

# 細菌由来シトシンデアミナーゼ遺伝子と5-フルオロシトシンによる癌に対する遺伝子治療に関する基礎的研究

奈良県立医科大学第3内科学教室

増井一弘

## BASIC INVESTIGATIONS OF GENE THERAPY AGAINST CANCER BY USE OF BACTERIAL CYTOSINE DEAMINASE AND 5-FLUOROCYTOSINE

KAZUHIRO MASUI

*The Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University*

Received March 25, 1996

**Abstract:** The gene for bacterial cytosine deaminase (CD) which metabolites the innocuous prodrug 5-fluorocytosine (5-FC) to the highly toxic drug 5-fluorouracil (5-FU) was transduced *via* retrovirus into several cell lines: hepatocellular carcinoma (HCC), squamous cell carcinoma (SCC) and myoblastoma. Transduction of the CD gene did not affect the growth rate of these cells. However, the cells genetically modified to express CD were sensitive to 5-FC in a dose-dependent manner, and the modified HCC, SCC and myoblastoma cells exhibited approximately 120-, 130- and 460-fold higher sensitivity to 5-FC, respectively, compared with each of the corresponding parental cells. Cells expressing CD were killed with 5-FC at concentrations achievable in sera of patients receiving clinical doses of 5-FC. Conversely, there were no significant differences in the susceptibility to 5-FU between the modified cells and their parental cells. The cells expressing CD were able to induce the killing of their neighboring parental cells in the presence of 5-FC not only when they were in contact with each other but also when they were not. The killing ability of cells expressing CD was closely correlated with amounts of 5-FU generated by the cells. Most importantly, this killing effect was also observed *in vivo*. Significant antitumor effects were induced in mice bearing HCC cells composed of the modified and unmodified cells by an intraperitoneal injection of 5-FC. When genetically modified HCC cells comprised only 10% of a tumormass, significant suppression of HCC development was achieved by administration of subtoxic doses of 5-FC. These results demonstrated the feasibility of gene therapy using the bacterial CD gene and 5-FC for the treatment of cancers.

### Index Terms

gene therapy, cytosine deaminase, 5-fluorocytosine, bystander effect, cancer

### 緒 言

近年の分子生物学のめざましい進歩により、多くの遺伝子病の原因遺伝子が同定・単離され、病態の分子機構が明らかにされるとともに、これらの原因遺伝子を正常

に戻す遺伝子治療の可能性が検討され始めた。その後の遺伝子導入技術の進歩に伴い、遺伝子治療は遺伝子病のみならず、種々の悪性腫瘍や後天性免疫不全症候群などの後天性疾患にも、その応用が積極的に検討されている。現在、米国では50種類以上の遺伝子治療プロトコールが

承認され、先天性の免疫不全症候群であるアデノシンデアミナーゼ欠損症、家族性高コレステロール血症、嚢胞性線維症、血友病などの遺伝子病のみならず、悪性黒色腫、脳腫瘍、白血病、肺癌、卵巣腫瘍などの悪性腫瘍や後天性免疫不全症候群も遺伝子治療の対象として臨床試験が開始されている<sup>1)~3)</sup>。わが国においても、1993年4月に厚生省より、1994年1月には文部省より、遺伝子治療に関するガイドライン<sup>4)5)</sup>が発表され、1995年8月には、アデノシンデアミナーゼ欠損症の患者に対する遺伝子治療が開始されている。遺伝子治療に関する研究は、今後わが国においてもますます積極的に遂行されるものと考えられる。

当教室では、以前より臨床応用可能な肝癌に対する遺伝子療法の確立を目指し基礎的検討を行っており、アルブミン遺伝子のプロモーターを内因性制御因子とするレトロウイルスベクターを用いれば、レポーター遺伝子である大腸菌由来の $\beta$ -galactosidase 遺伝子を、*in vitro* および *in vivo* において肝癌細胞特異的に発現させ得ることを報告している<sup>6)7)</sup>。さらに、suicide 遺伝子である単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ(HSV-*tk*) 遺伝子を肝癌細胞に導入し、ガンシクロビル投与を行えば、遺伝子導入肝癌細胞が *in vitro* および *in vivo* において、選択的に死滅することを報告している<sup>8)~11)</sup>。著者は、HSV-*tk* 遺伝子以外の suicide 遺伝子を用いる遺伝子治療の試みとして、大腸菌由来のシトシンデアミナーゼ(CD)遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて種々の腫瘍細胞に導入し、5-フルオロシトシン(5-FC)投与による抗腫瘍効果を *in vitro* および *in vivo* において検討した。

## 方 法

### 1) 組換えレトロウイルスベクターの構造

大腸菌由来の CD 遺伝子導入のために用いた、pCD2 レトロウイルスベクター<sup>12)</sup>の構造を Fig. 1 に図示した。同ベクターは、5'末端側よりモノー株マウス肉腫ウイ

ルス由来の long terminal repeat(LTR), suicide 遺伝子である大腸菌由来の CD 遺伝子<sup>13)</sup>, 内因性プロモーターとして SV 40 初期プロモーター, ネオマイシン耐性を与える neomycin phosphotransferase 遺伝子<sup>14)</sup>, モロニー株マウス白血病ウイルス由来の LTR を含んでいる。本ベクター内の大腸菌由来 CD 遺伝子では、原核細胞における開始コドンである GTG が、真核細胞における開始コドンである ATG に変更されている。本ベクターでは、CD 遺伝子の発現は、5'末端側の LTR 内のエンハンサーおよびプロモーターによって制御されると考えられる。

### 2) 組換えレトロウイルスベクターの産生法

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  $\Psi$ 2 細胞<sup>15)</sup>を  $1 \times 10^4$  cells / cm<sup>2</sup> の密度で 60 mm 培養皿へまき、10%胎児牛血清(FCS), 100 unit / ml のペニシリンおよび 100  $\mu$ g / ml のストレプトマイシンを含む 5 ml の RPMI 1640 培養液を加え、37°C, 5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。翌日、pCD2 レトロウイルスプラスミドをリン酸カルシウム法<sup>16)</sup>により  $\Psi$ 2 細胞へ導入した。さらに2日間培養後、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、G 418 耐性細胞を培養増殖させた。G 418 耐性の  $\Psi$ 2 細胞より培養液中に放出されるレトロウイルスを回収し、0.45  $\mu$ m poresize filter(Nalgene)濾過後、-70°C に凍結保存し、組換えレトロウイルスベクターとして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

培養実験には、BALB / c マウス由来の附着性肝癌細胞である BNL 1 ME A. 7 R. 1 細胞<sup>17)</sup>, ラット由来の扁平上皮癌細胞である SCC 131 細胞, ラット由来の筋芽細胞である L 6 TG 細胞<sup>18)</sup>を用いた。

各種細胞の培養は、60 mm 培養皿に 10%FCS, 100 unit / ml のペニシリンおよび 100  $\mu$ g / ml のストレプトマイシンを含む 5 ml の RPMI 1640 培養液を加え、37°C, 5%CO<sub>2</sub> の条件下で行った。

レトロウイルスの感染法は、培養細胞に 8  $\mu$ g / ml の

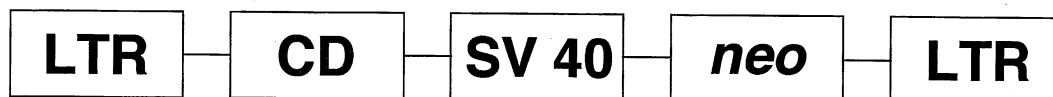


Fig. 1. Structure of the pCD2 retroviral vector.

The vector contains eukaryotic expression elements: (5') Molony murine sarcoma virus LTR, bacterial CD gene, SV40 early promoter, *neo* gene and Molony murine leukemia virus LTR (3'). Abbreviations used are as follows: LTR, long terminal repeat; CD, cytosine deaminase; SV40, simian virus 40; *neo*, neomycin phosphotransferase.

