

アルブミン遺伝子エンハンサーおよびプロモーターを
制御因子とする組換えレトロウイルスを用いた肝臓に対する
遺伝子治療の基礎的研究

奈良県立医科大学第3内科学教室

中谷敏也

BASIC INVESTIGATIONS ON RETROVIRAL-MEDIATED GENE THERAPY
TOWARD HEPATOMA BY USE OF ALBUMIN ENHANCER AND PROMOTER
AS A TISSUE-SPECIFIC REGULATORY ELEMENT

TOSHIYA NAKATANI

The Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received March 28, 1994

Abstract: Recent remarkable developments in molecular biology and *in vitro* culture techniques have provided a promising new treatment, gene therapy, for cancer and congenital genetic diseases. For *in vivo* gene therapy toward cancer, it is indispensable to direct the expression of exogenous genes exclusively to cancer cells. I have constructed a recombinant retroviral vector in which a tissue-specific regulatory element is used as an internal promoter. It contains the murine albumin enhancer and promoter as an internal promoter and the *lacZ* gene coding bacterial β -galactosidase as a reporter between the two Moloney murine leukemia virus long terminal repeats. This vector was introduced into ecotropic retroviral ψ 2 packaging cells to produce recombinant retroviral particles. Various cell lines were infected with the recombinant retrovirus to assess its tissue specificity *in vitro*. Expression of the *lacZ* gene was detected solely in hepatoma cell lines but not in fibroblasts nor in B lymphoma cells. *In vivo* infection was carried out to evaluate tissue specificity of this system. The recombinant retrovirus was injected into a murine subcutaneous hepatoma and expression of the *lacZ* gene was observed in hepatoma cells but not in surrounding connective tissues. Then the retrovirus was injected into murine livers and no expression was detected in normal hepatocytes. The retrovirus was again injected into the livers of partially hepatectomized mice, resulting in the gene expression in only a few regenerating hepatocytes. Ratio of expression of the exogenous gene was, however, much lower than that in subcutaneous hepatoma. Finally, the gene expression of higher efficiency was confirmed as the retroviral infections were repeated. These results indicate that repeated gene transfer by means of the recombinant retrovirus which contains a tissue-specific regulatory element as an internal promoter should possess high potential for selective elimination of hepatoma cells *in vivo*.

Index Terms

gene therapy, hepatoma, albumin enhancer and promoter, retroviral vector, β -galactosidase

緒 言

近年の分子生物学の目ざましい発達と細胞培養技術の進歩により、遺伝子治療に関する基礎研究は急速な発展を遂げ、米国を中心としてすでに臨床治験が開始されている^{1)~3)}。わが国においても、1993年4月に厚生省より、さらに1994年1月には文部省より、遺伝子治療臨床研究に関するガイドライン^{4)~6)}が発表され、遺伝子治療の臨床応用に向けての準備が進められている。

現在一般的に試みられている遺伝子導入法は、*ex vivo* 遺伝子導入法と呼ばれるもので、遺伝子導入のための標的細胞を体内より採取し培養をおこなった後に、外来遺伝子を導入し再び体内へ移植する方法である。現在の遺伝子導入技術では、一回の遺伝子治療のみで十分な効果が得られるとは考えにくく、繰り返しおこなう必要があるが、*ex vivo* 遺伝子導入法は、標的細胞の採取に外科的手技を要するため、同一患者に繰り返し施行することは困難である。*in vivo* における効率的な遺伝子導入が可能であれば、遺伝子治療はより臨床応用が容易になり、新局面を迎えると考えられる。この際、最も重要なことは、いかにして外来遺伝子を標的細胞で特異的に発現させるかである。しかし、現在の遺伝子導入はもっぱら *ex vivo* においておこなわれているため、標的細胞特異的な外来遺伝子の導入発現方法に関しては、ほとんど検討がなされていない。

ところで、当教室では以前より組換えレトロウイルスを用いて培養細胞への遺伝子導入をおこなっている。そこで著者は、組織特異性を有する内因性プロモーターを用いて、標的細胞特異的な遺伝子導入が可能であるかを検討した。すなわち、レポーター遺伝子として大腸菌の β -galactosidase をコードしている *lacZ* 遺伝子⁹⁾ を、内因性プロモーターとしてマウスのアルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーター⁷⁾ を用いた組換えレトロウイルスベクターを作製し、肝癌細胞特異的な遺伝子発現に関する基礎的研究をおこなった。

方 法

1) 組換えレトロウイルスベクターの作製

すべてのプラスミドは標準的な組換えDNA技術⁸⁾によって構築した。肝細胞に特異的な遺伝子導入および発現のために構築した Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスベクターの作製法を Fig. 1 に示した。ネオマイシン耐性を与える *neo^R* 遺伝子⁹⁾ をモロニー株マウス白血病ウイルス

由来の long terminal repeat (LTR) 間を含む pIF 9171 プラスミド¹⁰⁾ を、*HpaI* 制限酵素で切断し平滑末端を有する線状プラスミド DNA を作製した。大腸菌の β -galactosidase をコードする *lacZ* 遺伝子を含む SPUD プラスミド⁶⁾ を *Hind* III 制限酵素で切断し、垂直型アガロースゲルを用いて *lacZ* 遺伝子断片を分離回収した後に、Klenow 酵素により両端を平滑末端とした。この線状 pIF 9171 プラスミドに *lacZ* 遺伝子断片を T4 DNA リガーゼを用いて挿入し、pIP 200 レトロウイルスベクターを作製した。

次に、マウス由来のアルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーターを含む Alb e/p-Bluescript プラスミド⁷⁾ を、*Hind* III 制限酵素で切断し、アルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーター断片を回収した。この断片を pIP 200 レトロウイルスベクターの *Hind* III 部位へ挿入し、Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスベクターを作製した。

