慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Prostate-specific membrane antigen (PSMA) promoter/enhancerを用いた組織特異的自殺遺伝子治療
Sub Title	
Author	内田, 厚(Uchida, Atsushi) 村井, 勝(Murai, Masaru)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.2 (2003. 6) ,p.T85- T100
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030601-0085

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

慶應医学・80(2)：T85～T100，2003

学位論文

Prostate-specific membrane antigen (PSMA) promoter/enhancerを用いた組織特異的自殺遺伝子治療

慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室
（指導：村井　勝教授）
内田　厚（うちだ　あつし）

（平成14年11月21日受付）

Key Word： suicide gene therapy, PSMA enhancer, cytosine deaminase, prostate cancer, *in vivo*

米国における統計によると，前立腺癌は男性の全悪性新生物中，罹患率1位，死亡率2位である．近年，本邦においても前立腺癌は著明な増加傾向にあり[1]，黒石らによると2015年の前立腺癌死亡数は1995年の2.93倍に増加するであろうと予測されている[2]．

前立腺癌患者に対する内分泌療法はHugginsらが報告して以来[3]，全身的な治療法として広く普及している．しかし骨転移を伴う前立腺癌においては，治療開始後平均12ヶ月から18ヶ月で内分泌療法耐性が出現し，最終的に癌の増殖を制御することが不可能となる[4,5]．したがって前立腺癌の長期予後を改善する方法として，内分泌療法にかわる，もしくはそれに併用する新たな治療法の開発が求められている．

外来遺伝子を個体内に導入発現させることによって効果を発揮する遺伝子治療は，Clineらにより報告されて以来[6]最も注目される新技術の一つである．抗真菌剤5-fluorocytosine（5-FC）を，抗腫瘍作用を有する5-fluorouracil（5-FU）に変換するcytosine deaminase（CD）や，抗ウィルス剤であるgancyclovirをリン酸化物に変換させるthymidine kinase（TK）など，プロドラッグを代謝して傷害性を誘導する自殺遺伝子治療は，Mullen, Austin, Culverらにより1990年代前半に相次いで報告された[7~9]．これらの自殺遺伝子治療では，遺伝子が導入された細胞のみでなく，周囲に存在する非遺伝子導入細胞にも殺細胞効果が認められ（bystander効果），遺伝子導入効率の限られる癌治療に適する特性と考えられる．

遺伝子の発現には，RNA polymerase IIが一連の転写因子の修飾を受けて，遺伝子の上流に位置するtranscription initiation siteに結合する必要がある．この遺伝子上の結合領域はpromoter配列と呼ばれ，promoter配列以外に遺伝子発現に関与する領域を転写調節領域と呼ばれる．遺伝子の転写，翻訳は，1.関与する転写因子の発現量とDNA上の結合配列の存在，2.遺伝子に結合しているヒストン蛋白などの結合状態，3.転写調節領域の塩基のメチル化，4.messenger RNAの安定性，など多岐の要因によって影響される．転写調節領域のうち，遺伝子との位置関係や塩基配列の方向に依存せずに正の転写活性をもつ遺伝子配列は，特にenhancerと呼ばれる．真核生物の多くの遺伝子はこのenhancer配列によって細胞特異的な発現を規定されている．cytomegarovirus（CMV）promoter/enhancerは，多くの哺乳動物の細胞内で最も強力な転写調節活性を持つが，肝臓内の腫瘍に対する遺伝子導入動物実験モデルで用いられ，重篤な肝障害が生じたことが報告されている[10,11]．癌細胞特異的に外来遺伝子を発現させる方法として腫瘍マーカーの発現調節機構を利用することは副作用を減らす上で極めて有用であると考えられ，結腸

本論文は Uchida A, O'Keefe DS, Bacich DJ, Molloy PL and Heston WD：*In vivo* suicide gene therapy model using a newly discovered prostate- specific membrane antigen promoter/enhancer： a potential alternative approach to androgen deprivation therapy. Urology 58：132-9, 2001 より Elsevier Science, Inc.の許可を得て引用した．（© 2001, Elisevier Science, Inc.）また，本論文は Wiley-Liss, Inc. の許可を得て（© 2000, Wiley-Liss, Inc.），O'Keefe DS, Uchida A, Bacich DJ, Watt FB, Martorana A, Molloy PL and Heston WD：Prostate-specific suicide gene therapy using the prostate-specific membrane antigen promoter and enhancer. Prostate 45：149-157, 2000 の一部を転載した．

癌に対して carcinoembryonic antigen (CEA)[12]，肝癌に対して alpha-fetoprotein (AFP)[13]，そして前立腺癌に対しても prostate specific antigen (PSA) の promoter/enhancer を用いた自殺遺伝子療法が報告されており[14~16]，一部ですでに臨床試験が行われている[17]．

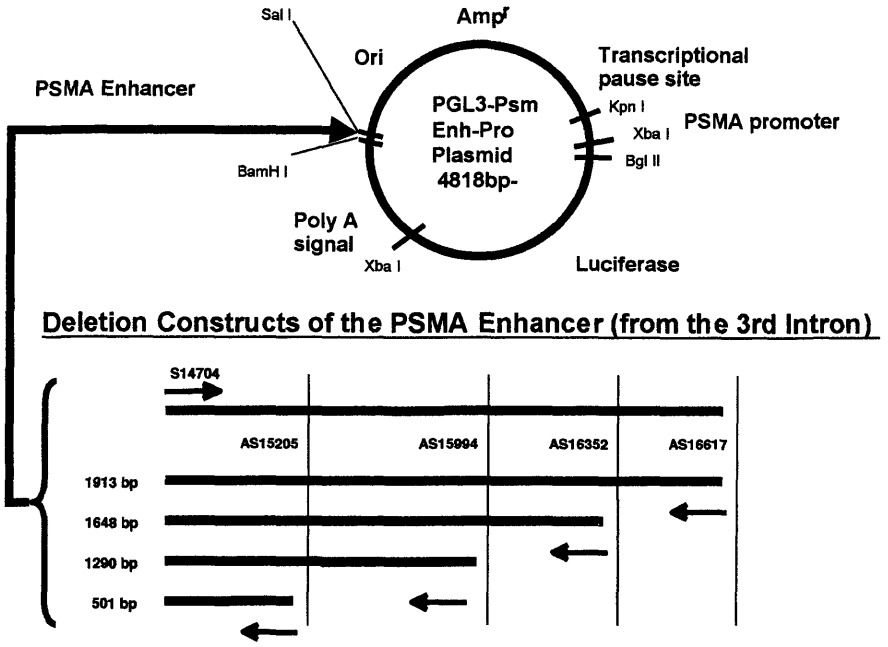
Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) は前立腺上皮細胞の細胞膜に発現する約 100 kD の糖蛋白で[18]，folate hydrolase[19]，N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase[20]活性を持つ．これらの活性はいずれも基質中のグルタミン酸残基を加水分解する点で共通である．細胞膜上の PSMA にモノクローナル抗体が結合することにより PSMA－抗体複合体は細胞内に取り込まれることが知られ[21]，この現象は internalization と呼ばれている．transferrin recepter は鉄の細胞内輸送に関わる膜蛋白で，PSMA と 54% の相同性をもち[18]，同様に抗体の結合で internalizaion をおこすことから，PSMA も葉酸，もしくは他の物質の細胞内輸送に関与すると考えられている[22]．現在臨床的に最も有用な前立腺腫瘍マーカーである PSA は前立腺上皮が産生する分泌蛋白であり，アンドロゲン存在下で分泌亢進し，逆に内分泌療法下では抑制される[23,24]．そのため遺伝子治療への応用に当たっては，promoter/enhancer 構造の遺伝子工学的改変により内分泌療法との併用の試みがなされている[25,26]．一方，PSMA は前立腺上皮細胞の構造蛋白であり，内分泌療法によりむしろ発現が増強することから[27]，将来の臨床応用可能な前立腺癌マーカーとしてだけでなく，治療における分子標的として有望である[28]．

第 11 番染色体短腕に位置する PSMA の遺伝子構造は共同研究者の O'Keefe らにより解明された[29]．我々はさらに PSMA 遺伝子の発現を制御する enhancer 領域を PSMA 遺伝子の第 3 イントロン中に見出した．本研究は，PSMA enhancer の前立腺癌細胞における活性，および特異性について検証するとともに，自殺遺伝子治療モデルを用いて臨床応用への可能性について検討する事を目的とした．

