

学位論文題名

AFP プロモーター依存的 HSVtk 遺伝子の導入による
AFP 産生胃癌の自殺遺伝子治療モデル

学位論文内容の要旨

緒言

血中 α -フェトプロテイン (AFP) の上昇は、胃癌の約 5% 程度に見られると報告されている。AFP 産生胃癌の多くが組織学的に肝様腺癌の形態を示す。肝様腺癌とは、病理組織学的に肝細胞癌に類似した形態を持ち、高分化腺癌の合併と高度の静脈侵襲を特徴とし、臨床的に高率に肝転移を合併する予後不良な腫瘍である。自殺遺伝子治療の基本的戦略は、哺乳類に存在しない微生物由来の薬剤代謝酵素遺伝子 (単純ヘルペスチミジンキナーゼ (Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase: HSVtk) 遺伝子など) を癌細胞に導入し、その酵素で活性化されるプロドラッグ (一般的には抗ウイルス剤; Ganciclovir (GCV) など) を投与することにより遺伝子導入細胞のみを選択的に死滅させるというものである。GCV は HSVtk により最終的に 3 リン酸化型 GCV となり細胞障害を起こす。今回、肝様腺癌の新たな治療法の開発を目指し、*in vitro* において AFP 産生胃癌に対する自殺遺伝子治療の効果を検討した。

材料と方法

- 1) 細胞: AFP 産生ヒト胃癌細胞株 FU97, AFP 非産生ヒト胃癌細胞株 MKN28, ヒト胎児腎細胞由来の 293 細胞を使用した。
- 2) アデノウイルスベクター: AFP エンハンサー/プロモーターと HSVtk を組み込んだ AdAFPtk, AFP エンハンサー/プロモーターと β -galactosidase (lacZ) 遺伝子を組み込んだ AdAFP β lacZ を使用した。また、cytomegalovirus enhancer + chicken β -actin promoter + rabbit β -globin poly A からなる CAG プロモーターと、lacZ 遺伝子を組み込んだ Adex1C β lacZ を使用した。
- 3) AFP 分泌の測定: 各細胞を 1×10^5 個/ml となるように調整し、24 時間の培養後上清中の AFP を測定した。
- 4) *in vitro* におけるアデノウイルスによる lacZ 遺伝子の発現: FU97, MKN28 を 24 時間培養後、Adex1C β lacZ では 1×10^{-4} から 10^2 MOI の濃度で、AdAFP β lacZ では 1 から 10^4 MOI で 1 時間感染させ、24 時間の培養後 X-gal で染色し、 β -galactosidase 発現細胞数の平均をとり β -gal 陽性率とした。
- 5) *in vitro* における AdAFPtk および GCV による自殺遺伝子治療: FU97 は 1 well あたり 1×10^5 個に調整し、0.3, 3, 10, 30 MOI の AdAFPtk に感染させた。MKN28

は 1 well あたり 1×10^4 個に調整し、30MOI の AdAFPtk に感染させた。各々を 24 時間の培養後、0, 1, $10 \mu\text{M}$ の GCV を含む培養液に交換した。同様に 2, 4, 6 日後にそれぞれの濃度の GCV の溶解した培養液を交換した。GCV を含む培養液に交換してから計 7 日間の培養後生細胞数を計数した。

結果

1) 胃癌細胞株における AFP の分泌： 1×10^5 個/ml で 24 時間培養した FU97 において、 176.2 ± 8.8 ng/ml の AFP 分泌が認められたが、MKN28 においては AFP 分泌は認められなかった。

2) 胃癌細胞株におけるアデノウイルスベクターによる lacZ 遺伝子の発現：Adex1CALacZ を感染させた時の β -gal 陽性率は、FU97 と MKN28 ではそれぞれ、 10^2 MOI では $61.33 \pm 7.88\%$ と $100 \pm 0.00\%$ 、10MOI では $41.67 \pm 2.19\%$ と $96.67 \pm 0.67\%$ 、1MOI では $18.33 \pm 2.19\%$ と $34.33 \pm 4.49\%$ 、 10^{-1} MOI では $1.13 \pm 0.64\%$ と $2.63 \pm 1.30\%$ 、 10^{-2} MOI では $0.13 \pm 0.13\%$ と $0.00 \pm 0.00\%$ 、 10^{-3} と 10^{-4} MOI では $0.00 \pm 0.00\%$ と $0.00 \pm 0.00\%$ であった。AdAFP_{lacZ} を感染させたときの β -gal 陽性率は、 10^4 、 10^3 、 10^2 、10、1MOI の時、FU97 では $29.00 \pm 1.53\%$ 、 $14.67 \pm 1.45\%$ 、 $3.33 \pm 0.67\%$ 、 $0.33 \pm 0.33\%$ 、 $0.00 \pm 0.00\%$ であったが、MKN28 では 10^3 から 1MOI のときにおいて、いずれのウイルス濃度でも認められなかった。

