

審査の結果の要旨

氏名 瀧川 拓人

本研究は現在でもなお予後不良な原発性肝癌に対する次世代の治療法として期待される遺伝子治療に関し、肝癌細胞において特異的に遺伝子発現を起こす α -フェトプロテイン (AFP) プロモーターの弱点であるプロモーター強度を増強する系の開発を目的としたものであり、下記の結果を得ている。

1. AFP 産生および非産生の2種類の培養肝癌細胞株に対するアデノウイルスベクターと AFP プロモーターの組合せにより LacZ 遺伝子を導入し、遺伝子導入効率、遺伝子発現効率、細胞増殖阻害効果についての検討を行った。アデノウイルスベクターは、肝癌細胞株に対して優れた遺伝子導入効率を有し、汎用強力な CAG プロモーター下では、高い遺伝子産物の発現を実現した。これに対して AFP プロモーター下では、AFP 非産生細胞では遺伝子発現が認められず、AFP 産生細胞に対する高い特異性が認められた。しかし、AFP 産生細胞 HuH7 に対し AxAFPZ を MOI 30 で感染させた場合でも、3分の1の細胞しか染色されず、そのプロモーター強度は不十分であると考えられた。一方、肝癌細胞株はアデノウイルスベクターによる感染そのものにより容易に傷害を受け、細胞増殖が抑制されることがわかり、この細胞毒性により AFP 産生細胞に対する細胞選択性が相殺されることが、アデノウイルスベクターと AFP プロモーターの組合せによる遺伝子治療戦略上問題点となることが明らかになった。

2. Sato et al.の報告した Cre/loxP 制御システムを応用した二重感染法に基づいて、AFP プロモーターを有し、導入細胞において Cre recombinase を発現するアデノウイルスベクター AxAFPNCre と Cre recombinase の存在下で β -ガラクトシダーゼを発現するアデノウイルスベクター AxCALNLLacZ との共感染による遺伝子発現に関して AxAFPZ 単独感染を行った場合との比較検討を行った。この方法は低感染量においては有効であったが、高感染量では効果は乏しく、AFP プロモーターにおいては AFP 産生細胞に対する特異性は保たれていたが、なお遺伝子発現量は不十分と考えられた。

3. AFP プロモーターの強度を高める目的で、転写活性因子 VP16LexA と AFP プロモーターを組み合わせる系を考案し、これに従い新規プラスミドを合成し、AFP 産生細胞株において特異的に転写活性因子 VP16LexA を発現するアデノウイルスベクター AxAF1VP16LexA を作製した。同時に、転写活性因子

VP16LexA の結合部を有し、AFP プロモーターと Cre 遺伝子を組み合わせて新規プラスミドを合成し、VP16LexA が結合することにより増強する AFP プロモーターの作用で Cre recombinase を高発現するアデノウィルスベクター Ax7L-AF1NCre を作製した。

4. AFP 産生細胞と AFP 非産生細胞それぞれに関し、2 種類の新規アデノウィルスベクター AxAF1VP16LexA、Ax7L-AF1NCre を用いて AxCALNLLacZ との共感染させることとした。この系は、転写活性因子による AFP プロモーターの増強法と Cre/loxP 二重感染法との組合せ効果を有すると考えられ、その効果を従来法と比較検討した。X-gal 染色を行った結果、AFP 産生肝癌細胞 HuH7 に対して、AxAF1VP16LexA、Ax7L-AF1NCre、AxCALNLLacZ 同時感染の場合には染色の程度に明らかな差が認められなかった。AxAF1VP16LexA を先行感染させた場合には、その感染量が MOI 30 の場合には明らかな差を認めなかったが、Ax7L-AF1NCre を MOI 100 で感染させた群、MOI 160 で感染させた群と比較し、AxAF1VP16LexA (MOI 60) と Ax7L-AF1NCre (MOI 100) を共感染させた群では染色細胞数、染色の程度とも明らかに増強していた。一方、AFP 非産生肝癌細胞 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。ルミノメトリーによる定量評価では、AFP 産生細胞 HuH7 に対して AxAF1VP16LexA を感染させた群では非感染群に比べ β -ガラクトシダーゼ発現量が 2.8~3.1 倍に上昇していた。AxAF1VP16LexA 感染群において AFP 産生細胞 HuH7 における β -ガラクトシダーゼの発現は、AFP 非産生細胞 HLF に比べ 57~330 倍と特異的に発現していることがわかった。これは対照となる非感染群に対して 84~520 倍の発現がみられたことに遜色が無かった。

以上、本論文は肝癌細胞において、AFP プロモーターと転写活性因子を用いた、新たな特異的遺伝子発現の増強法を示した。また、本研究における大きな特徴は、プロモーター強度増強が得られた一方、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。今なお臨床応用への道のは険しいが、本研究の結果は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り、原発性肝癌あるいは AFP を産生する他の癌腫に対する今後の遺伝子治療に貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。