, S. and Buhles, W. C.** : Clinical pharmacokinetics of ganciclovir in patients with normal and impaired renal function. *Rev. Infect. Dis.* **10** (Suppl 3) : S507-514, 1988.
- 21) **Prisbe, E. J., Martin, J. C., McGee, D. P. C., Barker, M. F., Smee, D. F., Duke, A. E., Matthews, T. R. and Verheyden, J. P. H.** : Synthesis and antiherpes virus activity of phosphate and phosphonate derivatives of 9-[(1, 3-dihydroxy-2-proxoy) methyl] guanine. *J. Med. Chem.* **29** : 671-675, 1986.
- 22) **Bi, W. L., Parysek, L. M., Warnick, R. and Stambrook, P. J.** : *In vitro* evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV-*tk* retroviral gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **4** : 725-731, 1993.
- 23) **Freeman, S. M., Abbound, C. N., Whartenby, K. A., Packman, C. H., Koeplin, D. S., Moolten, F. L. and Abraham, G. N.** : The "bystander effect" : tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res.* **53** : 5274-5283, 1993.
- 24) **Barba, D., Hardin, J., Sadelain, M. and Gage, F. H.** : Development of anti-tumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 4348-4352, 1994.
- 25) **Vile, R. G., Nelson, J. A., Castleden, S., Chong, H. and Hart, I. R.** : Systemic gene therapy of murine melanoma using tissue specific expression of the HSV-*tk* gene involves an immune component. *Cancer Res.* **54** : 6228-6234, 1994.
- 26) **中谷敏也** : アルブミン遺伝子エンハンサーおよびプロモーターを制御因子とする組換えレトロウイルスを用いた肝癌に対する遺伝子治療の基礎的研究. *奈良医学雑誌* **45** : 181-191, 1994.
- 27) **阪本たけみ** : 単純ヘルペ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. *奈良医学雑誌* **46** : 397-410, 1995.