



Title	Application of the Cre Recombinase/loxP System Further Enhances Antitumor Effects in Cell Type-specific Gene Therapy Against Carcinoembryonic Antigen-producing Cancer
Author(s)	木島, 貴志
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43076">https://hdl.handle.net/11094/43076</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	木 島 貴 志
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 0 9 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 12 年 2 月 29 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	Application of the Cre Recombinase/ <i>loxP</i> System Further Enhances Antitumor Effects in Cell Type-specific Gene Therapy Against Carcinoembryonic Antigen-producing Cancer (Cre/ <i>loxP</i> 系を応用し抗腫瘍効果を増強した CEA 産生癌特異的遺伝子治療)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松澤 佑次 (副査) 教 授 金田 安史 教 授 宮崎 純一

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

CEA 産生癌に対し、CEA 遺伝子プロモーターの制御下に単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子を特異的に発現させガンシクロビル (GCV) 投与により癌細胞を死滅させる遺伝子治療モデルにおいて、従来のアデノウイルスベクター (Ad.CEA-TK) 単独感染法では CEA プロモーター活性の低さゆえ十分な HSV-TK 遺伝子の発現が得られず満足な治療効果を得るには至らなかった。本研究では、この問題点を克服するべく Cre/*loxP* 系を応用した Ad. 二重感染法を用い、この方法が単独感染法に比べより強力でかつ特異性を保った CEA 産生癌に対する治療モデルとなりうるかを検討した。

### 【方法ならびに成績】

#### 1. 非増殖型アデノウイルスベクター (Ad.) の作製

二重感染法用ベクターとして、CEA プロモーターの制御下に Cre リコンビナーゼを特異的に発現する Ad.CEA-Cre と、これと同時に感染した時、Cre の作用により 2 つの *loxP* site に挟まれた neomycin 耐性遺伝子が外れて初めて強力な CAG プロモーターからの HSV-TK 遺伝子あるいは LacZ 遺伝子の強発現が可能になる Ad.*lox*-TK および Ad.*lox*-LacZ を COS-TPC 法を用いて作製した。また、従来の単独感染法用ベクターとして、CEA プロモーターあるいは CAG プロモーターの制御下に直接 HSV-TK 遺伝子を発現する Ad.CEA-TK および Ad.CAG-TK を同様の方法にて作製した。ウイルスは CsCl 濃度勾配超遠心法にて精製し簡便法 (斉藤ら) にて力価測定後、使用時まで  $-80^{\circ}\text{C}$  に保管した。

#### 2. 目的遺伝子発現を最大にする両ウイルスの至適感染比率の検討

この二重感染法において目的遺伝子の発現を最大にする両ウイルスの感染比を検討するため、CEA 産生癌株 LoVo および CEA 非産生癌株 A549 に Ad.CEA-Cre と Ad.*lox*-LacZ を種々の比率で感染 (total moi30) させ 3 日後に cell lysate 中の  $\beta$ -galactosidase 活性を測定した。LoVo では感染比 1 : 1 の時に最大の LacZ 遺伝子の発現 (7.1  $\mu$  units/cell) を得たのに対し、A549 ではいずれの感染比においても LacZ 遺伝子の発現はほとんど見られなかった。

### 3. 二重感染法による CEA 産生癌特異的 GCV 感受性の増強

Ad.CEA-Cre と Ad.lox-TK の二重感染 (total moi30) か Ad.CEA-TK あるいは Ad.CAG-TK の単独感染 (moi30) を行った時の GCV 感受性を  $IC_{50}$  (細胞増殖を 50% 抑制するのに必要な GCV 濃度) を指標に検討 (MTT 法) したところ、二重感染時の CEA 産生癌株 LoVo および VMRC-LCD の *in vitro* での GCV 感受性は、Ad.CEA-TK 単独感染時に比べそれぞれ 8.4 倍 ( $0.17 \mu\text{M}$ ) および 3.3 倍 ( $1.40 \mu\text{M}$ ) 増強し、これらは Ad.CAG-TK 単独感染時に匹敵するものであった。しかも、CEA 非産生癌株 A549 の GCV 感受性には有意な変化はなく、特異性は保たれていた。

