



Title	GENE THERAPY UTILIZING THE Cre/loxP SYSTEM SELECTIVELY SUPPRESSES TUMOR GROWTH OF DISSEMINATED CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN-PRODUCING CANCER CELLS
Author(s)	後藤, 浩之
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43722">https://hdl.handle.net/11094/43722</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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">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	後藤 浩之
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16854 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	GENE THERAPY UTILIZING THE <i>Cre/loxP</i> SYSTEM SELECTIVELY SUPPRESSES TUMOR GROWTH OF DISSEMINATED CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN-PRODUCING CANCER CELLS ( <i>Cre/loxP</i> システムを用いた遺伝子治療は播種した癌胎児性抗原産生腫瘍の増殖を選択的に抑制する。)
論文審査委員	(主査) 教授 川瀬 一郎  (副査) 教授 金田 安史 教授 荻原 俊男

## 論文内容の要旨

## 【目的】

アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療は幅広く使われており、p53遺伝子欠損症の一部の症例に有効であった。ところがこれらは局所療法である。一方アデノウイルスベクターの高容量の投与により死亡例も報告があり、副作用の軽減のために、腫瘍特異的な遺伝子治療が必要と考えられる。

CEA (carcinoembryonic antigen) は肺癌、胃癌、大腸癌など多くの癌に発現しており、腫瘍特異的な遺伝子治療の良い対象である。今回我々は Cre recombinase (Cre) により一対の loxP site ではさまれる DNA フラグメントが切り出される *Cre/loxP* システムを利用し、播種した CEA 産生癌に対して抗腫瘍効果を増強した特異的な遺伝子治療の有効性を検討した。

## 【方法ならび成績】

CEA promoter の下流に Cre recombinase を発現するアデノウイルスベクター Ad.CEA-Cre と、Cre 存在下において強力に herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK) 遺伝子を発現する Ad.lox-TK および  $\beta$ -galactosidase 遺伝子を発現する Ad.lox- $\beta$ -gal を作成した。また CAG promoter 制御下に HSV-TK を非特異的に発現する Ad.CAG-TK および CEA promoter 単独の制御下に HSV-TK を発現する Ad.CEA-TK も使用した。

*in vitro* で CEA 産生癌細胞株 LoVo に Ad.CEA-Cre と Ad.lox-TK を同時に感染 (二重感染) したところ、ganciclovir (GCV) の感受性  $IC_{50}$  は  $0.413 \pm 0.170 \mu M$  であり、従来の Ad.CEA-TK 感染による  $IC_{50}$ 、 $1.40 \pm 0.361 \mu M$  に比べ約 3.4 倍感受性が増強し、また非感染細胞の  $IC_{50}$ 、 $495 \pm 122 \mu M$  に比べ 1200 倍増強していた。一方 CEA 非産生細胞 A549 においては二重感染による感受性はコントロールと有意な差はなかった。一方 Ad.CAG-TK により感染すると、 $IC_{50}$  は LoVo において  $0.177 \pm 0.197 \mu M$ 、A549 においても  $IC_{50}$ 、 $0.18 \pm 0.02 \mu M$  と感受性を増強した。

マウスに CEA 産生癌による癌性腹膜炎を作成し腫瘍選択的に遺伝子導入が可能か検討した。CEA 産生腫瘍 LoVo または CEA 非産生腫瘍 OS2RA をヌードマウスの腹腔内にそれぞれ  $1 \times 10^7$  個投与し、腫瘍生着後に Ad.CEA-Cre と Ad.lox- $\beta$ -gal による二重感染または Ad.CAG- $\beta$ -gal を  $1 \times 10^9$  pfu 腹腔内投与し、2 日後 X-gal 染色により遺伝子発現を検討した。LoVo を投与したマウスの腹腔内では二重感染により肝臓、腸管などの腹腔内臓器は染まらず腫瘍結節が選択的に染まったが、OS2RA を投与したマウスの腹腔内においては腫瘍結節を含め、遺伝子の発現を認めなかつ

た。一方、Ad.CAG- $\beta$ -gal 投与群では LoVo と OS2RA を生着させたマウスでは腫瘍結節を含む腹腔臓器も染まっていた。以上より *Cre/loxP* システムを用いた二重感染により腹腔内に播種した CEA 産生癌に選択的遺伝子導入が可能であった。

