

論文の内容の要旨

論文題目 原発性肝癌に特異的な遺伝子導入法の開発に関する研究

指導教官 上西紀夫教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 瀧川拓人

<背景>

肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma : HCC) に対しては現在外科的切除の他、経皮経肝エタノール注入療法、肝動脈塞栓療法・肝動注化学療法、マイクロ波凝固療法、ラジオ波熱焼灼療法、冷凍凝固療法等が病状に応じあるいは医師の得意に応じ選択されるが、依然として予後不良な癌の一つである。肝切除術が安全に施行される今日、手術による治療成績は向上しており外科的切除の適応とされる HCC 症例において他の治療法が手術療法に優るという証左は無い。

しかしながら HCC の背景には慢性肝炎・肝硬変が存在するため残肝機能等の問題から手術適応から外れることも多く、また診断の時点で外科切除以外の各種治療の適応から外れるほど進行している場合も少なくない。治療予後不良あるいは治療困難症例が多い HCC は次世代の治療法として期待される遺伝子治療の対象疾患であると考えられる。

HCC の約80%で高レベルの AFP が産生されており、AFP は HCC に特異的な腫瘍マーカーとして一般に認められている。これを利用して AFP プロモーターを用いて遺伝子の転写を行う方法は、その遺伝子発現の高い特異性において優れているが、十分な量の蛋白発現が得られず、遺伝子治療実験にも困難が伴い、臨床応用までには結びつかないのが現状である。

アデノウィルスベクターを用いて、Cre/loxP 制御システムを応用した二重感染法による発現の増強は各種遺伝子を選択的に導入できる応用性に優れた方法であるが、その遺伝子発現量は CAG プロモーター等汎用性の高いプロモーターにはまだ及ばない。一方で特異的プロモーター

下に転写活性因子を導入発現させることによってプロモーター強度を上昇させる方法が報告されている。

本稿では上記2種の系を組み合わせ、HCCに対する高い特異性を保持しつつ導入遺伝子の発現量を増強させることを目的として行われた実験内容およびその成果について報告する。

<材料と方法>

1.使用細胞株：ヒト肝細胞癌に由来する2種の細胞株であるAFPを産生する細胞株HuH7とAFP非産生細胞株であるHLFとにおける*lacZ*遺伝子の導入及びその遺伝子産物であるβ-ガラクトシダーゼの発現について検討した。

2.プラスミド・コスミド・アデノウィルスベクターの構築：AFPプロモーター [(AB)1S6]と単純ヘルペスウイルス由来の転写活性領域であるVP16とDNA結合領域であるLexAとを繋いだキメラ転写活性因子VP16LexAを結合したプラスミドpAF1VP16LexAを構築した。また、7回反復するLexAの結合部にAFPプロモーターとCre遺伝子を繋げたプラスミドpSKII+7L-AF1NCreを構築した。

これらプラスミドを後にCOS-TPC法にてアデノウィルスベクターに組み入れる必要上、コスミドpAxCW46に結合し、各々pAxAF1VP16LexA、pAx7L-AF1NCreと呼称した。

上記2種のコスミドを用いCOS-TPC法に従い2つの組み換えアデノウィルスベクターAxAF1VP16LexA、Ax7L-AF1NCreを作製した。

この他に以下の3種のアデノウィルスベクターを用いている。

AxCALNL*lacZ*はβ-ガラクトシダーゼを発現するアデノウィルスベクターで、Cre recombinaseの存在下で強力な汎用のCAGプロモーターが*lacZ*遺伝子と直接結合して作用する。AxCAZはCAGプロモーターと*lacZ*遺伝子とが結合したアデノウィルスベクターである。AxAFPZはAFPプロモーターと*lacZ*遺伝子とが結合したアデノウィルスベクターである。

3.対象細胞株における遺伝子の発現と細胞毒性の測定：HuH7とHLFの各細胞株につき、AxCAZまたはAxAFPZをmultiplicity of infection (MOI) 0.1から300の範囲で感染させた。HuH7についてはAxCALNL*lacZ* (MOI10)とAx7L-AF1Ncre (MOI0.1-300)の共感染も施行した。感染48時間後に細胞は0.1% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal)を用いて染色され、β-ガラクトシダーゼが発現し青染された細胞数の割合を鏡視下で計測し、これと同時に