Polybrene(GIBCO)を含むウイルス液を種々の割合で添加し, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>下で3~6時間感染させた. ウィルス含有液を除き新鮮な培養液を加え2日間培養後, G 418を1mg/mlの濃度で添加し, G 418耐性細胞株を樹立した. それぞれの細胞株より無作為に2株のG 418耐性クローンを選択し, CD遺伝子導入細胞として以下の実験に用いた.

4) *in vitro*における5-FCおよび5-フルオロウラシル(5-FU)に対する感受性の検討

各種細胞株の5-FC(Sigma)および5-FU(協和発酵)に対する感受性は, MTTアッセイ<sup>19)</sup>を用いて検討した. 培養細胞を1×10<sup>3</sup>cells/cm<sup>2</sup>の密度で24-well培養皿に撒き, 5-FCあるいは5-FUを種々の濃度で添加し, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>の条件で4日間培養した後に, 3-(4, 5-diethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)(Sigma)を0.5mg/mlの濃度で添加し, さらに3~4時間培養した後にMTTを含む培養液を除き, 1mlのジメチルスルホキシドを加え10分間ゆっくりと振盪し, 各wellの540nmにおける吸光度をmicroplate reader(Corona)により測定した. 対照波長としては630nmを用い, 培養液のみにMTTを加えたwellを吸光度0とした. すべての実験を4回施行し, 細胞生存率は以下のように算定した.

細胞生存率(%)=(5-FCあるいは5-FU添加時の吸光度/5-FCおよび5-FU非添加時の吸光度)×100

5) *in vitro*におけるbystander effectの検討

CD遺伝子導入細胞をそれぞれの親株細胞に種々の割合で混合し, 細胞が互いに接触する高細胞密度(1×10<sup>4</sup>cells/cm<sup>2</sup>)あるいは, 細胞が全く接触しない低細胞密度(1×10<sup>3</sup>cells/cm<sup>2</sup>)で24-well培養皿にまき, 20μg/mlの5-FC存在下で4日間培養した後に前述のMTTアッセイを行い, 下記の様に細胞生存率を算定した.

細胞生存率(%)=(親株細胞とCD遺伝子導入細胞の混合培養時の吸光度/親株細胞のみ培養時の吸光度)×100

6) 培養液の5-FU濃度の測定法および殺細胞能の検討

CD遺伝子導入細胞を1×10<sup>4</sup>cells/cm<sup>2</sup>の密度で60mm培養皿にまき, 20μg/mlの5-FC存在下で2~4日間培養後に培養液を回収し, 0.45μm poresize filter濾過後, シリカゲルカラムを用いた高速液体クロマトグラフィ<sup>20)</sup>により, 培養上清中の5-FU濃度を測定した.

さらに, 上記培養液の細胞障害能を検討するために, 親株細胞を1×10<sup>3</sup>cells/cm<sup>2</sup>の密度で24-well培養皿

にまき, 上記培養液を50%の割合で混合した培養液中で4日間培養した後に, MTTアッセイを用いて下記の様に細胞生存率を算定した.

細胞生存率(%)=(混合培養液で培養した際の吸光度/新鮮培養液のみで培養した際の吸光度)×100

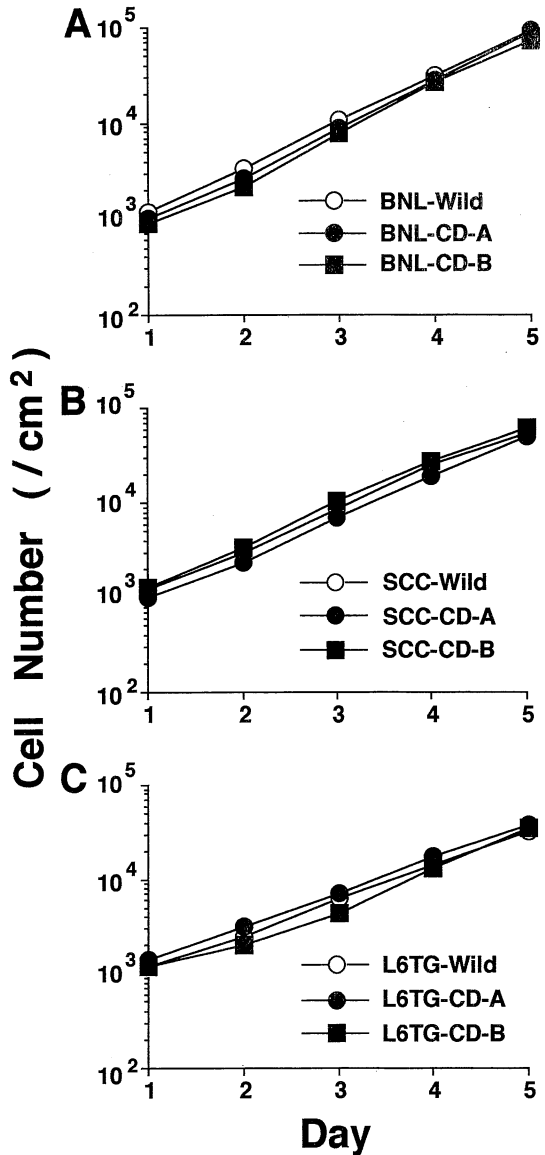


Fig. 2. Proliferation of pCD2 retroviral-infected and uninfected murine hepatocellular carcinoma cells (A), rat squamous cell carcinoma cells (B) and rat myoblastoma cells (C).

7) *in vivo* における抗腫瘍効果の検討

CD 遺伝子導入 BNL 1 ME A. 7 R. 1 マウス肝癌細胞を種々の割合で親株細胞と混合後, BALB/c マウスの側腹部皮下に  $1 \times 10^6$  cells / 0.1 ml 接種し, 2 日後より 500 mg / kg の 5-FC を 1 日 1 回, 14 日間腹腔内に投与し, 皮下肝癌発生の有無を 90 日間観察した. 皮下腫

瘍径が 10 mm 以上に達したマウスは, 観察期間終了前に安楽死させた.

結 果

1) pCD2 レトロウイルス感染による細胞増殖能への影響

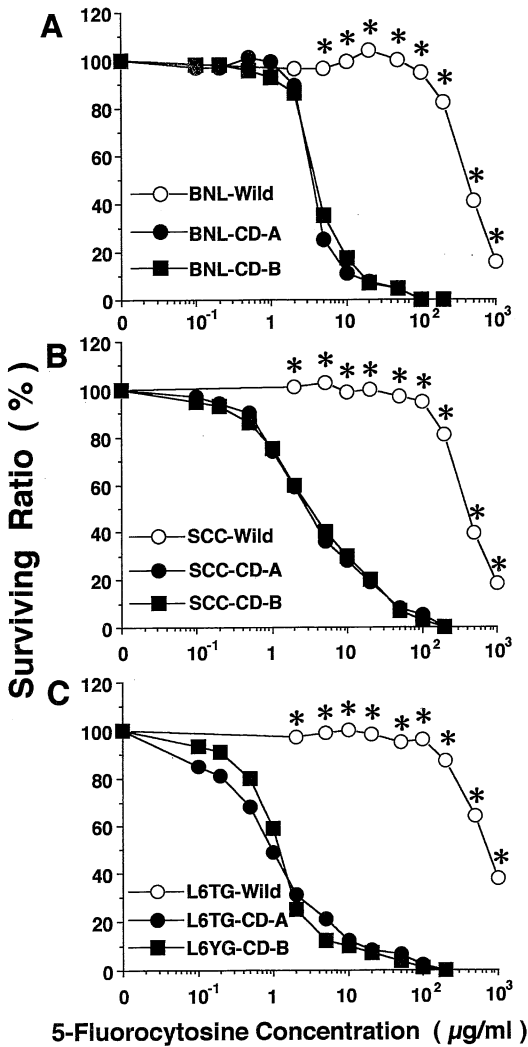


Fig. 3. Sensitivity to 5-FC of pCD2 retroviral-infected and uninfected murine hepatocellular carcinoma cells (A), rat squamous cell carcinoma cells (B) and rat myoblastoma cells (C).