実験の方法

1.　細胞株と細胞培養

ヒト乳癌細胞株 MCF-7 細胞[30]，結腸癌細胞株 HCT8 細胞[31]，前立腺癌細胞株 LNCaP 細胞[32]を American Type Culture Collection (ATCC ; Rockvill, MD, USA) より購入した．これらの細胞を 2 mM の L-glutamine (Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA) と 10%ウシ胎児血清 (HyClone Laboratories, Inc., Logan, UT, USA) を含む RPMI 1640 培地 (Life Technologies Inc.) で 5% CO_2下で培養した．ヒト肺癌細胞株 H157 を同じく ATCC より購入し，2 mM L-



第 1 図　PSMA enhancer の deletion construct と Firefly luciferase 発現プラスミドの構造．Firefly luciferase の転写は同遺伝子の上流に組み込まれた PSMA promoter および下流に組み込まれた PSMA 第 3 イントロン由来 deletion construct により調節される．

glutamine, 1.5 g/*l* sodium bicarbonate, 4.5 g/*l* glucose, 10 mM HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid), 1.0 mM sodium pyruvate と 10% FBS を混じた RPMI 1640 にて培養した．LNCaP 細胞のホルモン不応性サブタイプである C4-2 細胞[33]を UroCor Laboratories (Oklahoma City, OK, USA) より購入し，LNCaP 細胞と同様の条件で培養した．

2. PSMA enhancer の deletion construct の作製

PSMA 遺伝子配列 (Genebank accession number：AF007544) の上流 1064 塩基配列 (−1244 より −180 nts) を PSMA promoter として，Firefly luciferase 発現ベクターである pGL3-Basic プラスミド (Promega, Madison, WI, USA) に組み込まれた pGL3-B-PSM[29] を以下の実験に用いた (第 1 図)．PSMA promoter の cloning における PCR には genomic DNA NA1944 (Coriell Cell Repositories, Camden, NJ, USA) を鋳型として用いた．この DNA はヒト染色体 11pter-cen が転座によりハムスター染色体に挿入された体細胞ハイブリッドで，ヒト染色体 11q に位置する PSMA に相同性のある遺伝子配列を，PCR template に混じないために使われた．次に下記のごとく BamHI site をもつ他種類の primer を用いて，領域の異なる PSMA enhancer の deletion construct を作製した．PCR 産物を制限酵素 BamHI にて処理し，先の pGL3-B-PSM または pGL3-promoter (Promega, SV40 promoter を含み enhancer を含まない対照プラスミド) の BamHI site に挿入した．PCR には

S14704：5'CGCGGATCCGCCTTCTAAAATGAGTTGGG3' を sense primer とし，

AS 15205：5'CGCGGATCCCAACATAGTGGAACCACGTC3' (501bps)

AS 15573：5'CGCGGATCCTGAGAAAAGATTGCCAACGC3' (869 bps)

AS 15994：5'CGCGGATCCATTAGGTTCCAAAGGAAGCC3' (1290 bps)

AS 16352：5'CGCGGATCCGGCTACTACATAAGTATAAGTC3' (1648 bps)

AS 16617：5'CGCGGATCCATGACACCAAAGCTTTAGGG3' (1913 bps)

を antisense primer として使用した (下線は primer 中にデザインされた BamHI site，括弧内は増幅された PCR 産物の塩基数)

3. PSMA promoter/enhancer の転写調節活性解析

24 well plate に各細胞を 24 時間培養し，約 50% confluency で Lipofectamine PLUS Reagent (Life technologies) を用いて先の deletion construct をもつ 400 ng のプラスミドと，100 ng の pRL プラスミド (SV40 promoter, enhancer により Renilla luciferase を発現するプラスミド，Promega) とともに Optimem (Gibco BRL) 培地下で遺伝子導入した．遺伝子導入の 2 日後に細胞融解液を回収し，luciferase assay まで −20℃で凍結保存した．luciferase 活性の定量には Dual Luciferase Kit (Promega) を用いた．対照プラスミドとして，pGL3-Basic (promoter なし), pGL3-Control (SV40 promoter/SV40 enhancer), pGL3-promoter (SV40 promoter のみ) を用いた．全ての条件で 3 つの異なるサンプルを作り，Firefly luciferase 活性測定値を Renilla luciferase 活性測定値で除した値を遺伝子導入効率補正後 Firefly luciferase 活性とし，3 サンプルの平均を計算して各条件間で比較した．

4. 前立腺特異的 CD 遺伝子発現ベクターの作製

真核生物の翻訳開始シグナルを持つべく改変された大腸菌 cytosine deaminase 遺伝子 cod A (Genebank accession number：S56903) を持つ pCD プラスミドから，制限酵素 XbaI で切り出した改変 codA (以下 CD 遺伝子) を，XbaI で消化して luciferase 遺伝子を除去した pGL3-B-PSM-Enh1648 に組み換えた．この際，改変 CD を発現するべき sense 方向，ならびにその逆方向 (antisense) にサブクローニングされたプラスミド，それぞれ pPSM/CD-sense，pPSM/CD-antisense を作製し，以下の実験に用いた．

5. 一過性遺伝子導入と細胞傷害性試験

24 well plate を用いて各細胞を 24 時間培養し，pPSM/CD-sense, pPSM/CD-antisense, もしくは SV40 promoter/enhancer の転写制御下で β-galactosidase を発現する pSV-β-gal プラスミド (Promega) で，前述のごとく遺伝子導入を行った．遺伝子導入の 48 時間後から各種濃度の 5-FC を細胞に暴露して 3 日間培養し，細胞傷害性を MTS Assay (CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega) にて定量した[34]．同様に親株細胞における 5-FU, 5-FC の感受性を測定し，遺伝子導入細胞と比較した．5-FC の暴露開始と同時に pSV-β-gal プラスミドにて遺伝子導入した細胞を in situ X-gal 染色法で染色し，遺伝子導入効率を計測した．

6.　in situ X-gal 染色法

24 well plate に培養された細胞から培養液を払拭除去の後，0.05% glutaralaldehyde (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mi, USA) の 10 mM phosphate buffer saline (PBS) 溶液 (PH 7.4) を加え，15 分間室温にて固定した．固定液を吸引除去し，PBS を各ウェルに添加して室温で 10 分間の撹拌洗浄し，これを 3 回繰り返した．その後に X-gal 溶液 5 mM ferricyanide (Sigma-Aldrich Co.), 5 mM ferrocyanide (Sigma-Aldrich Co.), 2 mM magnesium chrolide (Sigma-Aldrich Co.) と，1 mg/m*l* 5-bromo-4-chloro-3-indol-β-D-galactopyranoside (X-gal) dimetyl sulfoxide (Sigma-Aldrich Co.) 溶液を 24 well plate に添加し，37℃で一晩反応させた．顕微鏡下で少なくとも 1000 個の細胞を観察し，青色に染色された細胞を陽性としてその比率を計算した．対照として遺伝子導入していない細胞，pPSM/CD-sense プラスミドで遺伝子導入した細胞を同様の方法で処理し，非特異的染色のないことを確認した．

7.　遺伝子導入細胞の CD 活性の定量

100 mm 培養皿にて C4-2 細胞，H157 細胞を 24 時間前培養し，前述と同様の方法で pPSM/CD sense，もしくは pPSM/CD-antisense プラスミドを一過性遺伝子導入した．48 時間後に，細胞を trypsin 処理して細胞 pellet として回収し，−20℃で保存した．110 μ*l* の蒸留水を加えて 5 回の凍結融解を繰り返し細胞を破壊した後，14000 g, 4℃, 30 分の遠心分離で上清を回収した．このうち 10 μ*l* を蛋白定量に用い，残る 100 μ*l* を酵素活性定量に用いた．蛋白定量には BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) を用いた．3 mM 5-FC を含むリン酸緩衝液 900 μ*l* それぞれ 100 μ*l* の細胞融解液を混じ，分解される 5-FC の濃度を分光光度計で測定した．西山らの方法[35]に従い，波長 290 nm および 250 nm の吸光度 A290, A250 を同時に測定して 5-FC (mM) = 0.119 × A290 − 0.025 × A255 を計算した．

1 mg の細胞融解液により 1 分あたりに分解される 5-FC の量 (nM) をもって CD 活性 1 U と定義した．後述の安定遺伝子導入細胞の CD 酵素活性も同様に測定した．

8.　安定遺伝子導入 C4-2 細胞のクローニング

pPSM/CD-sense もしくは pPSM/CD-antisense プラスミドを，Selectavecta-Neo プラスミド (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) とともに C4-2 細胞の遺伝子導入に用いたのち，750 μg/m*l* の活性 G418 (Life Technologies) を含んだ培養液で 3 週間の培養を行った．選択された細胞のコロニーをクローニングし，抽出した DNA を用いて PCR で CD 遺伝子の存在を確認した．さらに選択された細胞について CD 酵素活性を定量し，5-FC に対する感受性を後述の方法で測定した．