プレートに接着している細胞を生細胞としてこの数を測定した。

4. 遺伝子導入プロトコルとその発現効率の評価： HuH7 と HLF の各細胞株につき AxAF1VP16LexA を MOI 60 または 100 で感染させた群と非感染群の計 3 群を設定した。その 24 時間後に AxCALNLlacZ と Ax7L-AF1NCre とを同時に感染させた。AxCALNLlacZ は各群共通に MOI30 で感染させた。Ax7L-AF1NCre の感染量は AxAF1VP16LexA 先行感染群では MOI 100、AxAF1VP16LexA 非感染群では MOI 100, 160, 200 とした。さらにその 48 時間後に β -ガラクトシダーゼの発現に関し、X-gal 染色にて定性評価を、Luminescent beta-gal Genetic Reporter System II (CLONTECH, Palo Alto, CA, U.S.A.) を用いてルミノメトリーにて定量評価を行った。

〈結果〉

HuH7、HLF とも AxCAZ を MOI 10 で感染させると 80%以上の細胞が染色される。HuH7 に対し AxAFPZ を MOI 300 で感染させると 3分の1の細胞が染色される。HLF に対し AxAFPZ を感染させても細胞は染色されない。一方で HuH7、HLF に対し治療遺伝子の組込まれていないアデノウィルスベクターを MOI 30 で感染させるとその細胞の半数が活性を失っている。

AxCALNLZ と Ax7L-AF1NCre とを用いての二重感染法では MOI 1~30 の範囲において AxAFPZ 単独感染に優っている。しかしながら、MOI 30 においても半数以上の細胞が染色されていない。

転写活性因子共感染法を用いた場合に関しては、lacZ 遺伝子の発現は X-gal 染色の他にルミノメトリーによる定量評価を行った。HuH7 に対し Ax7L-AF1NCre を MOI 100 で感染させた群（総 MOI 130）、Ax7L-AF1NCre を MOI 160 で感染させた群（総 MOI 190）と比較し、AxAF1VP16LexA (MOI 60) と Ax7L-AF1NCre (MOI 100) を共感染させた群（総 MOI 190）では X-gal 染色により、より強く染色されている。一方で HLF においてはいずれの群でもほとんど染色されなかった。定量評価では、AxAF1VP16LexA を感染させ転写活性因子を導入した群では非感染群に比べ β -ガラクトシダーゼ発現量が 3 倍に上昇した。細胞特異性は各感染群における HuH7 と HLF との間の比較で評価されるが、AxAF1VP16LexA 感染群において 57~330 倍と AFP 産生細胞である HuH7 特異的に β -ガラクトシダーゼが発現しており、これは非感染群における 84~520 倍に遜色が無かった。また、AxAF1VP16LexA を MOI 60 で感染させた群と MOI 100 で感染させた群との間に有意な差は認められなかった。

〈考察〉

AFP プロモーターの AFP 産生細胞に対する特異性に関しては満足いくものであった。しかし一方で AFP プロモーターの効果は CAG 等汎用強力なプロモーターを用いた場合に比べ十分なものではなかった。その上 *in vitro* 実験において治療遺伝子を組み込んでいないアデノウイルスベクターを MOI 30 で感染させると、細胞増殖がおおよそ半分に抑制される。これはベクター自体に因る細胞毒性のためであるが、これにより腫瘍選択性が損なわれるという dilemma が存在し、*in vitro* および *in vivo* での遺伝子治療実験が困難なものとなっている。

この問題を克服する手段として以下の2つの可能性があると考えられる。すなわち、1.細胞毒性の殆ど無いベクターの開発、2.ベクター投与量を減らす目的における AFP プロモーターの強度増強法の開発、であるが、今回は後者のモデルを構築することができた。

ルミノメトリーによるβ-ガラクトシダーゼの定量では転写活性因子を導入した群においては、対照群に比べその発現量が概ね3倍に上昇している。しかしながら、AxAF1VP16LexA の感染量が MOI 100 の場合と 60 の場合とで差が認められなかった。これは AxCALNLZ を MOI 30 で感染させて導入された lacZ 遺伝子が最大限に発現したという可能性が考えられるが、その場合 Cre recombinase の発現量は AxAF1VP16LexA(MOI60)の共感染系において3倍以上になっている可能性が考えられる。

加えて本研究におけるもう1つの大きな特徴は、プロモーター強度増強の一方、AFP 産生細胞に対する非常に高い遺伝子発現特異性が損なわれていないという点である。これには転写活性因子の発現にも組織特異的プロモーターを用いたことが寄与していると考えられる。

本研究で示した AFP プロモーターと転写活性因子を用いた特異的遺伝子発現の増強法は HCC の遺伝子治療に有用で、AFP を産生する他の癌腫にも応用可能と考えられる。このモデルは今回 adenovirus vector で呈示したが他の遺伝子導入法あるいは次世代のベクターにおいても応用可能である。