The symbol "\*" represents that values of retroviral-uninfected parental cells are significantly different from those of retroviral-infected cells at  $P < 0.01$  by Student's *t* test.

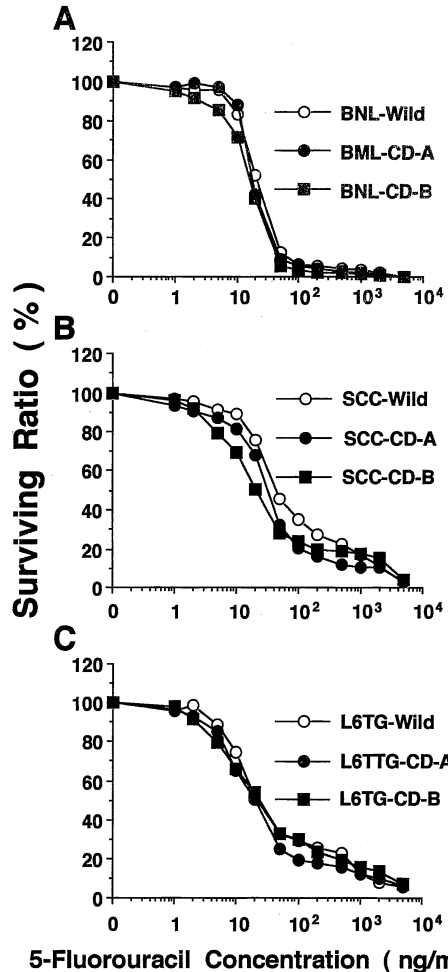


Fig. 4. Sensitivity to 5-FU of pCD2 retroviral-infected and uninfected murine hepatocellular carcinoma cells (A), rat squamous cell carcinoma cells (B) and rat myoblastoma cells (C).

pCD 2 レトロウイルスベクターによって CD 遺伝子が導入されたマウス肝癌細胞である BNL-CD-A および BNL-CD-B と親株肝癌細胞を、 $1 \times 10^3$  cells /  $\text{cm}^2$  の密

度で 24-well 培養皿にまき、トリパンブルー染色法<sup>21)</sup>を用いて生細胞数を経時的に算定した。pCD 2 レトロウイルス感染肝癌細胞と親株細胞の増殖能には全く差違を認

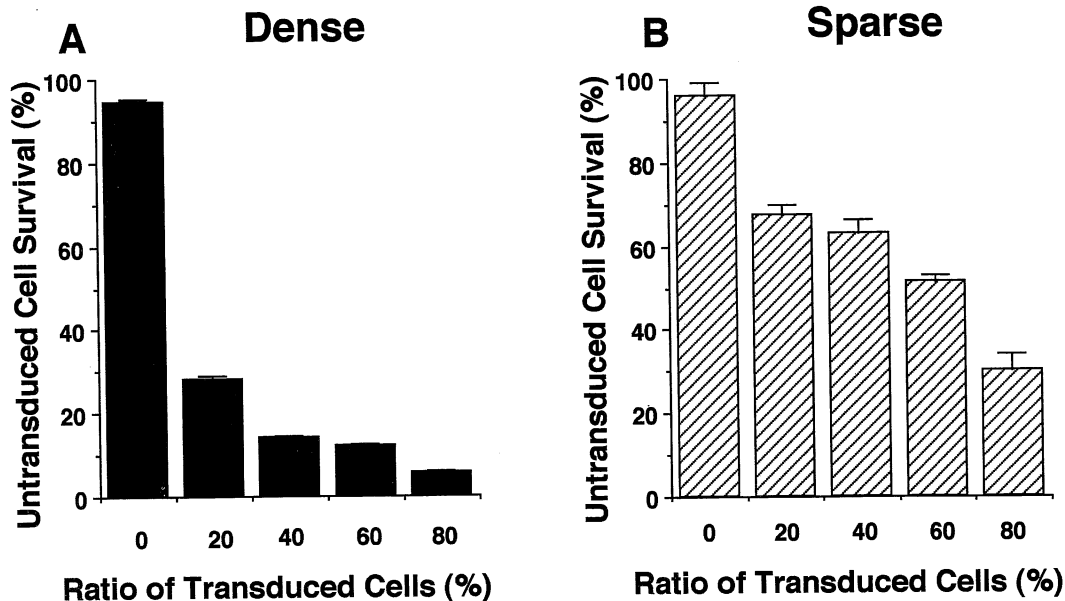


Fig. 5. Cytotoxic effect of CD gene-transduced hepatocellular carcinoma cells on untransduced parental cells in the presence of 5-FC at a high cell population (A) and low cell population (B).

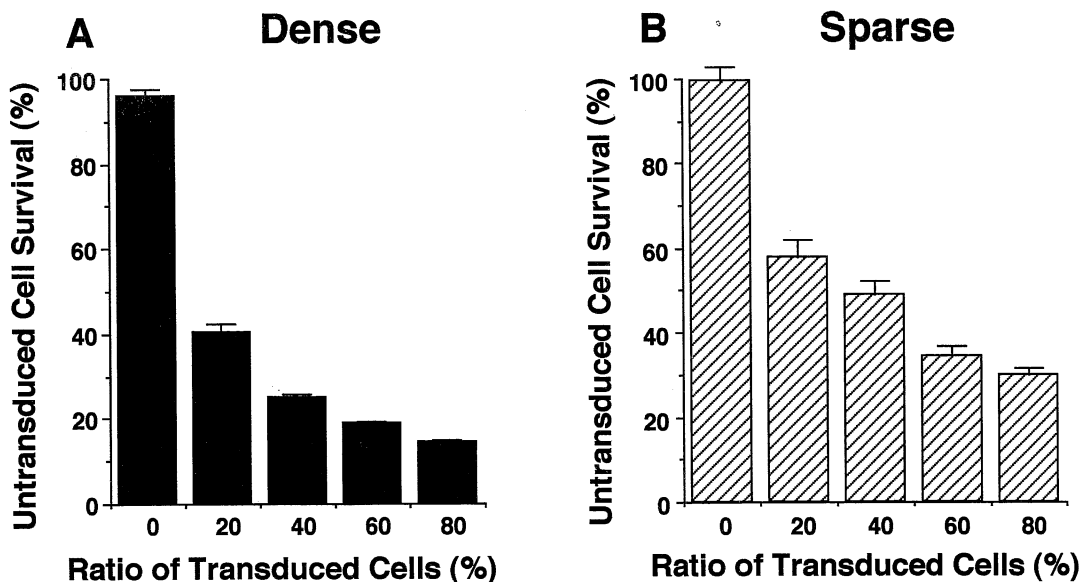


Fig. 6. Cytotoxic effect of CD gene-transduced squamous cell carcinoma cells on untransduced parental cells in the presence of 5-FC at a high cell population (A) and low cell population (B).

めず、倍加時間は全クローンとも約15時間であった (Fig. 2 A).

ラット扁平上皮癌細胞を用いて同様の検討を行ったところ、pCD2レトロウイルス感染ラット扁平上皮癌細胞である SCC-CD-A および SCC-CD-B と親株細胞の増殖能には有意差を認めず、倍加時間は約17時間であった (Fig. 2 B).