9.　安定遺伝子導入細胞の 5-FC 細胞傷害試験

クローニングされた各々 9.0×10^3 の安定遺伝子導入細胞を，48 well plate に 24 時間前培養し，50% confluency の細胞に対して異なる濃度の 5-FC の暴露を 3 日間継続した．MTS Assay を用いて細胞数を定量し，IC50 を算出した．

10.　CD 発現細胞の 5-FC 暴露による Bystander 効果の検討

24-well plate 上で，CD 発現安定遺伝子導入 C4-2 細胞を親株 C4-2 細胞 に対して 0, 20, 40, 60, 80, 100%の割合で混合し，各ウェルに計 2.5×10^4 個の細胞数として 24 時間前培養した．500 μM の 5-FC を含む培地で 4 日間培養したのち，細胞数を MTS assay にて定量して IC50 を測定した．対照のため同様に CD 非発現 (antisense) 安定遺伝子導入 C4-2 細胞を親株 C4-2 細胞 に混合して同じ条件で実験を行った．

11.　培地を介した殺細胞効果の検討

1.2×10^5 個の CD 発現安定遺伝子導入 C4-2 細胞を 6 well plate に 24 時間培養し，0, 500, または 1000 μM の 5-FC を混じた培養液に交換して 3 日間培養を続けた．培養液を回収して trypsin 処理ののち細胞を回収し，trypan blue 法で細胞数を計測した．回収した培養液を 4℃で毎分 1500 回転で 5 分間遠心し上清を回収した．回収した各々の上清 250 μ*l* を，あらかじめ 24 時間培養した 24 well plate 上の培養液 250 μ*l* 中の 2.5×10^4 個/well の親株 C4-2 細胞 に添加した．4 日間培養後，細胞数を MTS assay にて定量した．対照のため，CD 非発現 (antisense) 安定遺伝子導入 C4-2 細胞を同様に用いた．また同時に，回収した培養液のかわりに新鮮な培養液を添加する親株 C4-2 細胞 の対照実験も行った．

12.　ヌードマウス皮下腫瘍モデルにおける遺伝子導入前立腺癌細胞に対する 5-FC の抗腫瘍効果

in vitro にて PSMA enhancer/promoter の制御により CD を発現する遺伝子導入 C4-2 細胞 (CD sense),

同じ遺伝子発現調節配列を持ちながら CD 遺伝子をアンチセンス方向に挿入されているため遺伝子発現しない遺伝子導入 C4-2 細胞（CD antisense），および無処置の親株 C4-2 細胞をそれぞれ 33 匹ずつ，計 99 匹のヌードマウス（BALB/c nu/nu, Charles-River Laboratories, Inc., Boston, MA, USA）に移植した．移植には 5.0×10^6 個の細胞を 0.5 m*l* の matrigel（Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA）に混じて各マウスの左季肋部皮下に皮下注射する方法で行った．CD antisense 群のうち腫瘍の生着を確認できなかった 1 匹を実験から除外した．残りの 98 匹に対して腫瘍移植 7 日後より以下の治療を行った．すなわち，上記の 3 群を各々5-FC 投与群，生理食塩水投与群に分け，第 1 群として親株 C4-2 細胞移植，5-FC 治療群（parental, 5-FC），第 2 群として親株 C4-2 細胞移植，生理食塩水治療群（parental, saline），第 3 群として CD sense 移植，5-FC 治療群（CD sense, 5-FC），第 4 群として CD sense 移植，生理食塩水治療群（CD sense, saline），第 5 群として CD antisense 移植，5-FC 治療群（CD antisense, 5-FC），第 6 群として CD-antisense 移植，生理食塩水治療群（CD antisense, saline）の計 6 群を設けた．5-FC 治療群には，0.5 から 0.75 m*l* の 5-FC 生理食塩水溶液（24 mg/m*l*）の 1 日 2 回の腹腔内投与（600 mg/kg）を 21 日間継続した．対照の生食治療群にはマウスの体重にあわせて同様に 0.5 m*l* から 0.75 m*l* の生理食塩水を腹腔内投与した．各週毎にマウスの体重，腫瘍径を計測した．予測腫瘍重量 W（mg）は 3 方向の腫瘍直径（長径L，短径M，厚さN）（mm）から

$$W = 0.5 \times L \times M \times N$$

の近似式を用いて計算した．さらに治療開始 21 日後に腫瘍を切除し，その湿重量を計測した．治療の前後で眼窩静脈より採血し，ACTIVETM PSA Kit（Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX, USA）を用いて血清 PSA 値を測定した．切除した腫瘍を 10%緩衝ホルマリン，および 70%エタノールで固定，パラフィン切片に包埋した．通常のヘマトキシリン－エオジン法で染色して鏡検した．

13. 統計学的分析

予測腫瘍重量と実測腫瘍質重量，および血清 PSA 値はそれぞれ 1 次回帰分析にて相関性を検討した．腫瘍重量の群間の違いは 6 群から 2 群を選ぶすべての組み合わせで Mann-Whitney の U 検定を用いて行った．この際，有意水準を 5 %とするため，Bonferroni の方法に基づいて個々の検定で $p<0.003$（$=0.05/{}_6C_2$）を有意とした．