次に CEA 産生癌の腹膜炎モデルにおける抗腫瘍効果を検討した。LoVo 細胞  $1 \times 10^7$  個をマウス腹腔内投与後、9、15、21日にアデノウイルスを各群  $1 \times 10^8$  pfu 投与した。ベクター投与後 5 日間 ganciclovir (GCV) を 100mg/kg/day を投与し、これを 3 クール行った。35 日後に腹腔内腫瘍結節の総重量を測定した。Ad.CEA-Cre/Ad.lox-TK に GCV 投与した群の腫瘍重量は  $27.26 \pm 16.79$ mg であり Ad.CEA-TK/GCV 群 ( $123.51 \pm 24.83$ mg)、PBS/GCV 群 ( $178.51 \pm 104.88$ mg)、および Ad.CEA-Cre/Ad.lox-TK に生理食塩水を投与した群、( $129.78 \pm 141.36$ mg) に比べてそれぞれ有意に腫瘍重量が少なかった。しかし、Ad.CAG-TK/GCV 群 ( $83.38 \pm 19.19$ mg) とは有意差がなかった。また Ad.CEA-Cre/Ad.lox-TK に GCV 投与した群は 40% のマウスにおいては腫瘍結節を認めなかった。さらに副作用の検討を行った。治療中のマウスの体重を継続的に測定したところ、Ad.CAG-TK/GCV 群は最大約 11% の体重減少を認めた。さらに 35 日目においては同群はコントロール群に比べ AST は約 2.5 倍、ALT は約 7 倍と上昇していた。また肝臓を病理組織学的に検討したところ同群は炎症細胞の浸潤と壊死をとまなう肝細胞の破壊像が認められた。一方、二重感染群ではいずれの変化も認めなかった。以上より非特異的に HSV-TK 遺伝子を発現させる治療群では副作用を認めたが、Ad.CEA-Cre/Ad.lox-TK に GCV 投与した二重感染法による治療は明らかな副作用を認めなかった。

#### 【総括】

CEA 産生癌 LoVo の癌性腹膜炎モデルにおける抗腫瘍効果を検討したところ、Ad.CEA-Cre/Ad.lox-TK に GCV 投与した群は Ad.CEA-TK/GCV を含む他の治療群に比べ有意な抗腫瘍効果を認めた。これらは腫瘍選択的かつ強力に HSV-TK gene を導入できたためと考えられる。一方 Ad.CAG-TK 群は抗腫瘍効果は強かったが、下痢および肝機能障害による死亡例を認めた。これらの結果より *Cre/loxP* system を利用した本遺伝子治療法は播種した CEA 産生腫瘍に対して選択的な抗腫瘍効果を発揮し、正常臓器への副作用を回避することが可能であると考えられた。この方法は今後  $\alpha$ -fetoprotein 産生癌などや myc 過剰発現肺小細胞癌などに対しても応用が可能である。

#### 論文審査の結果の要旨

アデノウイルスベクターを使った遺伝子治療は進行した癌に対して、現在のところ十分な治療効果をあげているとは言えない。また高容量のベクター投与による死亡例の報告もあり、腫瘍組織特異的な遺伝子治療は進行癌に対して必要である。本研究では、播種した癌胎児性抗原 (CEA) 産生腫瘍に対して *Cre/loxP* 系を応用した遺伝子治療の有効性を検討した。

CEA プロモーター制御下に Cre recombinase を発現するアデノウイルスベクター Ad.CEA-Cre と、Cre により 2 つの *loxP* site ではさまれる DNA フラグメントが外れて強力な CAG プロモーターが働き、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子の発現が可能となるアデノウイルスベクター Ad.lox-TK を作製した。CEA 産生腫瘍 LoVo による癌性腹膜炎モデルを、Ad.CEA-Cre と Ad.lox-TK の二重感染後にガンシクロビル (GCV) 投与した治療群は、従来の Ad.CEA-TK 感染後に GCV 投与した治療に比べ抗腫瘍が増強した。また、強力だが非特異的に TK 遺伝子を発現するベクター Ad.CAG-TK 感染後に GCV を投与した治療群に比べ副作用が少なくかつ同等の抗腫瘍効果を認めた。

以上より、組織特異的なプロモーターに *Cre/loxP* 系を応用したアデノウイルスによる遺伝子治療の有用性が証明された。この方法は進行癌に対して有用かつ副作用が少なく、低容量のベクター投与で治療が可能であり、臨床応用に向けた一歩進んだ治療として期待できる。

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。