さらに、ラット筋芽細胞を用いた検討においても、pCD2レトロウイルス感染ラット筋芽細胞である L6 TG-CD-A および L6 TG-CD-B と親株細胞の増殖能には有意差を認めず、倍加時間は約20時間であった (Fig. 2 C).

2) pCD2レトロウイルス感染細胞の *in vitro* における5-FCに対する感受性

pCD2レトロウイルス感染マウス肝癌細胞である BNL-CD-A および BNL-CD-B は共に、5-FC に濃度依存性に感受性を示し、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の5-FC添加によりすべての細胞が死滅し、50%増殖阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) は約3.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。一方、親株肝癌細胞は5-FCに耐性を示し、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の5-FCを添加しても細胞増殖能に影響は認められず、 $\text{IC}_{50}$  は約420  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であり、

pCD2レトロウイルス感染肝癌細胞と親株細胞の5-FCに対する感受性を  $\text{IC}_{50}$  で比較すると約120倍の差を認めた (Fig. 3 A).

また、pCD2レトロウイルス感染ラット扁平上皮癌細胞である SCC-CD-A と SCC-CD-B も濃度依存性に5-FCに感受性を示し、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の5-FC添加により細胞は完全に死滅し、 $\text{IC}_{50}$  は約3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。一方、親株扁平上皮癌細胞は5-FCに耐性を示し、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以下の5-FC濃度では細胞生存率に影響は無く、 $\text{IC}_{50}$  は約400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であり、両者の5-FCに対する感受性には約130倍の差を認めた (Fig. 3 B).

さらに、ラット筋芽細胞に関しても同様の検討を行ったところ、pCD2レトロウイルス感染筋芽細胞である L6 TG-CD-A と L6 TG-CD-B は濃度依存性に5-FCに感受性を示し、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の5-FC添加により全ての細胞が死滅し、 $\text{IC}_{50}$  は約1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。一方、親株筋芽細胞は5-FCに耐性を示し、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の5-FC存在下でも細胞増殖能に影響は認められず、 $\text{IC}_{50}$  は約700  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であり、両者の5-FCに対する感受性には約460倍の差を認めた (Fig. 3 C).

3) pCD2レトロウイルス感染細胞の *in vitro* におけ

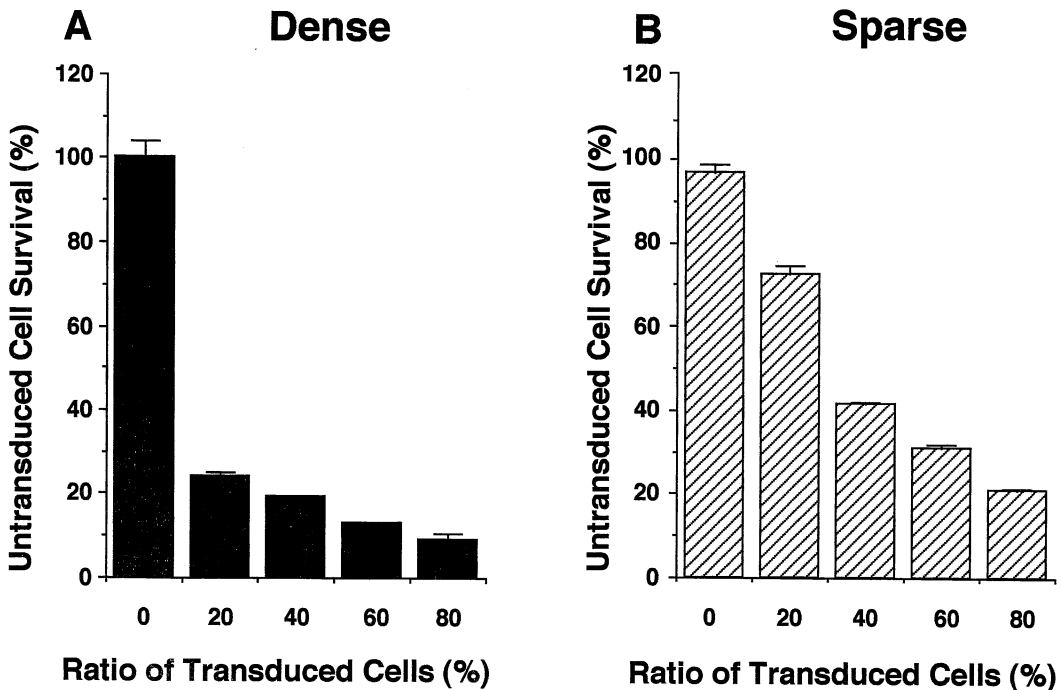


Fig. 7. Cytotoxic effect of CD gene-transduced myoblastoma cells on untransduced parental cells in the presence of 5-FC at a high cell population (A) and low cell population (B).

る 5-FU に対する感受性

次に、5-FU に対する感受性を検討したところ、pCD2 レトロウイルス感染マウス肝癌細胞と親株肝癌細胞は共に濃度依存性に 5-FU に感受性を示し、 $IC_{50}$  は約 20 ng/ml であり、CD 遺伝子導入肝癌細胞と親株細胞の 5-FU に対する感受性には全く有意差を認めなかった (Fig. 4 A)。ラット扁平上皮癌細胞を用いた検討においても、pCD2 レトロウイルス感染細胞と親株細胞の 5-FU に対する感受性には有意差を認めず、 $IC_{50}$  は約 40 ng/ml であった (Fig. 4 B)。さらに、pCD2 レトロウイルス感染ラット筋芽細胞と親株細胞の 5-FU に対する感受性にも有意差を認めず、 $IC_{50}$  は約 30 ng/ml であった (Fig. 4 C)。

マウス肝癌細胞、ラット扁平上皮癌細胞およびラット筋芽細胞の pCD2 レトロウイルス感染細胞として確立したそれぞれの細胞株の A および B のクローン間には、5-FC および 5-FU に対する感受性に全く差を認めなかったため、A のクローンをそれぞれの細胞株における CD 遺伝子導入細胞として、以下の実験に使用した。

4) CD 遺伝子導入と 5-FC による親株細胞への bystander effect

次に、CD 遺伝子導入細胞の 5-FC 存在下における親株細胞への障害能、いわゆる bystander effect を検討した。CD 遺伝子導入マウス肝癌細胞を種々の割合で親株細胞に混合し、細胞が互いに接触する高細胞密度でまき、親株細胞の増殖には全く影響を与えない 20  $\mu$ g/ml の 5-FC 存在下で 4 日間培養したところ、CD 遺伝子導入肝

癌細胞は 5-FC 存在下で親株細胞に著明な細胞障害を示し、20%、40%、60%、80% の割合で親株細胞に混合すると、それぞれ約 70%、85%、90%、95% の親株細胞が死滅した (Fig. 5 A)。さらに、細胞が互いに接触しない低細胞密度においても、CD 遺伝子導入肝癌細胞は 5-FC 存在下で親株細胞に著明な障害を示し、20%、40%、60%、80% の割合で親株細胞に混合培養すると、それぞれ約 30%、40%、50%、70% の親株細胞が死滅した (Fig. 5 B)。

ラット扁平上皮癌細胞を用いて同様の検討を行ったところ、CD 遺伝子導入細胞は 5-FC 存在下で親株細胞に著明な障害を示し、20%、40%、60%、80% の割合で混合培養すると、高細胞密度では約 60%、75%、80%、85% (Fig. 6 A)、低細胞密度では約 40%、50%、65%、70% (Fig. 6 B) の親株細胞が死滅した。

CD 遺伝子導入ラット筋芽細胞も 5-FC 存在下で親株細胞に著明な障害を示し、20%、40%、60%、80% の割合で親株細胞に混合すると、高細胞密度では約 75%、80%、85%、90% (Fig. 7 A)、低細胞密度では約 30%、60%、70%、80% (Fig. 7 B) の親株細胞が死滅した。