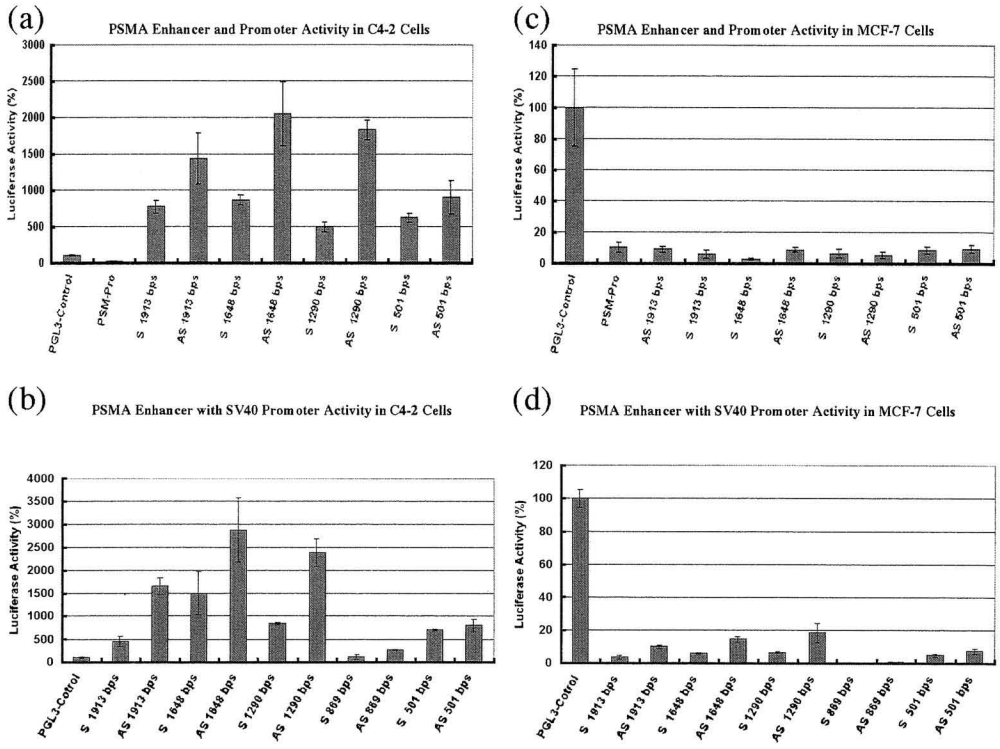
結　果

1. PSMA promoter/enhancer の転写調節活性解析

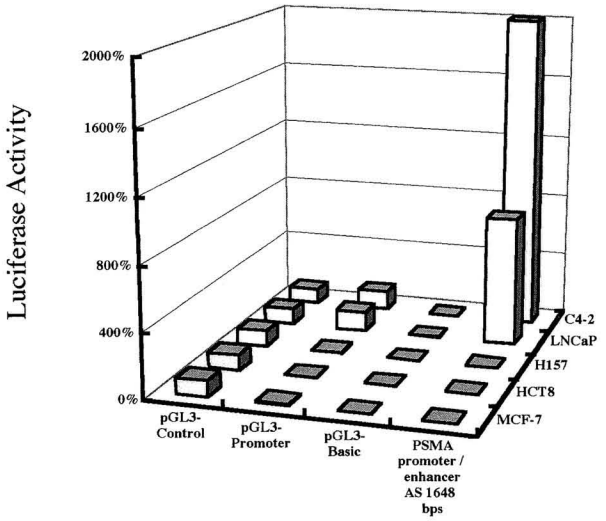
PSMA 遺伝子の第 3 イントロン中の塩基配列の中で，最も活性の高い enhancer を同定するため，C4-2 細胞と MCF-7 細胞を用いて luciferase assay を行った（第 2 図）．前立腺癌細胞株である C4-2 細胞では，PSMA promoter と組み合わせて検討した deletion construct のうち antisese 方向に挿入された 1.6 kb（AS 1648bps）の転写調節活性が最も強く，PSMA promoter 単独に比較して約 100 倍で，SV40 promoter と SV40 enhancer の組み合わせ（pGL3 Control）より約 20 倍の reporter 活性であった（第 2 A 図）．さらに AS 1648 bps は SV40 promoter と組み合わせた場合（SV40 promoter/PSMA enhancer）SV40 promoter 単独（SV40 promoter only）に比して 130 倍の活性増強が認められ（data not shown），pGL3 Control（SV40 promoter/SV40 enhancer）よりも 29 倍活性が高かった（第 2 B図）．一方，PSMA promoter/enhancer は乳癌細胞株 MCF-7 細胞ではほとんど転写調節活性を持たず，SV40 promoter/PSMA enhancer の組み合わせでも同様であった．PSMA を発現しない肺癌細胞株 H 157，結腸癌細胞株 HCT8 でも同様で，PSMA enhancer の 1648 bps の deletion construct と PSMA promoter との組み合わせによる転写調節活性は PGL3 Control に比してそれぞれ 0.8%，および 0.9%だった（第 3 図）．PSMA promoter/enhancer は前立腺癌細胞株 LNCaP では pGL3 Control（SV40 promoter/SV40 enhancer）の 8 倍の reporter 活性を示した．

2. 一過性遺伝子導入細胞の 5-FC による殺細胞効果

次に PSMA promoter/enhancer の制御下で自殺遺伝子である大腸菌由来 CD を発現するベクター pPSM/CD-sense，および同遺伝子を反対方向（anitisense）に挿入した非発現性の対照プラスミド pPSM/CD-antisense を各細胞に一過性遺伝子導入し，細胞傷害性試験にて 5-FC の感受性を調べた．pPSM/CD-sense プラスミドで遺伝子導入された C4-2 細胞では in situ X-gal 染色法により測定された遺伝子導入効率が 8 %の条件下で，5-FC の IC_{50} が 200 μM から 300 μM となった（第 1 表）．一方，非遺伝子導入，または対照プラスミド pPSM/CD-antisense で遺伝子導入された細胞では各細胞ともに 5-FC の IC_{50} は 10 mM 以上で，C4-2 細



第2図　PSMA enhancer 領域の発現調節活性の解析．pGL3-Control プラスミド（SV40 promoter＋enhancer）の遺伝子導入による luciferase 活性を 100%としたときの，PSMA enhancer 領域の各欠失変異 DNA 断端の発現調節活性（遺伝子導入効率を補正した luciferase 活性）を示した．（棒グラフの値は平均値，エラーバーは標準偏差．）enhancer が luciferase 遺伝子と同方向に挿入されたものを“S”，反対方向に挿入されたものを“AS”と記した．(a) 前立腺癌 C4-2 細胞では，PSMA promoter，もしくは (b) SV40 promoter に PSMA enhancer を加えた場合，最大 300 倍までの reporter 活性増加が認められ，pGL3-Control の 20 倍に相当した．それに対して (c) (d) MCF-7 細胞では明らかな活性変化は認められなかった．この結果より PSMA enhancer の AS 1648 bps の塩基配列を最大の発現調節活性部位と同定した．(O'Keefe DS, et al. Prostate 45：149-157, 2000 の第3図を許可を得て転載)



第3図　luciferase assay による，各種細胞株中における PSMA promoter/enhancer（AS 1648bps）の活性．pGL3-Basic（promoter なし），pGL3-Promoter（SV40 promoter のみ）と pGL3-Control（SV40 promoter/SV40 enhancer）を対照として用い，pGL3-Control の活性を 100%とした時の他群の値を示した．PSMA promoter/PSMA enhancer（AS 1648bps）は前立腺癌由来の LNCaP，C4-2 細胞では SV40 promoter/SV40 enhancer に比してそれぞれ 8，20 倍の活性を有する一方，MCF-7（乳癌由来），HCT8（大腸癌由来），H157（肺癌由来）細胞では，それぞれ 0.5%，0.9%，0.8%であった．(Uchida A, et al. Urology 58：132-139, 2001 の第1図を許可を得て転載)

第 1 表　各細胞における 5-FU，5-FC の感受性の比較

Cell line	Tissu origin	Activity of PSM enhancer	PSMA expression	IC_{50} 5-FU (μM)	IC_{50} parental (μM)	IC_{50} 5-FC PSMA/ CD (μM)	Ratio IC_{50} of 5-FC (parental)/ (PSMA/CD)	Transfection efficiency
C4-2	Prostate	20	+	1-5	15000	200-300	>50	8
LNCaP	Prostate	8	+	1-10	15000	1000-2000	10	5
H157	Lung	−	−	1-10	>20000	>10000	<2	10
HCT8	Colon	−	−	1-5	20000	15000	<2	6
MCF-7	Breast	−	−	1-5	10000	10000	<2	15

5-FU，5-FC に対する各細胞の感受性はほぼ同様であった．しかし，pPSM/CD-sense プラスミドが遺伝子導入された時，C4-2，LNCaP 細胞では 5-FC に対する感受性がそれぞれ 50 倍，10 倍に増強した．その際の遺伝子導入効率はそれぞれ 8%，5% と，低値であった．一方非前立腺癌由来の細胞では，pPSM/CD-sense プラスミドが遺伝子導入された場合にも 5-FC に対する感受性には変化を認められなかった．(O'Keefe DS, et al. Prostate 45：149-157, 2000 の第 1 表を許可を得て転載)

胞においては，CD 発現プラスミドの導入により 5-FC に対して 50 から 75 倍程度の感受性の増強が得られた．この construct は PSMA を発現しない H157，HCT8，MCF-7 細胞では 5-FC への感受性にほとんど影響を与えなかった．

3.　安定遺伝子導入細胞のクローニングと CD 酵素活性，5-FC による殺細胞効果

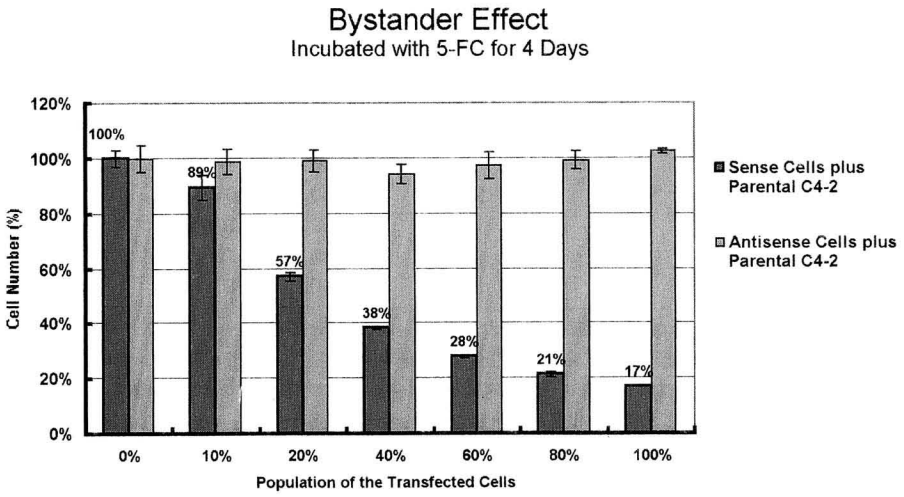
pPSM/CD-sense と SelectaVecta-Neo プラスミドで安定遺伝子導入した C4-2 細胞を選択培地を用いて選択し，3 つの異なったクローンを得た．それぞれのクローンから DNA を抽出し，PCR にてすべてのクローンで CD 遺伝子陽性が確認された．各クローンでの CD 酵素活性を定量したところ，3 つのクローンでほぼ等しく 0.4 U の活性が認められた．続いて 5-FC に対する感受性を調べるため 5-FC による細胞傷害試験を行った．3 つのクローンはいずれも 250 から 300 μM と，同様の IC_{50} を示した．これらの実験で対照として pPSM/CD-sense の代わりに pPSM/CD-antisense を用いて安定遺伝子導入 C4-2 細胞を選択し，少なくとも 3 つのクローンを得た．これらのクローンはすべて CD 遺伝子を鋳型とした PCR で陽性であったが，5-FC の IC_{50} は親株 C4-2 細胞と同様に 10 mM 以上であり，遺伝子導入による 5-FC に対する感受性の増強は認められなかった．このようにして PSMA promoter/enhancer の制御下で CD を発現する安定遺伝子導入 C4-2 細胞，およびその対照としての CD 非発現性の C4-2 細胞が得られた．これらのうち 1 クローンずつを用いて以下の実験を行った．