2) 組換えレトロウイルスベクターの産生

同種指向性のレトロウイルスのパッケージング細胞である ψ 2 細胞¹¹⁾ を、 1×10^4 cells/cm² の密度で 60 mm 培養皿へ撒き、10% 胎児牛血清 (FCS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を加え 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。24 時間後に、Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスベクタープラスミド (Fig. 2) あるいは BAG レトロウイルスベクタープラスミド¹²⁾ (Fig. 2) をリン酸カルシウム法¹³⁾ により ψ 2 細胞へ導入した。48 時間後に培養液へネオマイシンの類似物質である G 418 (Sigma) を 1 mg/ml の濃度で添加し、14 日後に G 418 耐性の細胞株を選択し培養増殖させた。G 418 耐性細胞株の培養液中に放出される Alb e/p-pIP 200 あるいは BAG レトロウイルスを回収し、0.45 μ m poresize filter (Nalgene) 濾過後、-70°C に凍結保存し以下の実験に用いた。

3) 培養細胞へのレトロウイルス感染法および X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactosidase) 染色法¹⁴⁾

培養実験には、Balb/c マウス由来の付着性肝癌細胞である BNL 1 ME A.7 R.1 細胞、C3 H/He マウス由来の浮遊性肝癌細胞である MH-134 細胞、マウス胎児由来の線維芽細胞である NIH 3 T 3 細胞およびマウス由来の B リンパ腫細胞である A 20-2 J 細胞を用いた。

各種細胞の培養は、60 mm 培養皿に 10% FCS、100 units/ml のペニシリンおよび 100 μ g/ml のストレプトマイシンを含む 5 ml の DMEM を加えて、37°C、5%

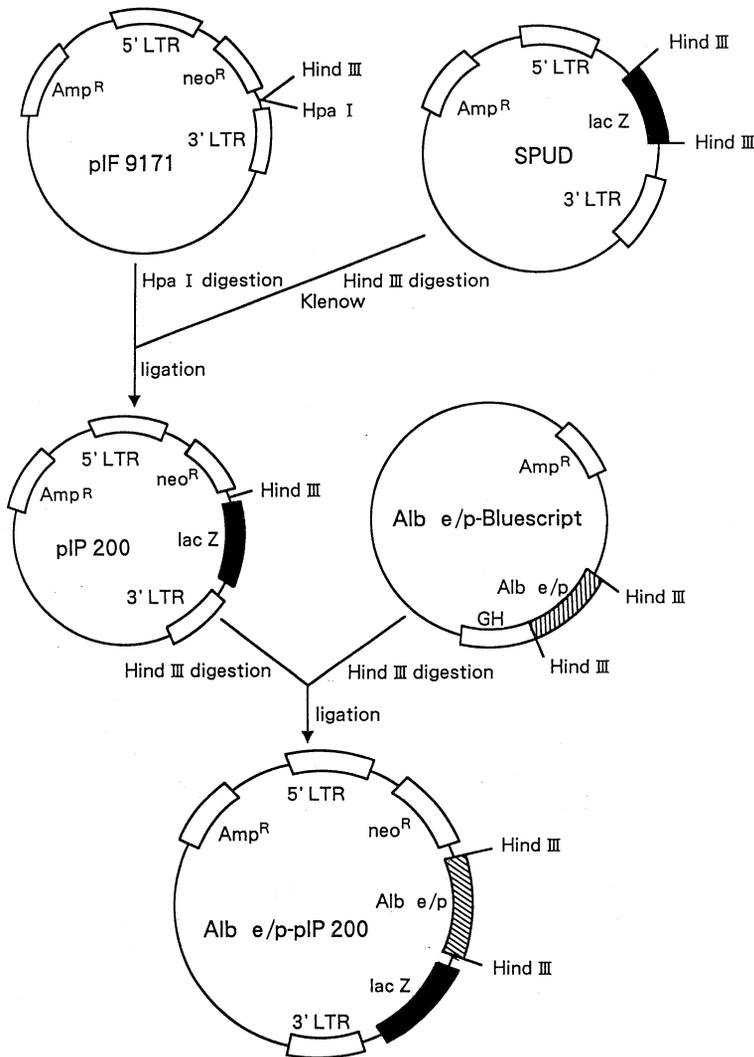


Fig. 1. Schematic drawing of the construction of the Alb e/p-pIP200 retroviral vector.

Alb e/p-pIP200 vector was constructed by inserting the *lacZ* gene from the SPUD vector and the albumin enhancer and promoter fragment from the Alb e/p-Bluescript plasmid between the *neo^R* gene and the 3'LTR in the pIF9171 vector. Alb e/p, GH and *Amp^R* represent the albumin enhancer and promoter, growth hormone gene and ampicillin resistance gene, respectively.

CO₂の条件下でおこなった。

レトロウイルスの感染法は、培養細胞に 8 μg/ml の polybrene を含むウイルス液を種々の割合で添加し、37°C で 3~6 時間感染させた。ウイルスを除き新しい培養液を加え、一晚培養した後に 0.5% glutaraldehyde を用いて室温下で 5 分間細胞を固定した。次に、1 mM MgCl₂ を含む phosphate-buffered saline (PBS) で細胞を 2 回

洗浄し、X-gal 染色液 (0.1% X-gal, 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% NP-40, 1 mM MgCl₂, 5 mM K₃[Fe(CN)₆], 5 mM K₄[Fe(CN)₆] in PBS without calcium or magnesium) と 12~16 時間反応させ、*lacZ* 遺伝子の発現細胞を同定した。

4) *in vivo* におけるレトロウイルス感染法および X-gal 染色法

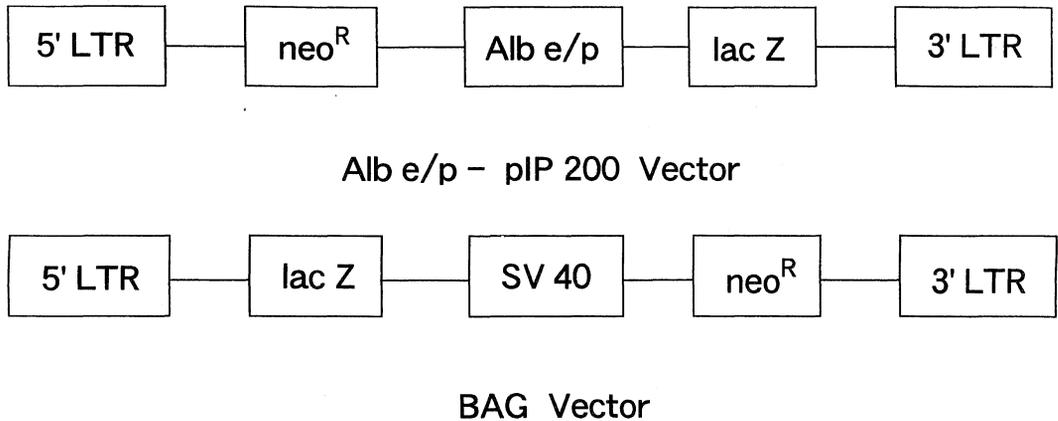


Fig. 2. Structure of the retroviral vectors.