5) CD 遺伝子導入細胞よりの 5-FU 産生

CD 遺伝子導入細胞が 5-FC より 5-FU を産生しているかを検討するために、CD 遺伝子導入細胞を 20  $\mu$ g/ml の 5-FC 存在下で培養し、培養液中の 5-FU 濃度を測定した (Table 1)。CD 遺伝子導入マウス肝癌細胞を 5-FC 存在下に培養すると、培養液中の平均 5-FU 濃度は 2 日目には 584 ng/ml、3 日目には 1,028 ng/ml、4 日

Table 1. 5-FU production by CD gene-transduced cells

Cell	5-FU Concentrations (ng/ml)					
	Day 2		Day 3		Day 4	
	5-FC (+)	5-FC (-)	5-FC (+)	5-FC (-)	5-FC (+)	5-FC (-)
HCC	584 $\pm$ 171	ND	1,028 $\pm$ 304	ND	1,370 $\pm$ 354	ND
SCC	845 $\pm$ 371	ND	1,297 $\pm$ 453	ND	2,017 $\pm$ 696	ND
Myoblast	2,383 $\pm$ 911	ND	3,473 $\pm$ 1,276	ND	5,240 $\pm$ 2,552	ND

HCC and SCC represent hepatocellular carcinoma and squamous cell carcinoma, respectively. ND, not detected.

Table 2. Cytotoxicity of media conditioned by CD gene-transduced cells and 5-FC

Cell	Survival Rate of Parental Cells (%)					
	2 day-old CM		3 day-old CM		4 day-old CM	
	Experimental	Anticipated	Experimental	Anticipated	Experimental	Anticipated
HCC	8.6 $\pm$ 5.6	8 $\pm$ 4	8.1 $\pm$ 6.2	6 $\pm$ 4	6.9 $\pm$ 3.8	5 $\pm$ 3
SCC	15.9 $\pm$ 3.8	17 $\pm$ 4	14.8 $\pm$ 3.5	14 $\pm$ 3	12.8 $\pm$ 3.1	12 $\pm$ 4
Myoblast	18.0 $\pm$ 3.7	20 $\pm$ 4	15.9 $\pm$ 2.9	15 $\pm$ 4	11.5 $\pm$ 2.6	9 $\pm$ 4

HCC and SCC represent hepatocellular carcinoma and squamous cell carcinoma, respectively. CM, conditioned media

目には1,370 ng/mlに達した。CD 遺伝子導入ラット扁平上皮癌細胞の場合には、培養液中の5-FU濃度は2日目には845 ng/ml, 3日目には1,297 ng/ml, 4日目には2,017 ng/mlであった。さらに、CD 遺伝子導入ラット筋芽細胞では、2日目には2,383 ng/ml, 3日目には3,473 ng/ml, 4日目には5,240 ng/ml, の5-FUが培養液中に検出された。しかし、親株の肝癌細胞、扁平上皮癌細胞、筋芽細胞に同濃度の5-FCを添加し2~4日間培養を行っても、培養液中には5-FUは検出されなかった。

#### 6) 5-FU 含有培養液の殺細胞能

次に、上記の5-FU含有培養液による親株細胞への障害能を検討した(Table 2)。CD 遺伝子導入マウス肝癌細胞を20 µg/mlの5-FC存在下に、2日、3日および4日間培養した培養液を新鮮な培養液で50%に希釈し、親株細胞に添加し4日間培養すると、親株細胞は著明な障害を被り、生存率はそれぞれ8.6%, 8.1%, 6.9%のみであった。これらの培養液に含まれる5-FU濃度は、Table 1に示した如くすでに判明しているため、Fig. 4Aに示した親株肝癌細胞の5-FUに対する感受性より、これらの培養液の細胞障害能を予測したところ、親株細胞の生存率は8%, 6%, 5%となり、5-FU含有培養液の親株細胞に対する障害能の実験値と予測値は極めてよく一致していた。

CD 遺伝子導入ラット扁平上皮癌細胞を5-FC存在下で培養した培養液を用いて同様の検討を行ったところ、2日、3日および4日間培養後の培養液は親株扁平上皮癌細胞に著明な障害を示し、親株細胞の生存率は15.9%, 14.8%, 12.8%であった。これらの培養液の殺細胞能を親株細胞の5-FUに対する感受性より予測すると、それぞれ17%, 14%, 12%となり、実験値と予測値はやはり一致していた。

さらに、CD 遺伝子導入ラット筋芽細胞の培養液を用いた検討においても、2日、3日および4日間培養後の培養液の親株細胞に対する殺細胞能は、実験値が18.0%, 15.9%, 11.5%, 予測値が20%, 15%, 9%と一致していた。

#### 7) CD 遺伝子導入肝癌細胞と5-FC投与による抗腫瘍効果

CD 遺伝子導入マウス肝癌細胞を種々の割合で親株細胞に混合した後、 $1 \times 10^6$ 個の細胞をBALB/cマウスの側腹部皮下に接種し、2日後より5-FCの腹腔内投与を14日間行い、皮下腫瘍形成の有無を観察した(Table 3)。この際、CD 遺伝子導入肝癌細胞を種々の割合で親株細胞に混合しても、5-FCを投与しない場合には、接種後30日以内に皮下腫瘍の形成を認めた。また、親株肝癌細胞のみを接種し5-FC投与を行った場合にも、やはり30日以内に全てのマウスに腫瘍形成を認めた。しかし、CD 遺伝子導入肝癌細胞を親株細胞に混合し5-FCを投与すると腫瘍形成能は抑制され、2%および5%の割合で親株細胞に混合した場合には、90日間の観察期間中に60%のマウスに腫瘍形成をみるのみであった。さらに、CD 遺伝子導入細胞を10%および20%の割合で親株細胞に混合すると、腫瘍形成率はそれぞれ40%および20%と有意に抑制された。

## 考 察

近年の分子生物学のめ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研究は急速な発展を遂げ、先天性の遺伝子病にとどまらず癌もまた遺伝子治療の対象となってきている。癌に対する遺伝子治療法は、担癌患者より癌細胞や腫瘍浸潤リンパ球を採取し、種々のサイトカイン遺伝子を導入した後に再び同一患者へ移植して戻すことより、生体の腫瘍免疫能を増強させる間

Table 3. Suppression of tumorigenicity by CD gene-transduced cells and 5-FC treatment

Inoculated Cells			Tumor Incidence	
Parental	:	CD transduced	No. of mice bearing tumor / No. of mice tested (%)	
			5-FC (-)	5-FC (+)
100	:	0	10/10 (100%)	10/10 (100%)
98	:	2	10/10 (100%)	6/10 (60%)
95	:	5	10/10 (100%)	6/10 (60%)
90	:	10	10/10 (100%)	4/10 (40%)*
80	:	20	10/10 (100%)	2/10 (20%)*
60	:	40	10/10 (100%)	2/10 (20%)*

\* Significantly different from the result without 5-FC treatment at  $P < 0.01$  by  $\chi^2$  test.