4.　CD 発現細胞の 5-FC 暴露による Bystander 効果の検討

CD 発現細胞に共存する非発現細胞に対する 5-FC の増殖抑制効果を確認した（第 4 図）．非遺伝子導入細胞に対しては増殖抑制効果が認められない濃度である 500 μM の 5-FC を pPSM/CD-sense による安定遺伝子導入 C4-2 細胞（CD 発現 C4-2 細胞）に暴露すると，細胞増殖は 17%に抑制された．同じ条件で CD 発現 C4-2 細胞を親株細胞と混合培養した．前者を全体に対して 10%，20%，40%，60%，80%の割合で混合し 500 μM 5-FC に暴露すると親株細胞 100%（遺伝子導入細胞 0%）に比してそれぞれ 89%，57%，38%，28%，21% の増殖抑制効果が認められた．いずれの条件でも遺伝子導入細胞の割合と同等，ないしはより多くの細胞増殖抑制効果が見られた一方，pPSM CD-antisense 遺伝子導入細胞と親株細胞を混じることによって行った同様の実験では，5-FC による増殖抑制効果は認められなかった．5-FC を含まない培養条件ではこれら 3 者の細胞数に違いは見られなかった．以上より，CD 発現細胞の 5-FC への暴露によって，混合培養した親株細胞，すなわち CD 非発現細胞にも増殖抑制効果が現れることが確認された．

5.　培地を介した殺細胞効果の検討

上記の bystander 効果について，培養液を介して増殖抑制効果が伝達されるかを検討した．CD 発現 C4-2 細胞に 500 μM，または 1000 μM の 5-FC を 3 日間暴露し，trypan blue 法で細胞数を計測した結果，CD 安定遺伝子導入 C4-2 細胞数は 5-FC を含まない培養液中に比してそれぞれ 6%，8%であった．これらの培養液上清を回収し，5-FC を含まない等量の新鮮な培地にて



第4図　CD 発現細胞と，共存する非発現細胞に対する 5-FC の増殖抑制効果（bystander 効果）．非遺伝子導入 C4-2 細胞には増殖抑制効果のない 500 μM の 5-FC を pPSM/CD-sense プラスミドによる安定遺伝子導入 C4-2 細胞（CD 発現 C4-2 細胞）に暴露すると，細胞増殖は 17%に抑制された．CD 発現 C4-2 細胞と親株 C4-2 細胞を 20%，40%，60%，80%の割合で混合し 500 μM 5-FC を投与すると親株細胞 100%（遺伝子導入細胞 0%）に比してそれぞれ 57%，38%，28%，21%の増殖抑制効果が認められた．いずれの条件でも遺伝子導入細胞の割合よりも多くの細胞増殖抑制効果が見られた一方，pPSM/CD-antisense 遺伝子導入細胞（CD 非発現 C4-2 細胞）と親株細胞を混じることによって行った同様の実験では，5-FC による増殖抑制効果は認められなかった．

24 時間前培養された親株 C4-2 細胞に 4 日間暴露を続けると（5-FC を含まない培養液に比して）それぞれ 10%，6% に細胞増殖が抑制された（第5図）．対照として新鮮培養液を加えた親株細胞と，5-FC を含まない条件で CD 遺伝子導入 C4-2 細胞を培養した後回収した上清とを加えた親株細胞の増殖を観察したが，それらには増殖抑制効果はなかった．また比較のため行った CD 非発現（antisense）C4-2 細胞の培養後の 5-FC を混じた培養液上清には，同様に親株細胞の増殖抑制効果は認められなかった．

6.　ヌードマウス移植遺伝子導入 C4-2 細胞に対する 5-FC による抗腫瘍効果

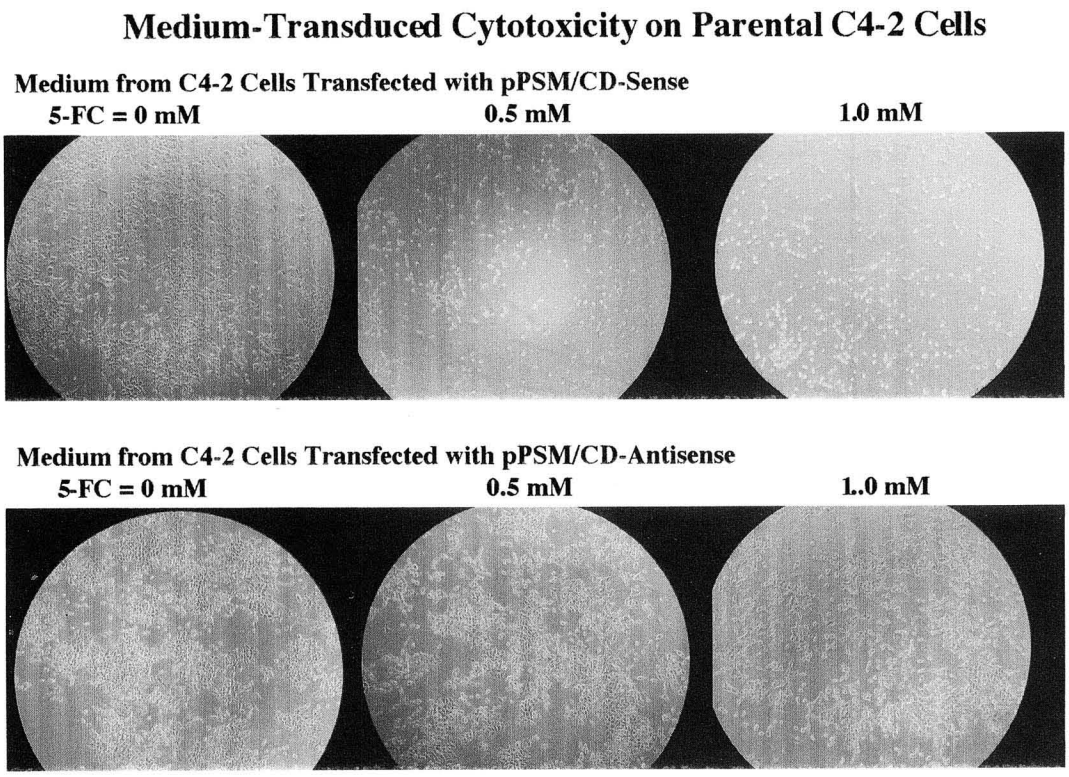
ヌードマウスに移植された CD 発現 C4-2 細胞に対する 5-FC の抗腫瘍効果を検討した．計 98 匹のヌードマウスのうち，6 匹（第1群の1匹，第2群の3匹，第5群の1匹，第6群の1匹）は外傷による死亡，もしくは衰弱のため実験から除外された．観察期間中の各群ごとの予測腫瘍重量は第6図のように推移した．第1，3，5 群には 1 回 600 mg/kg を 1 日 2 回，計 21 日間腹腔内投与し，第2，4，6 群には同じ容量の生理食塩水（マウス体重 1 g あたり 0.025 m*l*）の腹腔内注射を行った．実験終了時，腫瘍径 3 方向の計測による腫瘍予測重量と実測重量を一次回帰法により比較し，回帰式は

$Y = 1.03^{*}X + 322$，$r = 0.954$（Y：実測腫瘍重量（mg），X：予測腫瘍重量（mg）r：相関係数）であった．各群における実測腫瘍重量の分布は第7図の通りであった．第3群（sense, 5-FC）の実測腫瘍重量は他群と比して有意に小さかった（$p < 0.0001$）．

腫瘍マーカーである血清 PSA は 第3群（sense, 5-FC）では治療前の平均濃度 4.6 ng/m*l* から治療後 0.4 ng/m*l* と減少した．一方，他のすべての群では治療後 PSA 値は上昇した（第2表）．治療後，第3群（sense, 5-FC）の PSA 値は他のどの群と比しても有意に低かった（$p < 0.003$）．治療後の PSA 値と腫瘍実測質重量との一次回帰分析により，$Y = 0.12X - 22$，$r = 0.93$（Y：血清 PSA 値（ng/m*l*），X：腫瘍重量（mg），r：相関係数）の回帰式が得られ，両者の高い相関性が示された（第8図）．