Alb e/p-pIP200 vector contains the *neo^R* gene regulated by the 5'LTR promoter and the *lacZ* gene regulated by the albumin enhancer and promoter within the two Moloney murine leukemia virus LTRs. BAG vector contains the *lacZ* gene regulated by the 5'LTR promoter and the *neo^R* gene regulated by the SV40 early promoter within the two Moloney murine leukemia virus LTRs.

MH-134 肝癌細胞をマウス腹腔内で増殖させた後に、C3H/He マウスの皮下に接種(4×10^7 cells/0.2 ml of DMEM with 10% FCS)し、皮下肝癌の直径が 10 mm に達した時点で、10 μ g/ml の polybrene を含む 0.5 ml の Alb e/p-pIP 200 レトロウイルス液を皮下肝癌内に直接注入した。7 日後に皮下肝癌を切除し、10 分間固定(4% paraformaldehyde, 0.2% glutaraldehyde, 0.02% NP-40 in 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4)した後、マイクロスライサーを用いて 200- μ m の薄片を作製し、再度同様の固定を 50 分間おこなった。これらの薄片を 1 mM MgCl₂ を含む PBS で 2 回洗浄し、37°C で 12 時間 X-gal 染色液と反応させた。

6~7 週齢の雄性 C3H/He マウスにエーテル麻酔下で 3/4 部分肝切除をおこない、36 時間後に 10 μ g/ml の polybrene を含む 0.3 ml の Alb e/p-pIP 200 レトロウイルス液を脾臓下縁より、あるいは直接肝内に注入した。7 日後に肝を摘出し、100- μ m の薄片を作製し、皮下肝癌切片と同様の固定をおこなった後に X-gal 染色液と反応させた。

結 果

1) 組換えレトロウイルスを用いた肝癌細胞への遺伝子導入

BNL 1 ME A.7 R.1 肝癌細胞に 500 μ l の Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを感染させ X-gal 染色をおこなったところ、10~15% の肝癌細胞が青く染色され、*lacZ* 遺伝子の発現を認めた(Fig. 3 A)。同量の BAG レトロウイルス

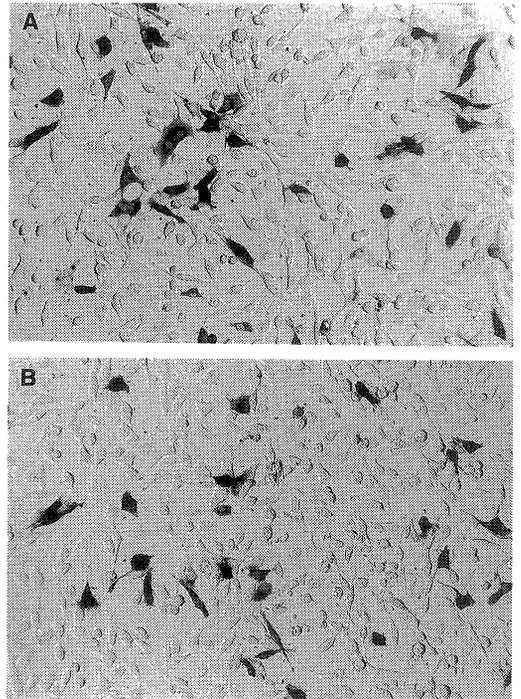


Fig. 3. Expression of the *lacZ* gene in BNL1ME A.7R.1 hepatoma cells.

The cells were infected with the Alb e/p-pIP200 retrovirus(A) or BAG retrovirus(B). The gene expression was detected by X-gal staining. Magnification: $\times 200$.

スを感染させた場合にも、10~15%の肝癌細胞に *lacZ* 遺伝子の発現を認めた(Fig. 3 B)。さらに、MH-134 肝癌細胞に 500 μ l の Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを感染させ、X-gal 染色をおこなったところ、約 4%の肝癌細胞に *lacZ* 遺伝子の発現を認めた(Fig. 4 A)。同量の BAG レトロウイルスを感染させた場合にも、同様に約 4%の細胞に *lacZ* 遺伝子発現を認めた(Fig. 4 B)。

2)組換えレトロウイルスを用いた非肝癌細胞への遺伝子導入

マウス胎児由来の NIH 3 T 3 線維芽細胞に、500 μ l の Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを感染させ X-gal 染色をおこなっても、青く染色される細胞は全く認められず、*lacZ* 遺伝子を発現している細胞は検出できなかった(Fig. 5 A)。一方、同量の BAG レトロウイルスを感染させた場合には、約 30~40%の線維芽細胞において *lacZ* 遺伝子の発現を認めた(Fig. 5 B)。さらに、マウス由来の A 20-2 J B リンパ腫細胞に 500 μ l の Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを感染させた場合にも、*lacZ* 遺伝子を発

現する細胞は認めなかったが(Fig. 6 A)、同量の BAG レトロウイルスを感染させると、約 5%の B リンパ腫細胞に *lacZ* 遺伝子の発現を認めた(Fig. 6 B)。

3) Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを用いた *in vivo* における肝癌細胞への遺伝子導入

C 3 H/He マウス由来の移植可能な浮遊性肝癌細胞である MH-134 細胞をマウス皮下に接種し、皮下肝癌の直径が 10 mm に達した時点で Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを局所に直接注入した。7 日後に皮下肝癌を切除し、200- μ m の薄片を作製し X-gal 染色をおこなった。Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを注入した皮下肝癌部には、X-gal 陽性の細胞を認めたが、周囲の結合組織には *lacZ* 遺伝子の発現を認めなかった(Fig. 7)。

4) Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを用いた *in vivo* における正常肝細胞および再生肝細胞への遺伝子導入

C 3 H/He マウスの脾臓下縁より Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを注入し経門脈的に肝内へ投与した後に、肝を摘出し X-gal 染色をおこなったが、*lacZ* 遺伝子を発

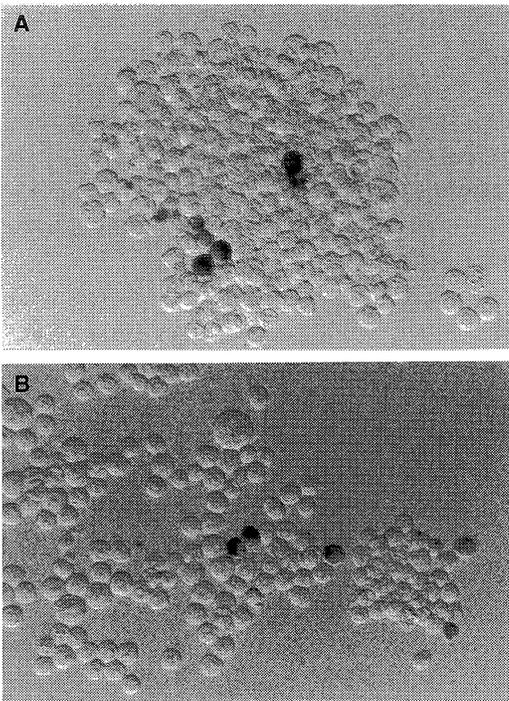


Fig. 4. Expression of the *lacZ* gene in MH-134 hepatoma cells.

The cells were infected with the Alb e/p-pIP200 retrovirus(A) or BAG retrovirus(B). The gene expression was detected by X-gal staining. Magnification: $\times 400$.

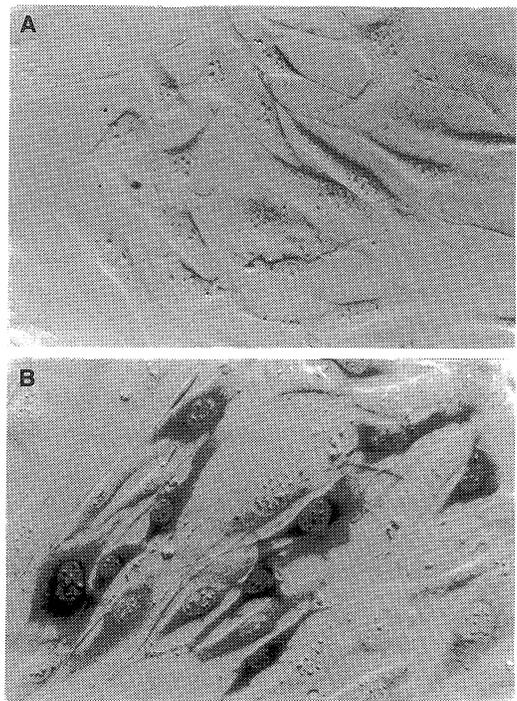


Fig. 5. Expression of the *lacZ* gene in NIH3T3 fibroblasts.

The cells were infected with the Alb e/p-pIP200 retrovirus(A) or BAG retrovirus(B). The gene expression was detected by X-gal staining. Magnification: $\times 400$.

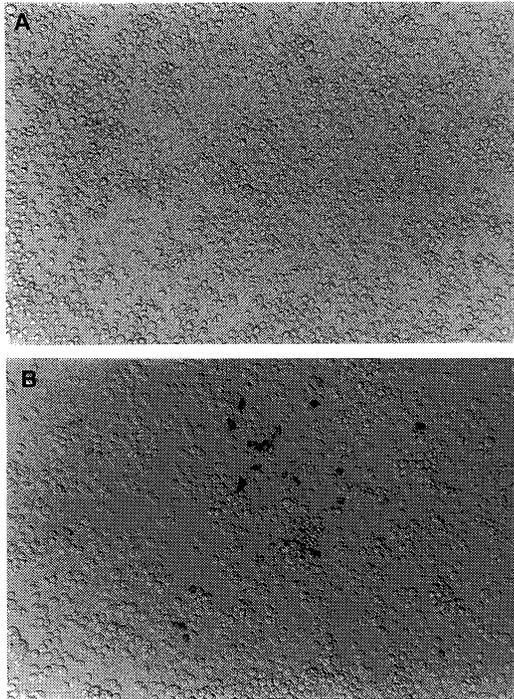


Fig. 6. Expression of the *lacZ* gene in A20-2J B lymphoma cells.

The cells were infected with the Alb e/p-pIP200 retrovirus(A) or BAG retrovirus(B). The gene expression was detected by X-gal staining. Magnification: $\times 200$.

現している肝細胞は全く認めなかった。さらに、C3H/He マウスの肝内へ直接 Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを注入した場合にも、*lacZ* 遺伝子の発現を認めなかった。

次に、C3H/He マウスに 3/4 部分肝切除をおこない、36 時間後に Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを経脾的に注入し、7 日後に肝および脾を摘出後、100- μ m の薄片を作製し X-gal 染色をおこなった。50 枚の肝薄片に関して X-gal 染色陽性の細胞を解析したが、12 枚の肝薄片において 1~2 個の陽性細胞を認めたのみであった (Fig. 8 A)。レトロウイルスの注入部位である脾臓においては、X-gal 染色陽性細胞を全く認めなかった。さらに、大腿骨より抽出した骨髓細胞や肺、腎臓、心臓および脳についても X-gal 染色をおこなったが、*lacZ* 遺伝子を発現している細胞は認めなかった。

部分肝切除後に、肝内へ直接 Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを注入した場合も、上記結果と同様に、50 枚の肝薄片中 9 枚において 1~2 個の X-gal 染色陽性細胞を認めたが (Fig. 8 B)、他の臓器においては認めなかつ