3) 胃癌細胞株に対する AdAFPtk および GCV による自殺遺伝子治療：FU97 及び MKN28 に AdAFPtk を種々の濃度で感染させ、GCV の溶解した培養液中で 7 日間培養した後の生細胞数を計数した。対照のウイルスベクターとして AdAFP_{lacZ} を用いた。培養液に GCV を含まないときの生細胞数を 1 として、GCV を含む培養液を用いたときの生細胞数との比を取って評価した。 30 MOI、 10 MOI、 3 MOI の AdAFPtk を感染させたとき、1、 $10 \mu\text{M}$ の GCV の濃度で、GCV を含まないときに比べて GCV の濃度依存的に生細胞数の比の低下が認められ、AdAFP_{lacZ} を感染させたときの同じ GCV 濃度での生細胞数の比と比較してそれぞれ有意に低値であった。この生細胞数の減少は殺細胞効果によると考えられた。また、AdAFPtk の濃度が高いほど殺細胞効果が大きい傾向が認められた。 0.3 MOI の AdAFPtk を感染させた時は、両者に有意差を認めなかった。MKN28 では、 30 MOI の AdAFPtk を感染させたとき、GCV が $0 \mu\text{M}$ のときに比べて 1、 $10 \mu\text{M}$ の GCV の濃度で殺細胞効果は認められなかった。

考察

AdAFPtk 感染により、AFP 産生胃癌細胞株 FU97 ではウイルスベクター濃度依存的に、および GCV 濃度依存的に殺細胞効果が認められた。しかし、AFP 非産生胃癌細胞 MKN28 では殺細胞効果はみられなかった。アデノウイルスに対する感染感受性は MKN28 の方が FU97 より高いので、HSVtk 遺伝子発現による AFP 産生胃癌細胞の GCV 感受性亢進はアデノウイルスの感染効率の差によるものではなく、細胞の AFP プロモーター活性に依存するものと考えられた。

AdAFP_{lacZ} での lacZ 遺伝子の発現率と AdAFPtk での HSVtk 遺伝子の発現率が等しいと仮定した場合、AdAFPtk を感染させたときの HSVtk 遺伝子の発現率は最高 30 MOI を感染させた場合でも 1-2% でかなり低率であると推察される。AdAFPtk が 30、10、3MOI の時、 $10 \mu\text{M}$ の GCV 濃度において、いずれも 50% 以上の殺細胞効果が認められたが、その理由には、X-gal 染色による AdAFP_{lacZ} による lacZ 遺伝子

の発現率から推測される HSVtk 遺伝子の発現率は低率であるが、個々の細胞では微量のチミジンキナーゼが発現して殺細胞効果が得られた可能性が考えられた。また HSVtk と GCV を用いた自殺遺伝子治療では、bystander effect が認められることが諸家の研究により報告されており、本研究の結果もこの bystander effect により HSVtk 遺伝子の発現率が低率であるにもかかわらず殺細胞効果が認められた可能性が考えられた。本研究を臨床応用するために、*in vivo* でのアデノウイルスベクターの投与経路の検討と殺細胞効果の検討を今後の課題としたい。

結語

AFP 産生胃癌に対する AdAFPtk と GCV による自殺遺伝子治療の有効性が、細胞株を用いた *in vitro* の実験系において確認された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