7.　組織学的検討

切除した腫瘍の肉眼的観察では 300 mg 以上の腫瘍は出血による赤色調の外観であった．第3群（sense, 5-FC）の腫瘍はいずれも白色調で，出血は認められなかった（第9図（a））．ヘマトキシリンエオジン染色による病理組織学的検査では第3群の腫瘍内に癌細胞は

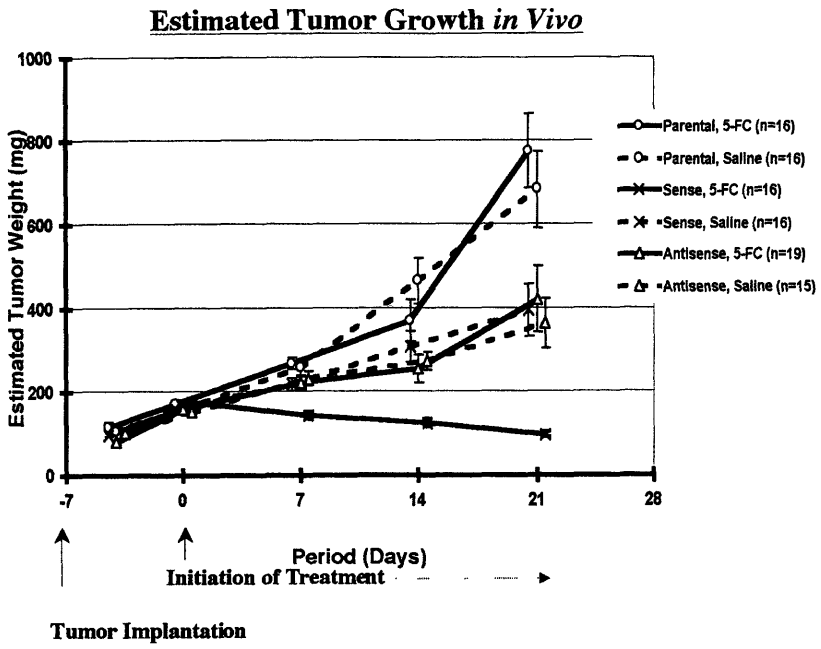


第5図　培地を介した殺細胞効果の検討．6 well plate で 500 μM，1000 μM の 5-FC を CD 発現 C4-2 細胞に暴露したところ通常の培地に比べてそれぞれ 6%，8%に細胞増殖が抑制された．この培地を回収して遠心し，等量の培地で前培養された親株 C4-2 細胞に暴露して 3 日間培養を続けた．5-FC 濃度 500 μM 由来，1000 μM 由来の培地を加えた C4-2 細胞は，5-FC を含まない培地を加えた C4-2 に比してそれぞれ 10%，6%に細胞増殖が抑制された．一方，対照として CD 非発現 C4-2 細胞（CD antisense）を同様の条件で培養したが，5-FC 濃度 500 μM，1000 μM 由来の培地ともに細胞増殖抑制効果は認められず，この培地上清を親株 C4-2 細胞に加えても細胞数は 5-FC 濃度 0 μM 由来の培地と比して同等であり，明らかな細胞増殖抑制は認められなかった．

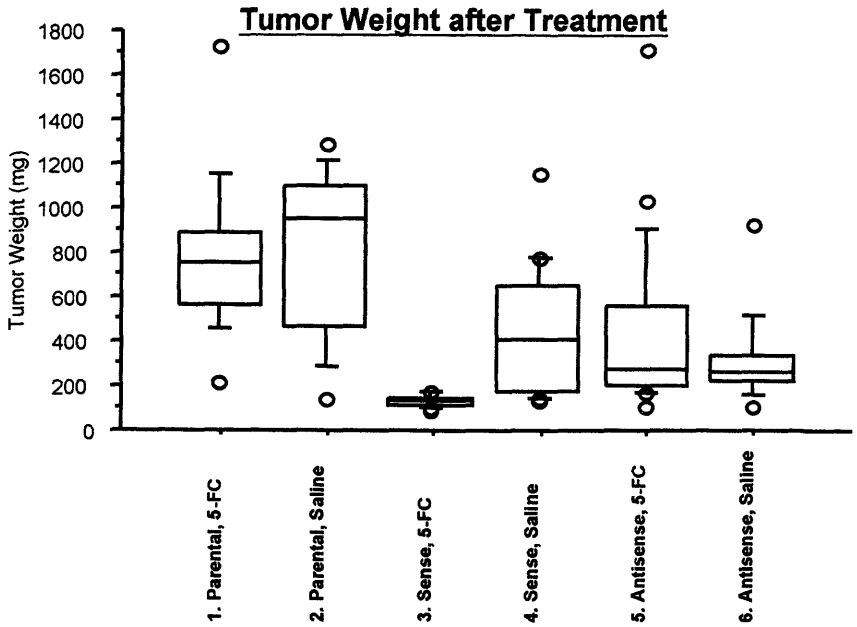
著明に減少し，硝子変性が見られた．（第 9 図（c））．これに対し他群では低分化型前立腺腺癌の典型的な間質の増生，腫瘍内出血などの組織像が観察された（第 9 図（b））．

考　察

PSMA は前立腺上皮の細胞膜に発現する糖蛋白で[36]前立腺癌で過剰発現していることが知られている．Israeli らにより PSMA の mRNA の塩基配列が解明され[18]，O'Keefe らにより 19 個のイントロン，20 個のエクソン構造からなる，約 20 kb の領域にわたる PSMA 遺伝子の全構造が上流 1.2 kb の領域の promoter 配列とともに解明された[29]．今回，PSMA 遺伝子の第 3 イントロン中に前立腺癌細胞特異的な enhancer 活性の存在することが見出されたが，Watt らはさらにアンドロゲン不在下ではこの活性が 3 から 6 倍に増加することを示した[37]．現在前立腺マーカーとして広く臨床で用いられている prostatic acid phosphatase（PAP）や PSA の enhancer はアンドロゲン不在下で抑制される[38,39]．さらに前立腺癌における PSA，PAP の発現は正常前立腺上皮に比して低い[40]．一方，PSMA の発現が男性ホルモンの遮断により増幅される事が実験的に[27]証明され，分化度の低い前立腺癌に強い発現が見られる傾向にあることが報告されている[41]．このようなことから PSMA は内分泌療法下でも有用な前立腺特異的な分子標的となり得る．Watt らによると LNCaP，LAPC-4，PC-3，DU145 などの前立腺癌細胞株における PSMA enhancer の活性は，PSMA 蛋白の発現レベルに相関し，PSMA enhancer と PSMA promoter を組



第6図　ヌードマウス皮下移植後の各群における，腫瘍径から計算された予測腫瘍重量．各群の点とエラーバーはそれぞれ平均値，標準誤差を示す．治療開始前は各群で平均腫瘍重量に差は見られなかった．治療開始後，第3群では平均腫瘍重量の減少が認められたが，他群では増加し第3群との間に有意差を認めた（$p<0.003$）．（Uchida A, et al. Urology 58：132-139, 2001 の第2図を許可を得て転載）



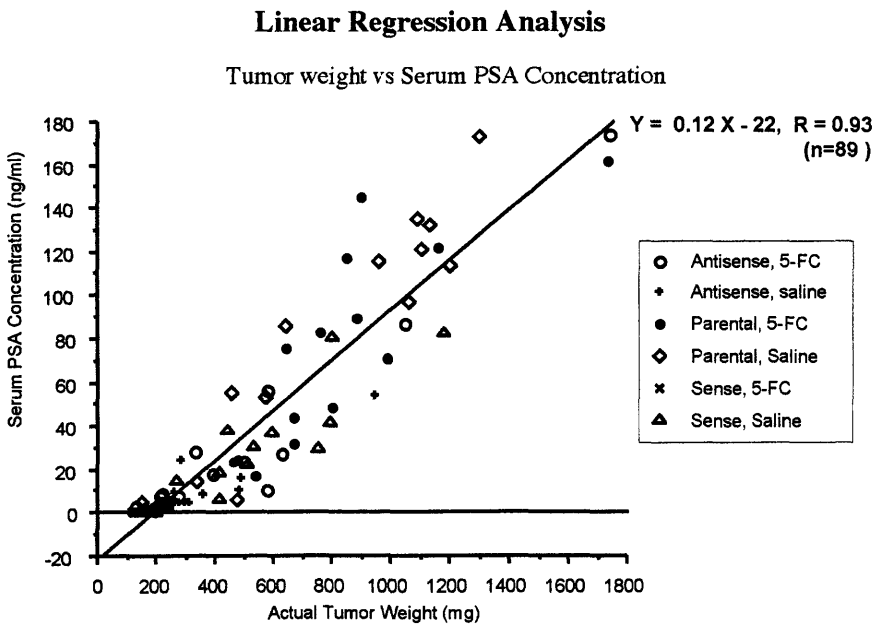
第7図　実験終了時の各群における実測腫瘍重量．各群の box は50%のデータを含む範囲，whisker は75%を含む範囲（interquartile range (IQR)）を，box 中の線は平均値を示す．第1から第6群までの群の腫瘍重量の中央値はそれぞれ第1群760 mg，第2群956 mg，第3群154 mg，第4群428 mg，第5群278 mg，第6群278 mg で，第3群（sense, 5-FC）の腫瘍は他のどの群よりも有意に小さかった（$p<0.0001$）．Uchida A, et al. Urology 58：132-139, 2001 の第3図を許可を得て転載