接的な癌に対する遺伝子治療法<sup>22)23)</sup>と、腫瘍細胞の増殖を阻止するために腫瘍抑制遺伝子を導入したり、腫瘍細胞を死滅させるために細胞障害能を有する遺伝子を導入する直接的な癌に対する遺伝子治療法<sup>24)</sup>に分けられる。直接的な癌に対する遺伝子治療法の一法として、nontoxic なプロドラッグを toxic なドラッグに変換する suicide 遺伝子を癌細胞に導入発現させ、プロドラッグ

クを投与する方法<sup>25)~27)</sup>が検討されている。特に, suicide 遺伝子として HSV-*tk* 遺伝子, プロドラッグとしてガンシクロビルを用いた遺伝子治療は, 種々の癌に対して基礎的研究が積極的に行われており, 脳腫瘍や卵巣癌に対する臨床試験がすでに欧米において開始されている。

当教室では, *in vivo* 遺伝子導入法を用いた肝癌に対する遺伝子治療の確立を目指して基礎的研究を重ねており,

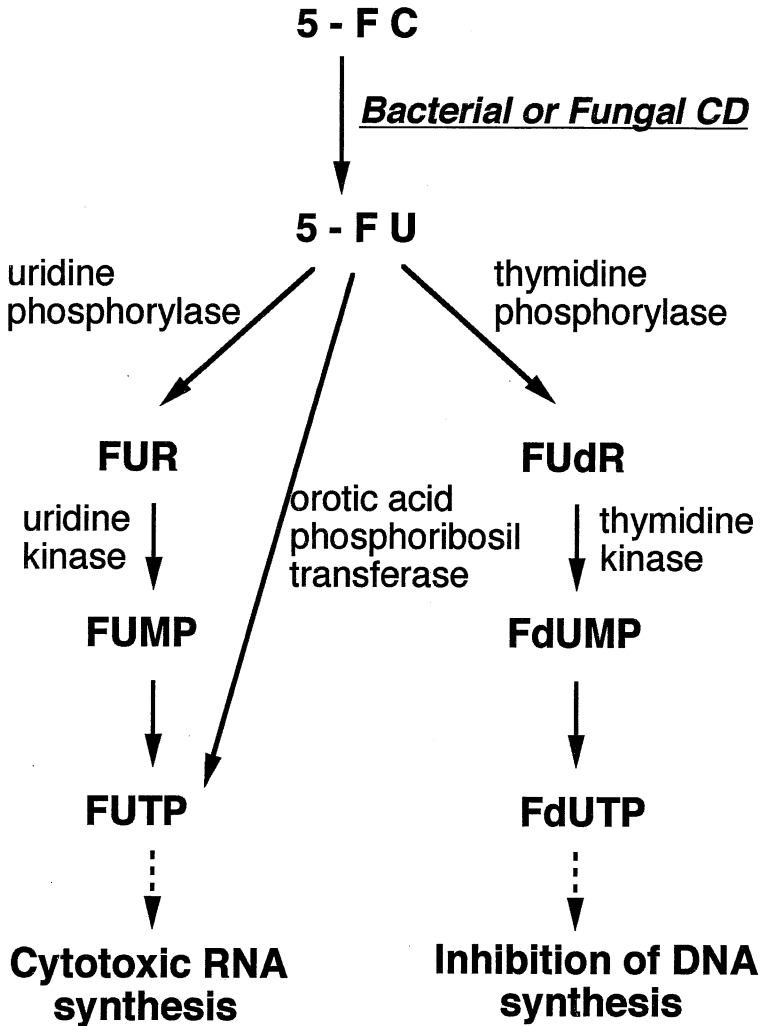


Fig. 8. Mechanism of cytotoxicity induced by the bacterial or fungal CD gene expression and 5-FC treatment.

Abbreviations used are as follows: 5-FC, 5-fluorocytosine; CD, cytosine deaminase; 5-FU, 5-fluorouracil; FUR, 5-fluorouridine; FUMP, 5-fluorouridine monophosphate; FUTP, 5-fluorouridine triphosphate; FUdR, 5-fluorodeoxyuridine; FdUMP, 5-fluorodeoxyuridine monophosphate; FdUTP, 5-fluorodeoxyuridine triphosphate.

アルブミン遺伝子のプロモーターを内因性プロモーターとするレトロウイルスベクターを用いて、レポーター遺伝子である大腸菌の $\beta$ -galactosidase 遺伝子を *in vivo* において導入すれば、骨髄細胞や正常肝細胞に影響することなく、肝癌細胞特異的にレポーター遺伝子の発現を誘導し得ることを報告している<sup>6)7)</sup>。また、suicide 遺伝子として HSV-*tk* 遺伝子を導入し、プロドラッグとしてガンシクロビルやアシクロビルを投与すると、肝癌やグリオーマに対する細胞障害や抗腫瘍効果を誘導し得ることを報告している<sup>8)10)28)</sup>。さらに、アルブミン遺伝子のプロモーターの制御下に HSV-*tk* 遺伝子が発現される様に構築したレトロウイルスベクターを用いて、遺伝子導入を行いプロドラッグを投与すれば、肝癌細胞を選択的に障害し得ることも確認している<sup>9)11)</sup>。著者は、大腸菌由来の CD 遺伝子が、HSV-*tk* 遺伝子同様に遺伝子治療に有望な suicide 遺伝子となり得るかを検討するために、CD 遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて種々の培養細胞に導入し、プロドラッグとして 5-FC の投与を行い、各種細胞株への細胞障害能さらに抗腫瘍効果を検討した。

CD 遺伝子発現と 5-FC 投与による細胞障害の機序を Fig. 8 に示した。CD は多くの真菌や細菌に存在する酵素であり、低栄養などのストレス下においてシトシンを脱アミノ化しウラシルに変換する<sup>29)30)</sup>。哺乳類細胞へ CD 遺伝子を導入し 5-FC 投与を行うと、CD は 5-FC を同様に脱アミノ化し 5-FU に変換する。5-FU は腺癌などに広く用いられている代表的な抗癌剤であり、哺乳類細胞由来の種々の酵素により、5-フルオロウリジン三リン酸と 5-フルオロデオキシウリジン三リン酸に代謝され、RNA 合成と DNA 合成の双方を阻害することにより細胞障害を示す。一方、哺乳類細胞には CD は存在しないため、CD 遺伝子が導入されていない細胞では、5-FC は 5-FU に変換されないため細胞は障害を被らない。さらに、5-FC は抗真菌剤として従来より広く臨床応用されている薬剤であり、臨床投与における薬物動態などに関しては多くの情報が集積されており、臨床面における安全性も確立されている。

本研究において著者は、大腸菌由来の CD 遺伝子がマウスモロニー株肉腫ウイルス由来の LTR 内のエンハンサーおよびプロモーターによって発現されるように構築された pCD2 レトロウイルスベクターを用いて、肝癌細胞をはじめとする種々の細胞株へ CD 遺伝子の導入を行い、プロドラッグである 5-FC に対する感受性を検討した。レトロウイルスベクターを用いた CD 遺伝子の導入自体には細胞障害性は認められず、CD 遺伝子導入細胞と親株細胞の増殖能には全く差異を認めなかった。しか

し、CD 遺伝子導入細胞は 5-FC 投与により著明な細胞障害を被り、 $IC_{50}$  は  $1.5 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 3.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  であり、親株細胞と比較すると 5-FC に対する感受性には約 120 倍～460 倍の差を認めた。5-FC は抗真菌剤として臨床的には通常経口投与されているが、常用量を経口投与した際の血中濃度は、腎機能が正常の患者では  $60 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上に維持されることが報告されている<sup>31)</sup>。今回の検討により、この 5-FC 濃度は種々の CD 導入細胞を 95% 以上死滅させるが、CD 遺伝子が導入されていない親株細胞には全く障害を与えない濃度であることが判明した。以上より、CD 遺伝子を癌細胞に導入し 5-FC 投与を行えば、CD 遺伝子が導入されていない正常細胞に影響することなく、CD 遺伝子が導入された癌細胞のみを死滅させ得ることが示唆された。また、CD 遺伝子導入細胞と親株細胞の 5-FU に対する感受性には全く差を認めなかったことより、CD 遺伝子の導入を行っても 5-FU に対する感受性は変化しないことが示された。

