



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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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 匡
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 9 8 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 5 月 1 6 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、腫瘤形成を確認後、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 を増量し、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瘤を形成したと考えられ、GCV 投与量の増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、ガンシクロビル (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、肺腺癌に発現する 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する。