た。

5) 組換えレトロウイルスの反復感染による遺伝子導入効率の上昇

NIH 3T3 線維芽細胞に 200 μ l の BAG レトロウイルスを 1 回あるいは 3~6 時間毎に 5 回感染させ、X-gal 染色をおこなった。BAG レトロウイルスを 1 回感染させた場合には、*lacZ* 遺伝子を発現している細胞は約 18% であったが (Fig. 9 A)、5 回感染させた場合には約 95% の細胞において *lacZ* 遺伝子の発現を認めた (Fig. 9 B)。

次に、BNL 1 ME A.7 R.1 肝癌細胞に 200 μ l の Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを 1 回あるいは 3~6 時間毎に 5 回感染させ、X-gal 染色をおこなった。Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを 1 回感染させた場合には、*lacZ* 遺伝子を発現している細胞は約 6% であったが (Fig. 10 A)、5 回感染させた場合には約 35% の細胞において *lacZ* 遺伝子の発現を認めた (Fig. 10 B)。

考 察

近年の遺伝子工学の発達により、遺伝子治療に関する基礎研究は急速な進歩を遂げており、先天性遺伝子疾患だけでなく癌もまた遺伝子治療の対象となってきた。癌に対する遺伝子治療を *in vivo* においておこなうためには、目的とする外来遺伝子を癌細胞でのみ発現させることが最も重要である。著者は今回、レトロウイルスの LTR 間にアルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーターを組み込むことにより、肝癌細胞特異的な外来遺伝子の発現が可能であるかを検討した。

マウスのアルブミン遺伝子のプロモーターは約 300 塩基対よりなり、アルブミン遺伝子の転写を誘導するが、プロモーター領域のみでは完全な肝細胞特異的な発現を得ることはできず、小腸や脾臓において少量のアルブミン産生が認められることが報告されている⁷⁾。マウスアルブミン遺伝子のエンハンサーに関しては、プロモーターの上流 -10.4 キロ塩基対から -8.5 キロ塩基対の領域が、エンハンサーとしての機能を有しており、この 1.9 キロ塩基対よりなる断片をプロモーターに接続すると、肝細胞特異的に強力な遺伝子発現を誘導しえることが確認されている^{7), 15)-17)}。本研究では、アルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーターを内因性の制御因子とした Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを用いて実験をおこなった。

組織特異性を有する制御因子を内因性プロモーターとした組換えレトロウイルスベクターを構築した際に、内因性プロモーターが 5' 末端に存在する LTR 内のエンハ

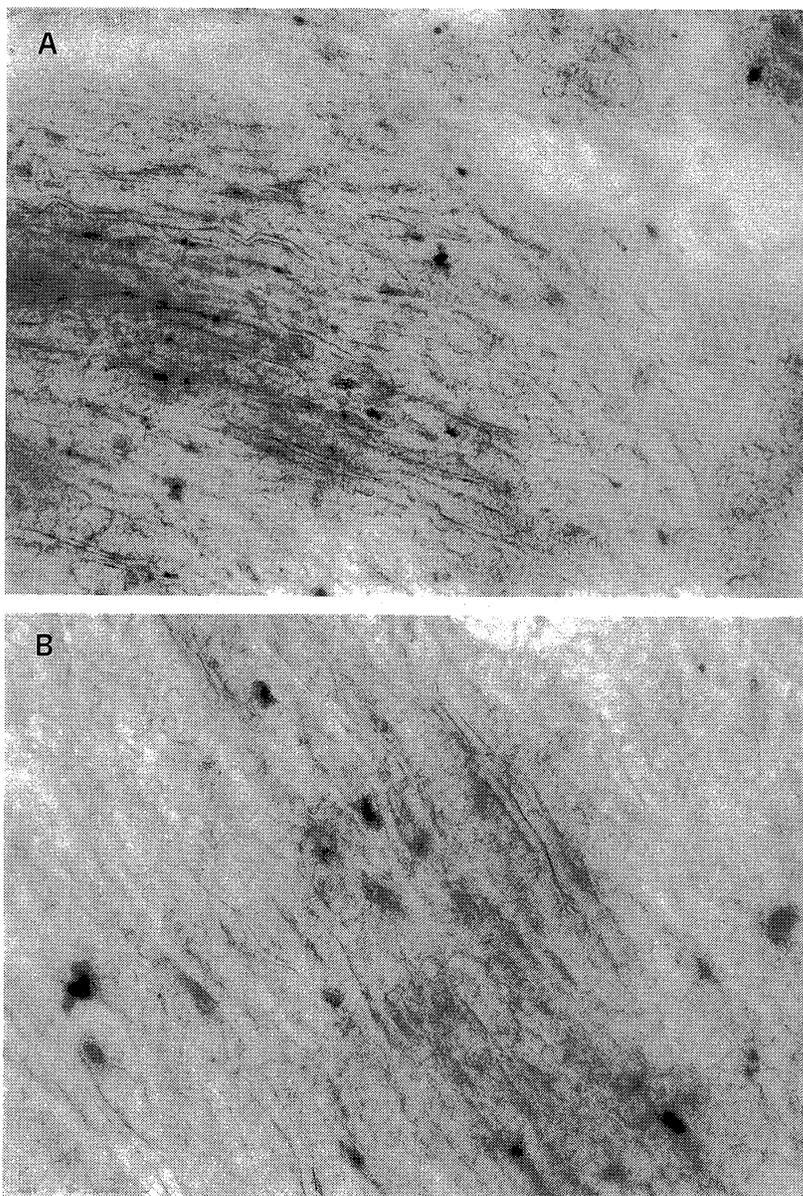


Fig. 7. Expression of the *lacZ* gene in the subcutaneous hepatoma infected with the Alb e/p-pIP200 retrovirus.

The Alb e/p-pIP200 retrovirus was directly injected into the subcutaneous tumor composed of MH-134 hepatoma cells. The cells expressing the *lacZ* gene were detected by X-gal staining. Magnification: A, $\times 40$; B, $\times 100$.