第 2 表　ヌードマウス皮下腫瘍モデルの各群における治療前後の血清 PSA 濃度

		血清 PSA 濃度 (ng/ml)	
		Day 0	Day 21
Group 1	parental, 5-FC	3.4±2.9	70.3±12.7
Group 2	parental, saline	3.2±1.8	85.0±54.0
Group 3	sense, 5-FC	4.6±2.4	0.4±0.4
Group 4	sense, saline	5.2±3.8	25.3±25.9
Group 5	antisense, 5-FC	4.8±2.0	30.6±46.0
Group 6	antisense, saline	4.6±3.4	10.4±14.2

(mean±SD)

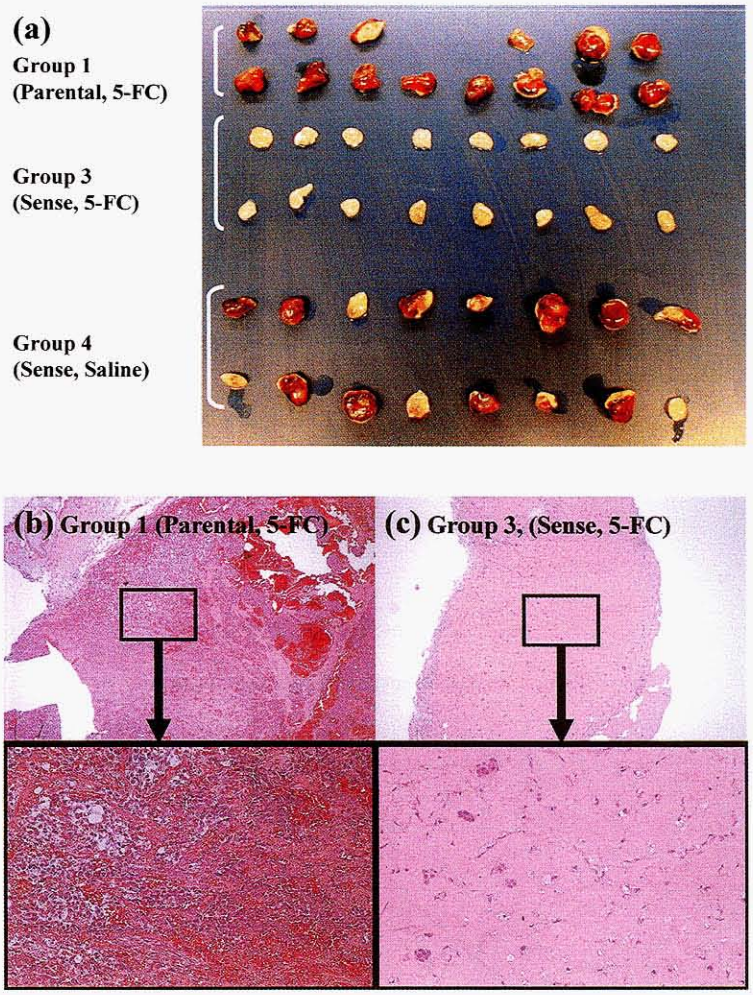
治療前の各群の平均血清 PSA 濃度はほぼ同様であった（3.2 ng/ml から 5.2 ng/ml）．治療後，血清 PSA 濃度は第 3 群でのみ低下し，第 3 群とその他の群の比較において有意な差が認められた（$p<0.003$）．(Uchida A, et al. Urology 58：132-139, 2001 の第 1 表を許可を得て転載)



第 8 図　摘出された腫瘍の湿重量（X）と宿主動物の血清 PSA（Y）値の関係．一次回帰分析により，Y＝0.12X－22,（相関係数 0.93）の回帰式が得られた．

み合わせた場合，PSMA を発現しない細胞株では活性は確認されなかった．その一方で PSMA enhancer が別の前立腺特異的 promoter として知られる Probasin promoter と組み合わされた場合には，胎児腎細胞由来 HEK293 細胞で，低いが無視できない活性が見られた[37]．今回の我々の検討では，PSMA enhancer は SV40 promoter と組み合わせても組織特異性を保つことが示唆されたが，未だ十分な細胞種で検証されていないため，CD 遺伝子治療における細胞傷害性実験には PSMA enhancer と PSMA promoter を組み合わせて用いた．

PSMA の細胞内ドメインを認識するモノクローナル抗体である 7E11[36]を用いた研究によると，PSMA の発現は前立腺に比して非常に弱いながら，腎，十二指腸，唾液腺，脳組織の一部に認められている[27,42]．近年，PSMA に相同性を持つ蛋白として N-acetylated alpha-



第9図　(a)：摘出腫瘍の肉眼所見．上段，中段，下段の2列ずつはそれぞれ第1群（parental，5-FC），第3群（sense，5-FC），第4群（antisense，5-FC）の腫瘍．第3群（sense, 5-FC）の腫瘍は全て白色調で，出血は認められなかった．それに対し他群の腫瘍の多くは，出血に伴って赤色を呈していた．(b)，(c)：摘出腫瘍の顕微鏡所見，HE染色，弱拡大（×4），強拡大像（×400）．左下（b），右下（c）はそれぞれ第1群（parental，5-FC），第3群（sense，5-FC）の中央値の重量を示した腫瘍．第3群の腫瘍はほとんどエオジン好性の非細胞性成分に置換されていた．それに対し他群では低分化型線癌の組織像として出血壊死，線維増生などの所見が認められた．（Uchida A, et al. Urology 58：132-139, 2001の第4図を許可を得て転載）

linked acidic dipeptidase II（NAALADaseII）とNAALADase Lなどが発見され，PSMA遺伝子との塩基配列の相同性はそれぞれ81%，54%と報告されている[43]．reverse transcription-polymerase chain reaction（RT-PCR），あるいはノーザンブロットによる解析では，NAALADaseIIは精巣，卵巣，脾臓など，NAALADase Lは十二指腸，脾臓，精巣などで発現すると考えられる[43]．これらの蛋白にはPSMAと共通の細胞内ドメインは見られず，7E11との交差反応性はないと考えられるが，細胞外ドメインを認識する多くのPSMAのモノクローナル抗体とこれらの蛋白との交差反応性は明らかでない．また，PSMA enhancerがこれらの蛋白の発現に関わっているかも今のところ不明である．よって，将来PSMA enhancerを用いて遺伝子治療を実用化する際には，前立腺以外の臓器でPSMA enhancerがどの程度の活性を有するか，さらに詳細に検討する必要があろう．

前立腺癌細胞株C4-2はLNCaP細胞より作られたsublineであり[33]，腫瘍マーカーであるPSA，PSMAを発現し，男性ホルモン非依存性に増殖するため[44]，ホルモン療法耐性前立腺癌の適切なモデルと考えられている．Ruokonenらが指摘するように，リポソームを用

いた LNCaP 細胞への遺伝子導入は困難であり[45]，*in vivo* において *in situ* β-galactosidase assay で LNCaP，C4-2 細胞の遺伝子導入効率を検討した我々の結果も同様であった．そのため本研究では動物実験において，最終的に安定遺伝子導入された C4-2 細胞を用いた．一般に安定遺伝子導入細胞では導入遺伝子の発現は導入された部位でのクロマチンの立体構造，ヌクレオソームの構造，周囲のメチル化の状態などに依存する．しかしながら導入遺伝子の十分な発現には promoter/enhancer の活性が必要不可欠である．*in vitro* における安定遺伝子導入 C4-2 細胞は，一過性遺伝子導入とほぼ同様の 300 μM 以下の IC_{50} を示した．この数値は，抗真菌剤として 5-FC の通常使用量で得られるヒト血中濃度（500 μM）[46]に比して低い値であった．これらの結果から，*in vitro* と同様の遺伝子導入効率が得られれば，臨床においても CD の腫瘍内発現とそれに続く通常投与量の 5-FC 投与により十分な治療的効果を期待できる．