現在米国において行われている遺伝子治療の臨床治験では、嚢胞性線維症を除き、全例において組換えレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入が行われている。レトロウイルスは、増殖期の細胞にのみ感染し、静止期にある細胞には感染しないという性質を有している<sup>32)</sup>。癌は静止期にある正常組織内に発生した増殖能の高い細胞の集団と考えられるので、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法は、癌細胞に特異的な遺伝子導入法と考えられる。また、suicide 遺伝子導入とプロドラッグ投与により細胞障害が誘導される機序は、suicide 遺伝子産物によりプロドラッグから変換されたドラッグが DNA および RNA 合成を阻害することによるので、増殖期にある細胞が主に障害を被ると考えられる。したがって、レトロウイルスベクターを用いた suicide 遺伝子導入法は、癌細胞に選択的な遺伝子治療法として期待される。

ところで、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法では遺伝子導入効率が低いことが指摘されており、標的とする全ての癌細胞への遺伝子導入は不可能と考えられる。しかし、HSV-*tk* 遺伝子とガンシクロビルの組み合わせによる遺伝子治療の場合には、HSV-*tk* 遺伝子導入細胞の近傍に存在する遺伝子非導入細胞も障害を被る、bystander effect と呼ばれる現象が起こることが報告されている<sup>33)34)</sup>。この系における bystander effect の詳細な機序は未だ不明であるが、HSV-*tk* によりリン酸化されたガンシクロビルのリン酸化物は細胞膜を通過しないため<sup>35)</sup>、これらのリン酸化物が細胞間接合を構成する gap junction<sup>36)37)</sup> を通じて近接細胞へ移動し、HSV-

tk 遺伝子が導入されていない細胞を障害すると考えられている<sup>38)~40)</sup>。著者らの検討においても、HSV-tk 遺伝子導入細胞と親株細胞を細胞同志が互いに接触する高細胞密度で培養し、ガンシクロビルを添加した場合には、強力な bystander effect を誘導し得たが、細胞が接触しない低細胞密度では、極めて弱い bystander effect を誘導し得たのみであった<sup>10)</sup>。以上より、HSV-tk 遺伝子とガンシクロビルの組み合わせによる bystander effect には、細胞接触が重要な役割を演じていると考えられる。現在の遺伝子導入技術では、標的とする全ての癌細胞へ遺伝子を導入することは不可能であり、bystander effect の存在は癌に対する効果的な遺伝子治療を行う上で不可欠と考えられる。

ところで CD 遺伝子と 5-FC を用いる遺伝子治療に関しては、大腸癌細胞および線維肉腫細胞に CD 遺伝子を導入し 5-FC 投与を行うと、遺伝子導入細胞が *in vitro* および *in vivo* において障害されることが報告されており<sup>41)42)</sup>、著者らも、CD 遺伝子が導入された肝癌細胞が、5-FC に感受性を示すことを報告している<sup>43)</sup>。最近、Huber ら<sup>44)</sup>は、CD 遺伝子と 5-FC の組み合わせにおいても bystander effect が誘導されることを指摘し、その機序は、CD 遺伝子導入細胞において 5-FC から産生される 5-FU が、細胞外に放出された後に親株細胞に侵入することによると推測している。本研究では、CD 遺伝子と 5-FC による bystander effect には細胞接触は必要ではなく、細胞接触のない低細胞密度においても強力な bystander effect が誘導されることが示された。さらに、CD 遺伝子導入細胞を 5-FC 存在下に培養すると、細胞障害を十分に示し得る濃度の 5-FU が培養液中に放出され、これらの培養液による親株細胞への細胞障害能は、培養液に含まれる 5-FU 濃度から予測した細胞障害能に一致していた。以上より、CD 遺伝子と 5-FC の組み合わせによる bystander effect は、5-FC 存在下で CD 遺伝子導入細胞より産生される 5-FU によって惹起されることが示唆された。HSV-tk 遺伝子とガンシクロビルによる bystander effect には細胞接触が必要であるが、CD 遺伝子と 5-FC の場合には細胞接触は必要でないため、遺伝子導入細胞の近傍に存在する癌細胞により強力な bystander effect を誘導し得ると考えられる。さらに重要なことは、CD 遺伝子と 5-FC による bystander effect は、*in vitro* のみでなく *in vivo* においても誘導され、CD 遺伝子導入肝癌細胞をわずか 2% の割合で親株肝癌細胞に混合し 5-FC 投与を行うと、肝癌の発生率は 60% に低下し、さらに 10% の割合で混合すると、腫瘍発生率は 40% と有意に抑制された。以上より、標的とする癌内の

少数の癌細胞に CD 遺伝子を導入し得れば、有効な抗腫瘍効果を誘導し得ることが示唆された。

現在一般的に試みられている癌に対する遺伝子治療は、担癌患者より癌細胞や腫瘍浸潤リンパ球を採取し、*ex vivo* において遺伝子を導入した後に再び同一患者に移植して戻す方法である。*ex vivo* 遺伝子導入法は、遺伝子導入のための標的細胞採取に外科的手技を要し、臨床応用が容易な方法とは言いがたい。特に肝癌患者においては、基礎疾患として重篤な肝硬変を合併している症例が大多数を占めており<sup>45)46)</sup>、標的細胞の採取が困難な場合が多いと考えられる。効率的な *in vivo* 遺伝子導入法が確立されれば、癌に対する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。現在の遺伝子導入技術では、*in vivo* における遺伝子導入効率はずしも満足できるものではないが、当教室では遺伝子導入効率を上昇させるために、レトロウイルスベクターに種々の改良を加えており、これらの改良ベクターを用いると皮下肝癌の 50% 以上の細胞に遺伝子導入が可能であった。したがって、これらの改良レトロウイルスベクターを用いた CD 遺伝子導入と 5-FC 投与は、肝癌をはじめとする種々の癌に対する有望な遺伝子治療法になり得ると期待される。

## 結 語

suicide 遺伝子を用いた癌に対する遺伝子治療の基礎的研究として、大腸菌由来の CD 遺伝子がモロニー株マウス肉腫ウイルス由来の LTR 内のエンハンサーおよびプロモーターにより発現される pCD2 レトロウイルスベクターを用いて、種々の細胞株へ CD 遺伝子を導入し、プロドラッグとして 5-FC の投与を行い、*in vitro* における細胞障害能および *in vivo* における抗腫瘍効果を検討し、以下のごとき結果を得た。

1. pCD2 レトロウイルスをマウス肝癌細胞、ラット扁平上皮癌細胞、ラット筋芽細胞に感染させ CD 遺伝子を導入したが、CD 遺伝子導入細胞の増殖能は親株細胞に比し有意差を認めず、倍加時間はそれぞれ約 15 時間、17 時間、20 時間であった。
2. CD 遺伝子導入肝癌細胞、扁平上皮癌細胞、筋芽細胞は 5-FC に濃度依存性に感受性を示し、 $IC_{50}$  は約 3.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であったが、それぞれの親株細胞は 5-FC に耐性を示し、 $IC_{50}$  は約 420  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、700  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であり、CD 遺伝子導入細胞と親株細胞の 5-FC に対する感受性には約 120 倍、130 倍、460 倍の差違を認めた。
3. CD 遺伝子導入肝癌細胞、扁平上皮癌細胞、筋芽細

胞とそれぞれの親株細胞の5-FUに対する感受性には有意差を認めず、IC<sub>50</sub>はそれぞれ約20 ng/ml, 40 ng/ml, 30 ng/mlであった。

4. CD 遺伝子導入肝癌細胞, 扁平上皮癌細胞, 筋芽細胞をそれぞれの親株細胞に種々の割合で混合し, 親株細胞の増殖には全く影響しない低濃度の5-FC存在下で培養すると, 細胞が接触する高細胞密度条件下のみならず, 細胞が全く接触しない低細胞密度条件下においても, 親株細胞は著明な障害を被った。