ンサーおよびプロモーターに干渉されることなく、その組織特異性を維持できるかどうかは、遺伝子治療をおこなう上で非常に興味深い問題であるが、現在に至るまで詳細な検討はなされていなかった。今回、*in vitro*において、Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを2種類の肝癌細胞

に感染させたところ、両肝癌細胞において外来遺伝子として用いた *lacZ* 遺伝子の発現を認めたが、線維芽細胞およびBリンパ腫細胞に感染させた場合には *lacZ* 遺伝子の発現を認めなかった。対照レトロウイルスとして用いた BAG レトロウイルスの場合には、組織特異性を有

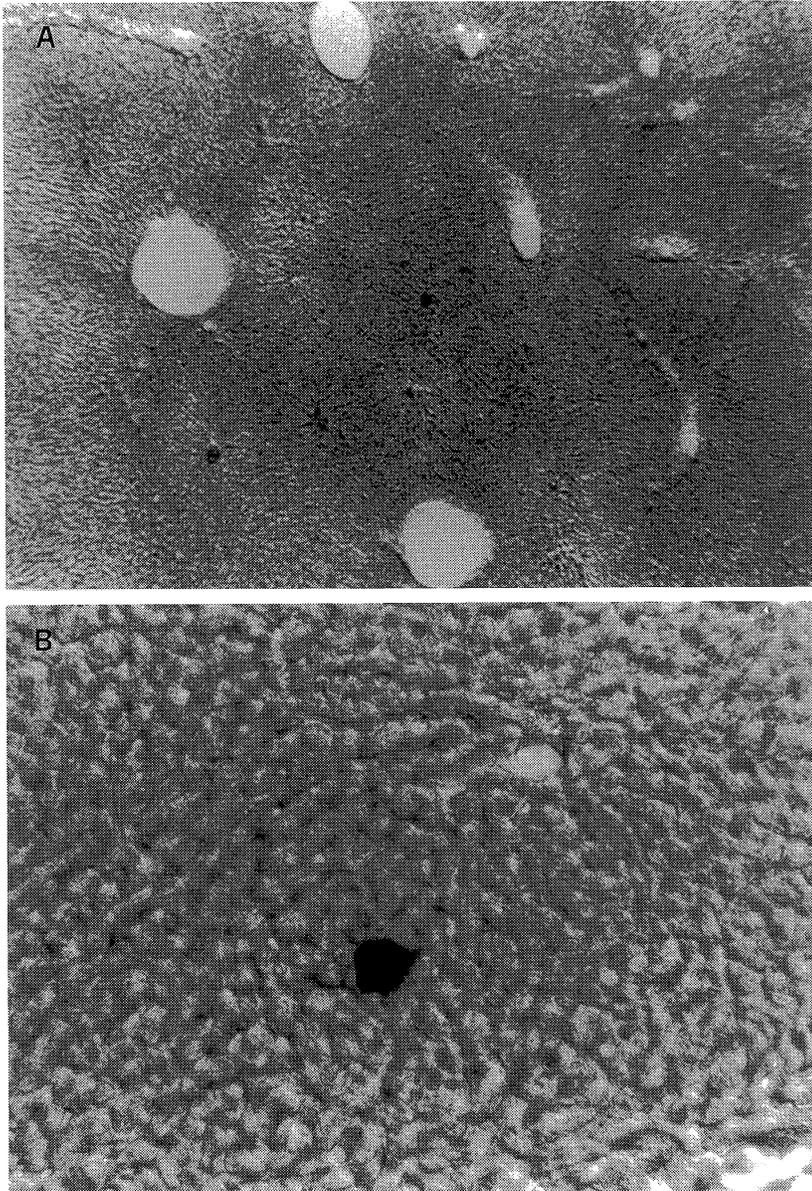


Fig. 8. Expression of the *lacZ* gene in the regenerating liver infected with the Alb e/p-pIP200 retrovirus.

The Alb e/p-pIP200 retrovirus was injected into the regenerating liver after partial hepatectomy, via the spleen(A) or directly(B). The cells expressing the *lacZ* gene were detected by X-gal staining. Magnification: A, $\times 40$; B, $\times 200$.

さないSV 40の初期プロモーターを内因性プロモーターとしているので、上記全細胞において *lacZ* 遺伝子の発現を認めた。これらの結果より、アルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーターは、組換えレトロウイルスベクター内に組み込まれても、その組織特異性を維

持しながら外来遺伝子の発現を厳密に制御することが示された。

レトロウイルスは増殖期にある細胞にのみ感染するという性質¹⁹⁾を有しており、それが癌の遺伝子治療ベクターとしての利点であるが、*in vivo*においてレトロウイル

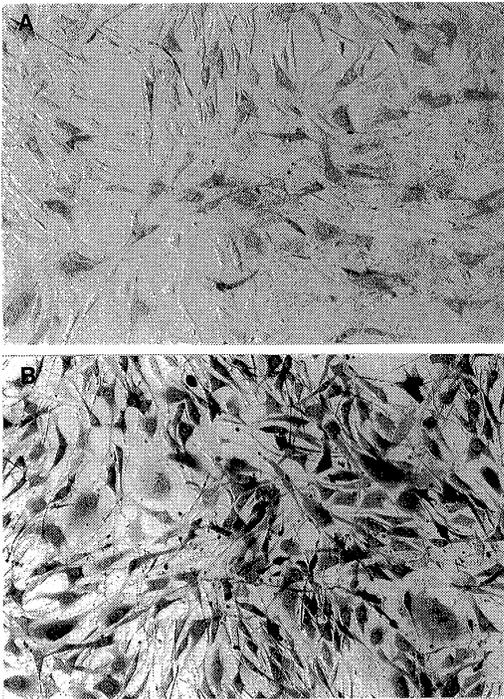


Fig. 9. Increased transduction efficiency of the *lacZ* gene in fibroblasts by repeated BAG retroviral infections. NIH3T3 fibroblasts were infected with the BAG retrovirus once(A) or 5 times(B). The gene expression was detected by X-gal staining. Magnification : $\times 150$.