AFP プロモーター依存的 HSVtk 遺伝子の導入による AFP 産生胃癌の自殺遺伝子治療モデル

AFP 産生胃癌の多くを占める肝様腺癌は、臨床的に高率に肝転移を合併する予後不良な腫瘍である。新たな治療法の開発を目的として、*in vitro* において AFP 産生胃癌に対する自殺遺伝子治療の効果を検討した。AFP 産生ヒト胃癌細胞株 FU97, AFP 非産生ヒト胃癌細胞株 MKN28 にアデノウイルスベクターである AFP エンハンサー/プロモーターと HSVtk を組み込んだ AdAFPtk, AFP エンハンサー/プロモーターと β -galactosidase (lacZ) 遺伝子を組み込んだ AdAFPlacZ を種々の濃度で感染させ、GCV を含む培養液中での殺細胞効果を検討した。AdAFPlacZ を感染させたときの β -gal 陽性率は、 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 1MOI の時、FU97 では $29.00 \pm 1.53\%$, $14.67 \pm 1.45\%$, $3.33 \pm 0.67\%$, $0.33 \pm 0.33\%$, $0.00 \pm 0.00\%$ であったが、MKN28 では 10^3 から 1MOI のときにおいて、いずれのウイルス濃度でも認められなかった。AFP 産生胃癌である FU97 に AdAFPtk を種々の濃度で感染させ、GCV の溶解した培養液中で 7 日間培養した後の生細胞数を計数した結果、30MOI, 10MOI, 3MOI の AdAFPtk を感染させたとき、1, $10 \mu\text{M}$ の GCV の濃度で、GCV を含まないときに比べて GCV の濃度依存的に生細胞数の比の低下が認められ、AdAFPlacZ を感染させたときの同じ GCV 濃度での生細胞数の比と比較してそれぞれ有意に低値であり、殺細胞効果が認められた。また、AdAFPtk の濃度が高いほど殺細胞効果が大きい傾向が認められた。AFP 非産生胃癌である MKN28 に 30MOI の AdAFPtk を感染させたとき、殺細胞効果は認められなかった。

口頭発表に際し、副査の今村教授より、bystander effect が周囲の正常細胞に影響を与えるかもしれない事を考えると virus vector の感染効率を上げない方がよいのではないかと、実験での GCV の濃度は臨床的に許容範囲なのか、adenovirus vector 以外の vector での感染効率について質問があった。申請者は virus vector の濃度はなるべく低い方が好ましいこと、臨床的な GCV の薬物動態に関する報告では最高 20 から $30 \mu\text{M}$ の GCV の濃度になって

いることから、本研究での GCV の濃度は適当であること、adenovirus vector 以外での感染効率に関してはこの場で回答できないと述べた。次に、副査の吉木教授より、ヒトでの臨床応用はどうなっているか、癌性腹膜炎などの閉鎖系に関しての有効性について、adenovirus vector の全身投与の可能性について、肝様腺癌の一般的な特徴に関して、他の AFP 産生腫瘍に対して応用が可能かについての質問があった。申請者は、日本では肺癌で臨床試験が行われていること、マウスでの悪性中皮腫の腹水モデルでの報告があること、adenovirus に対する抗体産生の問題で全身投与は難しいこと、肝様腺癌は胃、大腸、肺、膀胱、腎盂、卵巣に発生しいずれも AFP を産生することから本研究の応用が可能であると考えられると回答した。最後に主査の浅香教授より、AFP 産生腫瘍としてまず第一に考えられる HCC ではなく AFP 産生胃癌を実験に使用した理由について、AFP 産生胃癌の産生する AFP と HCC のものとの質的な異同に関して、adenovirus vector 以外の vector を使用できる可能性、HSVtk+GCV の系以外の系にはどのようなものがあるのかについての質問があった。申請者は、既に HCC では同様の報告があり、AFP 産生胃癌でも HCC と同様に AFP プロモーター依存的な自殺遺伝子治療の効果があるのかを検討する目的と、予後の悪い肝様腺癌の新たな治療法の開発を目指したこと、HCC と胃肝様腺癌の AFP のレクチン分画は類似しているとの報告があること、cytosine deaminase+5-FC の実験系が知られていること、標的細胞に特異的に感染する vector が望ましいことを回答した。

本研究は、肝細胞癌以外の AFP 産生腫瘍で、AFP プロモーター依存的な自殺遺伝子治療の効果を検討したという点で高く評価され、今後は動物モデルを用いた *in vivo* での治療効果の検討が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。