5. CD 遺伝子導入肝癌細胞, 扁平上皮癌細胞, 筋芽細胞を低濃度の5-FC存在下で培養すると, 細胞障害を示し得る濃度の5-FUを培養液中に検出した。さらに, これらの培養液の親株細胞に対する殺細胞能は, 培養液中の5-FU濃度より予測した殺細胞能と一致していた。

6. CD 遺伝子導入肝癌細胞を2%の割合で親株肝癌細胞に混合し, マウス皮下に接種した後に5-FCを投与すると, 60%のマウスに皮下腫瘍の発生を認めたのみであった。さらに, CD 遺伝子導入細胞を10%の割合で混合すると, 腫瘍発生率は40%と有意に抑制され, 20%の割合で混合すると, 20%のマウスに腫瘍形成を認めたのみであった。

7. 大腸菌由来のCD 遺伝子と5-FCを用いた遺伝子治療は, *in vitro* および *in vivo* において強力な bystander effect を誘導し得たことより, 癌に対する有望な遺伝子治療法となり得ることが示唆された。

(本論文の要旨は, 第37回日本消化器病学会大会ワークショップ, 第54回日本癌学会総会において発表した。稿を終えるに臨み, 終始御懇篤なる御指導, 御校閲を賜った恩師辻井正学長ならびに福井 博教授に深甚の誠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く感謝いたします。

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, 本研究は文部省科学研究費一般研究(B)(課題番号07457141)および厚生省「難治性の肝疾患」調査研究班難病の治療分科会特定疾患調査研究分担研究費の援助を受けた。

## 文 献

- Varmus, H. : Science 267 : 1889, 1995.
- McGarrity, G. J. : Science 268 : 1261, 1995.
- Post, L. E. : Hum. Gene Ther. 5 : 1311, 1994.
- 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.
- 文部省学術審査議会特定領域推進分科会 : 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.
- Kuriyama, S., Yoshikawa, M., Ishizaka, S., Tsujii, T., Ikenaka, K., Morita, N. and Mikoshiba, K. : Cell Struct. Funct. 16 : 503, 1991.
- 中谷敏也 : 奈良医学雑誌 45 : 181, 1994.
- Kuriyama, S., Yoshikawa, M., Tominaga, K., Nakatani, T., Sakamoto, T., Fukui, H., Ikenaka, K. and Tsuji, T. : Int. Hepatol. Commun. 1 : 253, 1993.
- Kuriyama, S., Nakatani, T., Sakamoto, T., Masui, K., Tominaga, K., Yoshikawa, M., Fukui, H. and Tsujii, T. : Hepatology 19 : 881, 1994.
- Kuriyama, S., Nakatani, T., Masui, K., Sakamoto, T., Tominaga, K., Yoshikawa, M., Fukui, H., Ikenaka, K. and Tsujii, T. : Hepatology 22 : 1838, 1995.
- 阪本たけみ : 奈良医学雑誌 46 : 397, 1995.
- Mullen, C. A., Kilstrup, M. and Blaese, M. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 33, 1992.
- Danielsen, S., Kilstrup, M., Barilla, K., Jochimsen, B. and Neuhard, J. : Mol. Microbiol. 6 : 1335, 1992.
- Colbere - Garapin, F., Horodniceanu, F., Kourilsky, P. and Garapin, A. : J. Mol. Biol. 150 : 1, 1981.
- Mann, R., Mulligan, R. C. and Baltimore, D. : Cell 33 : 153, 1983.
- Chen, C. and Okayama, H. : Mol. Cell. Biol. 7 : 2745, 1987.
- Patek, P. Q., Collins, J. L. and Cohn, M. : Nature 276 : 510, 1978.
- Yaffe, D. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61 : 477, 1968.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. : Cancer Res. 47 : 936, 1987.
- 増池健年, 渡辺幾代, 武本宣教 : 薬学雑誌 105 : 1058, 1985.
- Mclimans, W. F., Davis, E. V. and Glover, F. L. : J. Immunol. 79 : 428, 1957.

- 22) Russel, S. J. : Immunol. Today 11 : 196, 1990.
- 23) Miller, A. R., McBride, W. H., Hunt, K. and Economou, J. S. : Ann. Surg. Oncol. 1 : 436, 1994.
- 24) Gutierrez, A. A., Lemoine, N. R. and Sikora, K. : Lancet 339 : 715, 1992.
- 25) Mullen, C. A. : Pharmac. Ther. 63 : 199, 1994.
- 26) Culver, K. W. : Clin. Chem. 40 : 510, 1994.
- 27) Connors T. A. : Gene Ther. 2 : 702, 1995.
- 28) Miyao, Y., Shimizu, K., Moriuchi, S., Yamada, M., Nakahira, K., Nakajima, K., Nakano, J., Kuriyama, S., Tsujii, T., Mikoshiba, K., Hayakawa, T. and Ikenaka, K. : J. Neurosci. Res. 36 : 472, 1993.
- 29) Kilstrup, M., Meng, L. M., Neuhard, J. and Nygaard, P. : J. Bacteriol. 171 : 2122, 1989.
- 30) Andersen, L., Kilstrup, M. and Neuhard, J. : Arch. Microbiol. 152 : 115, 1989.
- 31) Bennett, J. E., Dismukes, W. E. and Duma, R. J. : New Engl. J. Med. 301 : 126, 1979.
- 32) Miller, D. G., Adam, M. A. and Miller, A. D. : Mol. Cell. Biol. 10 : 4239, 1990.
- 33) Mooltes, F. L. : Cancer Res. 46 : 5276, 1986.
- 34) Culver, K. W., Ram, Z., Walbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E. H. and Blaese, R. M. : Science 256 : 1550, 1992.
- 35) Prisbe, E. J., Martin, J. C., McGee, D. P. C., Barker, M. F., Smee, D. F., Duke, A. E., Matthews, T. R. and Verheyden, J. P. H. : J. Med. Chem. 29 : 671, 1986.
- 36) Dermietzel, R., Hwang, T. K. and Spray, D. S. : Anat. Embryol. 182 : 517, 1990.
- 37) Bennett, M. V. and Verselis, V. K. : Semin. Cell Biol. 3 : 29, 1992.
- 38) Bi, W. L., Parysek, L. M., Warnick, R. and Stambrook, P. J. : Hum. Gene Ther. 4 : 725, 1993.
- 39) Freeman, S. M., Abboud, C. N., Whartenby, K. A., Packman, C. H., Koepf, D. S., Moolten, F. L. and Abraham, G. N. : Cancer Res. 53 : 5274, 1993.
- 40) Colombo, B. M., Benedetti, S., Ottolenghi, S., Mora, M., Pollo, B., Poli, G. and Finocchiaro, G. : Hum. Gene Ther. 6 : 763, 1995.
- 41) Huber, B. E., Austin, E. A., Good, S. S., Knick, V. C., Tibbels, S. and Richards, C. A. : Cancer Res. 53 : 4619, 1993.
- 42) Mullen, C. A., Coale, M. M., Lowe, R. and Blaese, R. M. : Cancer Res. 54 : 1503, 1994.
- 43) Kuriyama, S., Masui, K., Sakamoto, T., Nakatani, T., Tominaga, K., Fukui, H., Ikenaka, K., Mullen, C. A. and Tsujii, T. : Int. Hepatol. Commun. 4 : 72, 1995.
- 44) Huber, B. E., Austin, E. A., Richards, C. A., Davis, S. T. and Good, S. S. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 8302, 1994.
- 45) Kew, M. C. : Hepatology 1 : 366, 1981.
- 46) Brotodihardjo, A. E., Tait, N., Weltmas, M. D., Liddle, C., Little, J. M. and Farrell, G. C. : Med. J. Aust. 161 : 433, 1994.