



Title	Gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human lung cancer cells by cell type-specific expression of herpes simplex virus thymidine kinase gene.
Author(s)	大崎, 匡
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39629
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	大崎	康
博士の専攻分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	第11988号	
学位授与年月日	平成7年5月16日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位論文名	Gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human lung cancer cells by cell type-specific expression of herpes simplex virus thymidine kinase gene. (細胞特異的に発現する単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子を用いた胎児性癌抗原陽性ヒト肺癌細胞に対する遺伝子治療)	
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 忠三 (副査) 教授 濱岡 利之 教授 田中亀代次	

論文内容の要旨

【目的】

肺癌の約半数を占め、従来の治療法に抵抗性である肺腺癌に対して、高頻度に発現する胎児性癌抗原CEAを標的とした遺伝子治療の可能性を検討する。即ち、CEA遺伝子のプロモーターを結合した単純ヘルペスウイルス(HSV)のThymidine Kinase(TK)遺伝子を、細胞に導入・発現させた後、基質となる抗ウイルス剤のガンシクロビル(GCV)を投与することにより、CEA発現細胞をより選択的に殺傷する。

(方法ならびに成績)

1. 肺腺癌を含む複数の培養株におけるCEAの発現をノーザンブロット法で検討した。肺腺癌株ではA549に最も強い発現を認め、VMRC-LCD, RERF-LC-MSにも中等度、また、大腸癌株LoVoに高発現を認めた。一方、肺腺癌株CADO-LC9, RERF-LC-OK, ABC-1、肺小細胞癌株OS2R、子宮癌細胞株HeLaにはほとんど発現を認めなかった。また、これらの発現量はRIA固相法を用いて測定したCEA蛋白量と正の相関を示した。
2. CEA遺伝子の細胞特異的なプロモーター領域は、開始コドンの上流424bpから2bpに存在することがすでにわかっており、PCR法によってこのフラグメントをクローニングした。CEAの発現の異なる肺腺癌細胞株を用いて、そのプロモーター活性を検討する目的で、フラグメントをCATベクターに接続し約5.1kbのpCEACATを作成した。活性はSV40のプロモーターを持つpSV2CATとの比活性で表した。CEA発現株であるA549におけるpCEACATの活性はpSV2CATの活性の26%であり、CEA非発現株であるCADO-LC9の2.8倍、HeLaの8.7倍の値を示した。このことから、我々がクローニングしたCEA遺伝子のプロモーター領域は、CEA抗原陽性のヒト肺癌細胞に選択的に働くことが明らかとなった。
3. このCEAプロモーターの下流に、HSV-TK遺伝子を結合した発現ベクターを作成し、ネオマイシン耐性遺伝子とともにA549, CADO-LC9, HeLaに導入して、G418を含む選択培地より複数のクローンを樹立した。これらのクローンの、in vitroでのGCV感受性をMTTアッセイで検討した。50%成長阻止濃度(IC₅₀)で比較したところ、A549のHSV-TKを導入されたクローンと親株のIC₅₀はそれぞれ0.57 ± 0.12, 600 ± 200 μMであり、1053倍

の感受性増強を示した。一方、CADO-LC9においては、GCV感受性に有意な変化は認めず、また、HeLaにおいては3.6倍の感受性増強にとどまった。

4. HSV-TK遺伝子を導入したA549のクローンを用いて *in vivo* のGCV感受性を検討した。ヌードマウスの側腹部皮下にA549のクローン細胞を移植し、腫瘍形成を確認後、GCVを50mg/kg腹腔内に1日1回、14日間連続投与し、腫瘍径を測定した。GCV投与によりHSV-TK遺伝子を導入したクローンのみが退縮した。また、HSV-TK遺伝子を導入したクローンは生理食塩水を投与した場合、親株と同様に増大することより、遺伝子導入による細胞の増殖に対する影響はほとんどないと考えた。
5. GCV投与中止後、HSV-TK遺伝子を導入したクローンを移植したマウス10匹中9匹において腫瘍の再増殖を認めた。この再発腫瘍のDNAをサザン法でみると導入したTK遺伝子は保たれていた。また、再発腫瘍の *in vitro*におけるGCV感受性はオリジナルのクローンとほぼ同じであった。これらの再発マウスにGCVを增量し、75mg/kg投与したところ、腫瘍の増大は抑制された。したがって、GCVの作用機序がDNA合成阻害であることから、休止期にとどまっていた一部の腫瘍細胞がGCV投与中止後に再び細胞分裂を開始し腫瘍を形成したと考えられ、GCV投与量の增量だけでなく投与方法の変更により再発克服の可能性が示唆された。

【総括】

従来の治療法に対抗性である肺腺癌に対して、CEA遺伝子のプロモーターを結合したHSV-TK遺伝子を導入し、GCVを投与することにより、CEA発現肺腺癌を特異的に障害する遺伝子治療の可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、肺癌のうち特に治療困難な腺癌に対して、胎児性癌抗原(CEA)遺伝子のプロモーターを結合した単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-TK)遺伝子を用い、癌特異的な遺伝子治療が応用可能か検討を行った。即ち、CATアッセイ法を用い、CEA遺伝子のプロモーター領域がCEA発現肺腺癌において組織特異的な活性を示す事を明らかにし、このCEA遺伝子のプロモーターを用い、CEA発現肺腺癌にHSV-TK遺伝子を特異的に発現させ、ガニシクロビル(GCV)高感受性肺腺癌株を樹立した。さらに、GCV投与によりヌードマウス皮下に移植したこのGCV高感受性株を退縮せしめた。

これらの結果は、肺癌に発現するCEAをターゲットにした遺伝子治療の可能性を初めて示したものであり、臨床的に意義があると考えられる。よって本研究は学位に値するものと考える。