### 4. *In vivo* における CEA 産生癌特異的抗腫瘍効果の増強

CEA 産生癌株 LoVo を Balb/c ノードマウスの側腹部皮下に接種後腫瘍面積が  $20 \text{ mm}^2$  をこえた時点で Ad. を腫瘍内に接種 ( $5 \times 10^8$  pfu、計 3 回) し、GCV ( $50 \text{ mg/kg} \times 2/\text{day}$ ) を 14 日間腹腔内投与した。Ad.CEA-Cre と Ad.lox-TK の二重感染群では、腫瘍は 7 匹中 6 匹のマウスで完全退縮した。一方、Ad.CEA-TK 単独接種群では腫瘍増大速度が軽度抑制されるにとどまった。また観察期間中、特に副作用は認められなかった。

#### 【総括】

Cre/*loxP* 系を応用した Ad. 二重感染法の有効性が証明された。この方法は、以下の点で優れていると考えられる。第一に、従来の単独感染法に比べ特異性を損なうことなく強い抗腫瘍効果を得ることができること。第二に、一般的に低い細胞特異的プロモーターの活性を上げるために各々の特異的エンハンサー領域を解析しプロモーターの上流に結合するといった煩雑な手間をかけずに強力な CAG プロモーターからの安定した目的遺伝子の発現誘導が可能であり、種々のプロモーターに応用できることである。将来的には肺癌の癌性胸膜炎・消化器癌の癌性腹膜炎を治療対象と想定しており、Cre/*loxP* 系を応用した Ad. 二重感染法はその治療法の一つとなりえると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

癌胎児性抗原 (CEA) は最も汎用される腫瘍マーカーの 1 つであるが、血清 CEA レベルの上昇する癌は、肺癌・胃癌・大腸癌など我国の癌死亡原因の上位を占めるものばかりである。従って、CEA 産生癌に対する新しい治療法の開発は極めて有意義なことである。CEA 産生癌に対し、CEA 遺伝子プロモーターの制御下に単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子を特異的に発現させガンシクロビル (GCV) 投与により癌細胞を死滅させる遺伝子治療において、従来のアデノウイルスベクター (Ad.CEA-TK) 単独感染法では CEA プロモーター活性の低さゆえ十分な HSV-TK 遺伝子の発現が得られず満足な治療効果を得るには至らなかった。一方強力な CAG プロモーターを用いた (Ad.CAG-TK) 場合、十分な HSV-TK 遺伝子の発現は得られるもののその非特異性ゆえ正常細胞への重篤な副作用が問題となる。本研究では、このような両者の問題点を克服するべく Cre/*loxP* 系を応用した。

CEA プロモーターの制御下に Cre リコンビナーゼを特異的に発現する Ad.CEA-Cre と、これと同時に感染した時 Cre の作用により 2 つの *loxP* site に挟まれた stuffer 遺伝子が外れて初めて強力な CAG プロモーターからの HSV-TK 遺伝子の強発現が可能になる Ad.lox-TK を作製した。Ad.CEA-Cre と Ad.lox-TK の二重感染は、従来の Ad.CEA-TK 単独感染に比べ GCV による CEA 産生癌に対する抗腫瘍効果をはるかに増強させた。しかもこの効果は CEA 非産生細胞においては見られず、特異性は保たれていた。さらに *in vivo* においても特に副作用は見られなかった。

以上より、細胞特異的プロモーターを利用した遺伝子治療において Cre/*loxP* 系を応用した Ad. 二重感染法の有効性が証明された。この方法は、以下の点で優れていると考えられる。第一に、従来の単独感染法に比べ少ないウイルス投与量で特異性を損なうことなく強い抗腫瘍効果を得ることができるため、ウイルス毒性を軽減できる可能性があること。第二に、一般的に低い細胞特異的プロモーターの活性を上げるために各々の特異的エンハンサー領域を解析しプロモーターの上流に結合するといった煩雑な手間をかけずに強力な CAG プロモーターからの安定した目的遺伝子の発現誘導が可能であり、種々のプロモーターに応用できることである。本法は、血清 CEA 高値を示す肺癌の癌性胸膜炎・消化器癌の癌性腹膜炎への臨床応用に向けた一歩進んだ新しい治療法である。

よって、本研究は、博士 (医学) の学位授与に値するものと認める。