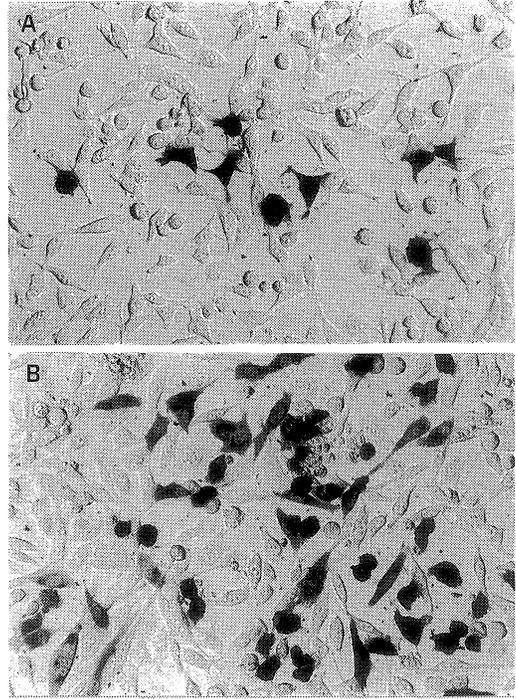


Fig. 10. Increased transduction efficiency of the *lacZ* gene in hepatoma cells by repeated Alb e/p- π IP200 retroviral infections. BNL1ME A. 7R. 1 hepatoma cells were infected with the Alb e/p- π IP200 retrovirus once(A) or 5 times(B). The gene expression was detected by X-gal staining. Magnification : $\times 300$.

スを感染させると、標的とした癌細胞のみではなく、多くの細胞が増殖期にある骨髄細胞へもレトロウイルスが感染する危険性がある。本研究において、Alb e/p- π IP 200 レトロウイルスは、骨髄細胞のモデルとして用いた B リンパ腫細胞に *lacZ* 遺伝子の発現を誘導しないことが確認され、組織特異性を有する組換えレトロウイルスを用いて外来遺伝子の導入をおこなえば、骨髄細胞において外来遺伝子は発現しないことが示唆された。

現在のところ、*in vivo* において外来遺伝子を癌細胞で特異的に発現させたという報告はなされていない。今回、Alb e/p- π IP 200 レトロウイルスをマウス皮下肝癌内へ直接注入すると、肝癌細胞には *lacZ* 遺伝子の発現を誘導したが、周囲の結合組織には発現を認めなかった。このことより、アルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーターの制御下に外来遺伝子が発現されるように構築した組換えレトロウイルスを肝癌内へ直接注入すると、肝癌細胞に特異的な外来遺伝子の発現が可能であることが示唆された。

次に、正常マウスへ経脾臓的にあるいは直接肝内へ Alb e/p- π IP 200 レトロウイルスを注入したが、正常肝細胞には *lacZ* 遺伝子の発現を認めなかった。レトロウイルスは増殖期の細胞にのみ感染するという性質を有しており静止期の細胞には感染しない¹⁹⁾。これは、増殖期の細胞のみがレトロウイルスの受容体を細胞膜表面に発現しているためと考えられている。このレトロウイルスに対する受容体は、アミノ酸の細胞内への輸送を司っていることが報告^{19),20)}されている。ところで、正常肝では増殖期にある肝細胞は 0.3% 未満と推定されており、上記の結果は正常肝細胞にレトロウイルスが感染しなかったことによると考えられる。

そこで、肝細胞の増殖を惹起するために部分肝切除をおこない、Alb e/p- π IP 200 レトロウイルスを経脾臓的にあるいは直接肝内へ注入したが、ごく少数の再生肝細胞において *lacZ* 遺伝子の発現を認めたのみであった。皮下肝癌における外来遺伝子の導入効率より遥かに低いことより、肝癌細胞と再生肝細胞ではレトロウイルス受容

体の発現率に明かな差があると考えられた。肝癌は基礎疾患として肝硬変を有する症例が大多数を占めているが、組換えレトロウイルスを用いた遺伝子導入をおこなえば、硬変部に存在する再生肝細胞にはほとんど影響することなく、肝癌細胞選択的な外来遺伝子の導入発現が可能であることが示唆された。さらに、骨髓細胞や他の臓器において *lacZ* 遺伝子の発現を認めなかったことより、アルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーターを内因性プロモーターとする組換えレトロウイルスを用いれば、*in vivo* において肝癌細胞特異的な外来遺伝子の発現を誘導しえることが示された。

NIH 3 T 3 線維芽細胞および BNL 1 ME A.7 R.1 肝癌細胞に、BAG あるいは Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを反復感染させると、遺伝子導入効率は著明に上昇し、NIH 3 T 3 細胞では5回のレトロウイルス感染により、90%以上の細胞において *lacZ* 遺伝子の発現を誘導しえた。BNL 1 ME A.7 R.1 肝癌細胞への遺伝子導入効率は、NIH 3 T 3 細胞への場合よりも低かったが、これも細胞間におけるレトロウイルス受容体の発現率の違いによると考えられる。

本法を用いた肝癌に対する遺伝子治療の臨床応用として、肝動脈内に留置したリザーバーカテーテルなどより、肝癌細胞特異性を有する組換えレトロウイルスの投与を繰り返せば、肝癌細胞選択的に効率的な外来遺伝子の導入発現が誘導できると考えられる。今後の検討課題としては、正常細胞には最小限の影響しか与えず肝癌細胞を効果的に死滅させるには、どのような殺細胞能を有する遺伝子を選択すれば良いのかということである。当教室では、細胞障害性のないプロドラッグを細胞障害性を有するドラッグに変換するプロドラッグ活性化酵素遺伝子として、単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ遺伝子²¹⁾⁻²⁴⁾と大腸菌由来のシトシンデアミナーゼ遺伝子^{25),26)}を用いて、それぞれの抗腫瘍効果の検討を開始している。

肝癌患者の大多数は、基礎疾患として重症の肝硬変を合併しているため、外科的切除の適応になることは少ない。肝癌に対する有効な遺伝子治療を確立することは、今後の肝癌治療を考える上での最重要課題である。さらに、適切な組織特異性を有するプロモーターを用いることにより、本治療法は肝癌以外の種々の癌に対しても応用可能と考えられ、将来の癌治療に新たな局面を展開できると考えられる。

結 語

臨床応用可能な肝癌に対する遺伝子治療の基礎的研究

として、組換えレトロウイルスを用いた肝癌細胞特異的な外来遺伝子の導入発現に関する検討をおこなった。内因性プロモーターとしてアルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーター領域を、レポーター遺伝子として大腸菌の β -galactosidase 遺伝子である *lacZ* 遺伝子を用いた Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを作製し、*in vitro* および *in vivo* における遺伝子導入実験をおこない、以下のごとき結果をえた。なお、対照レトロウイルスとしては *lacZ* 遺伝子の発現が SV 40 の初期プロモーターにより制御されている BAG レトロウイルスを使用した。

1. Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを、BNL 1 ME A.7 R.1 肝癌細胞および MH-134 肝癌細胞に感染させると *lacZ* 遺伝子の発現を認めたが、NIH 3 T 3 線維芽細胞および A 20-2 J B リンパ腫細胞に感染させても *lacZ* 遺伝子の発現を認めなかった。BAG レトロウイルスを感染させた場合には、上記全細胞株に *lacZ* 遺伝子の発現を誘導した。

2. マウス皮下肝癌内へ直接 Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを注入すると、肝癌細胞においては *lacZ* 遺伝子の発現を認めたが、周囲の結合組織には認めなかった。

3. マウス肝内へ経脾臓的あるいは直接肝内へ Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを注入しても、正常肝細胞には *lacZ* 遺伝子の発現を認めなかった。

4. 部分肝切除術を施行したマウス肝内へ、経脾臓的あるいは直接肝内へ Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを注入すると、少数の再生肝細胞において *lacZ* 遺伝子の発現を認めたが、遺伝子導入効率は皮下肝癌における場合と比較するときわめて低かった。また、骨髓細胞を含む他の臓器においては *lacZ* 遺伝子の発現を認めなかった。

5. NIH 3 T 3 線維芽細胞に BAG レトロウイルスを、あるいは BNL 1 ME A.7 R.1 肝癌細胞に Alb e/p-pIP 200 レトロウイルスを反復感染させると、遺伝子導入効率は著明に上昇した。

6. 以上より、アルブミン遺伝子のエンハンサーおよびプロモーターを内因性の制御因子とする組換えレトロウイルスを用いれば、再生肝細胞や増殖期にある正常細胞にはほとんど影響することなく、肝癌細胞に特異的な外来遺伝子の導入発現が可能であることが示唆された。さらに、*in vivo* においても、組換えレトロウイルスの反復投与をおこなえば、外来遺伝子の導入効率を上昇させると考えられた。

(本論文の要旨は、第 29 回日本肝臓学会総会シンポジウ

ムおよび第52回日本癌学会総会ワークショップにおいて発表した。稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜った恩師辻井 正教授に深甚の謝意を捧げるとともに、御助言、御校閲を賜った病態検査学教室中野博教授ならび腫瘍病理学教室小西陽一教授に深謝いたします。

また、本研究の遂行にあたって常に御指導、御助力をいただいた栗山茂樹博士ならびに御助力をいただいた教室の諸兄に感謝の意を表します。

なお本研究は文部省科研費一般研究(C)05670493の援助をうけた。

文 献

- 1) Thompson, L. : Science 258 : 744, 1992.
- 2) Miller, A. D. : Nature 357 : 455, 1992.
- 3) Morgan, R. A. and Anderson, W. F. : Annu. Rev. Biochem. 62 : 191, 1993.
- 4) 厚生省大臣官房 : 遺伝子治療臨床研究に関するガイドラインについて. 1993.
- 5) 文部省学術審議会特定研究領域推進分科会 : 大学等における遺伝子治療臨床研究に関するガイドライン. 1994.
- 6) Walsh, C. and Cepko, C. L. : Science 241 : 1342, 1988.
- 7) Pinkert, C. A., Ornitz, D. M., Brinster, R. L. and Palmiter, R. D. : Genes and Development 1 : 268, 1987.
- 8) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. : Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- 9) Eglitis, M. A., Kantoff, P., Gilboa, E. and Anderson, W. F. : Science 230 : 1395, 1985.
- 10) Ikenaka, K., Nakahira, K., Nakajima, K., Fujimoto, I., Kagawa, T., Ogawa, M. and Mikoshiba, K. : New Biologist 4 : 53, 1992.
- 11) Mann, R., Mulligan, R. C. and Baltimore, D. : Cell 33 : 153, 1983.
- 12) Prise, J., Turner, D. and Cepko, C. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 156, 1987.
- 13) Chen, C. and Okayama, H. : Mol. Cell. Biol. 7 : 2745, 1987.
- 14) Cepko, C. : Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. in Methods in Neurosciences (Conn, P. M., ed.). Academic Press, California p367, 1989.
- 15) Ott, M.-O., Sperling, L., Herbolmel, P., Yaniv, M. and Weiss, M. C. : EMBO 3 : 2505, 1984.
- 16) Herbst, R. S., Friedman, N., Darnell, J. E. and Babiss, L. E. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 1553, 1989.
- 17) Frain, M., Hardon, E., Ciliberto, G. and Sala-Trepat, J. M. : Mol. Cell. Biol. 10 : 991, 1990.
- 18) Miller, D. G., Adam, M. A. and Miller, A. D. : Mol. Cell. Biol. 10 : 4239, 1990.
- 19) Kim, J. W., Closs, E. I., Albritton, L. M. and Cunningham, J. M. : Nature 352 : 725, 1991.
- 20) Wang, H., Kavanaugh, M. P., North, R. A. and Kabat, D. : Nature 352 : 729, 1991.
- 21) Caruso, M. and Klatzmann, D. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 182, 1992.
- 22) Culver, K. W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E. H. and Blaese, R. M. : Science 256 : 1550, 1992.
- 23) Miyao, Y., Shimizu, K., Moriuchi, S., Yamada, M., Nakahira, K., Nakajima, K., Nakao, J., Kuriyama, S., Tsujii, T., Mikoshiba, K., Hayakawa, T. and Ikenaka, K. : J. Neurosci. Res. 36 : 472, 1993.
- 24) Kuriyama, S., Yoshikawa, M., Tominaga, K., Nakatani, T., Sakamoto, T., Fukui, H., Ikenaka, K. and Tsujii, T. : Int. Hepatol. Commun. 1 : 253, 1993.
- 25) Mullen, C. A., Kikstrup, M. and Blaese, R. M. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 33, 1992.
- 26) Austin, E. A. and Huber, B. E. : Mol. Pharmacol. 43 : 380, 1993.