5-FC は CD によって 5-FU に変換され，標的細胞内で 5-fluorouridine 5'-triphosphtate となり，リボ核酸（RNA）の合成の際に取り込まれて RNA の機能を阻害する一方，5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate に変換されることでデオキシリボ核酸（DNA）の合成の課程で thymidylate synthetase に対して拮抗的に働き，細胞増殖抑制効果を発揮する．5-FU 代謝の基礎的研究の成果から，前立腺癌患者に対する 5-FU の低用量持続投与と放射線，あるいはインターフェロンの併用による 5-FU の感受性増強効果が報告され[47,48]，5-FU の臨床的意義が見直されている．また Kanai らは，uracil を uridine monophosphate（UMP）に変換する大腸菌由来 uracil phosphoribosyltransferase（UPRP）遺伝子を癌細胞内に導入することにより，5-FU に対する感受性が増強されることを示した[49]．さらに Erb らは UPRP と CD の融合遺伝子を導入する実験モデルで，5-FC の殺細胞効果の増強に成功した[50]．このように 5-FU の代謝を修飾する他治療との併用により CD 自殺遺伝子治療のさらなる改良が進められている．

今回の我々の検討では，*in vitro* において PSMA enhancer が前立腺癌特異的に自殺遺伝子の効果を発揮させた．また，ヌードマウスを用いた C4-2 細胞皮下腫瘍モデルでも同様に，前立腺癌の著明な縮小効果が認められ，宿主動物の血清 PSA 値，組織学的検討により治療効果が確認された．よって今回検証した PSMA promoter/enhancer は，前立腺特異的な遺伝子治療に有用であることが示された．最近の報告では，PSMA は通常の血管に発現しないものの，癌の新生血管に発現していることが免疫組織化学的に確認されている[42,51~53]．PSMA enhancer が腫瘍血管内でも活性を有するならば，他の悪性腫瘍の新生血管を標的とした遺伝子治療にも応用される可能性がある．また PSMA の生理的機能を理解する事は，普遍的な癌の増殖，特に血管新生の機序を解明する上で重要である．PSMA を用いた組織特異的な癌治療の臨床応用に向けて，enhancer と転写因子をはじめとした核蛋白との関連，PSMA の発現調節機構の解明などが今後の研究課題である．

総　括

PSMA enhancer の前立腺癌細胞における活性，および特異性を検証し，自殺遺伝子治療モデルを用いて臨床応用への可能性を検討し，以下の結果を得た．

1．PSMA enhancer として，強力な遺伝子転写活性を持つ 1.6 kb の領域を PSMA 遺伝子第 3 イントロン中に見出した．この enhancer の活性は前立腺由来細胞特異的であった．

2．PSMA promoter/enhancer の転写調節下に CD を発現させるプラスミドを用いて種々の癌細胞に遺伝子導入した．低濃度の 5-FC の暴露により前立腺癌細胞株に特異的な殺細胞効果が認められた．

3．ヌードマウスに移植された CD 遺伝子導入 C4-2 細胞に対して，5-FC による腫瘍縮小効果が得られたことから PSMA promoter/enhancer は *in vivo* でも転写活性を有することが確認された．

これらの結果から PSMA promoter/enhancer は前立腺癌を標的とした遺伝子治療のために有用であり，将来の臨床応用の可能性を示すものである．

本稿を終えるにあたり，御指導，御高閲を賜りました慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室村井勝教授に深謝いたします．また，多大なる御支援と御助言を頂きました国立病院東京医療センター泌尿器科斉藤史郎先生，防衛医科大学校泌尿器科吉村一良先生，慶應義塾大学泌尿器科堀口裕先生に感謝致します．さらに本研究直接の御指導，御支援を頂きました米国 The Cleveland Clinic Foundation, Department of Cancer Biology の Dr. Warren D.W. Heston, Dr. Denise S. O'Keefe, Dr. Dean J. Bacich, Dr. C T. Powell に感謝の意を表します．

本研究は CaPCURE（WDWH）および U.S. Army Medical Research Acquisition Activity, Ft. Detrick, MD；Grant numbers：DAMD 17-00-1-0043, DAMD 17-99-1-9523. より研究費を得た．

文　献

1) The Research Group for Population-based Cancer Registration in Japan : Cancer incidence and incidence rates in Japan in 1992-93 : estimates based on data from seven population-based cancer registries. Jpn J Clin Oncol 28 : 641-647, 1998
2) 黒石哲生，広瀬かおる，田島和雄，富永祐民：日本の癌死亡の将来予測. がん・統計白書. 篠原出版，東京，p. 171-185, 1999
3) Huggins C and Hodges CV : Studies on prostatic cancer. 1. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. Cancer Research 1 : 293-7, 1941
4) Chodak GW, Vogelzang NJ, Caplan RJ, Soloway M and Smith JA : Independent prognostic factors in patients with metastatic (stage D2) prostate cancer. The Zoladex Study Group. Jama 265 : 618-621, 1991
5) The Leuprolide Study Group : Leuprolide versus diethylstilbestrol for metastatic prostate cancer. The Leuprolide Study Group. N Engl J Med 311 : 1281-1286, 1984
6) Cline MJ, Stang H, Mercola K, Morse L, Ruprecht R, Brown J and Salser W : Gene transfer in intact animals. Nature 284 : 422-5, 1980
7) Mullen CA, Kilstrup M and Blaese RM : Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine : a negative selection system. Proc Natl Acad Sci USA 89 : 33-37, 1992
8) Austin EA and Huber BE : A first step in the development of gene therapy for colorectal carcinoma : cloning, sequencing, and expression of Escherichia coli cytosine deaminase. Mol Pharmacol 43 : 380-387, 1993
9) Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH and Blaese RM : In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. Science 256 : 1550-1552, 1992
10) Brand K, Arnold W, Bartels T, Lieber A, Kay MA, Strauss M and Dorken B : Liver-associated toxicity of the HSV-tk/GCV approach and adenoviral vectors. Cancer Gene Ther 4 : 9-16, 1997
11) van der Eb MM, Cramer SJ, Vergouwe Y, Schagen FH, van Krieken JH, van der Eb AJ, Rinkes IH, van de Velde CJ and Hoeben RC : Severe hepatic dysfunction after adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir administration. Gene Ther 5 : 451-458, 1998
12) Richards CA, Austin EA and Huber BE : Transcriptional regulatory sequences of carcinoembryonic antigen : identification and use with cytosine deaminase for tumor-specific gene therapy. Hum Gene Ther 6 : 881-893, 1995
13) Macri P and Gordon JW : Delayed morbidity and mortality of albumin/SV40 T-antigen transgenic mice after insertion of an alpha-fetoprotein/herpes virus thymidine kinase transgene and treatment with ganciclovir. Hum Gene Ther 5 : 175-182, 1994
14) Blackburn RV, Galoforo SS, Corry PM and Lee YJ : Adenoviral transduction of a cytosine deaminase/thymidine kinase fusion gene into prostate carcinoma cells enhances prodrug and radiation sensitivity. Int J Cancer 82 : 293-297, 1999
15) Gotoh A, Ko SC, Shirakawa T, Cheon J, Kao C, Miyamoto T, Gardner TA, Ho LJ, Cleutjens CB, Trapman J, Graham FL and Chung LW : Development of prostate-specific antigen promoter-based gene therapy for androgen-independent human prostate cancer. J Urol 160 : 220-229, 1998
16) Hall SJ, Mutchnik SE, Chen SH, Woo SL and Thompson TC : Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir therapy leads to systemic activity against spontaneous and induced metastasis in an orthotopic mouse model of prostate cancer. Int J Cancer 70 : 183-187, 1997
17) Herman JR, Adler HL, Aguilar-Cordova E, Rojas-Martinez A, Woo S, Timme TL, Wheeler TM, Thompson TC and Scardino PT : In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate : a phase I clinical trial. Hum Gene Ther 10 : 1239-1249, 1999
18) Israeli RS, Powell CT, Fair WR and Heston WD : Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen. Cancer Res 53 : 227-230, 1993
19) Pinto JT, Suffoletto BP, Berzin TM, Qiao CH, Lin S, Tong WP, May F, Mukherjee B and Heston WD : Prostate-specific membrane antigen : a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells. Clin Cancer Res 2 : 1445-1451, 1996
20) Carter RE, Feldman AR and Coyle JT : Prostate-specific membrane antigen is a hydrolase with substrate and pharmacologic characteristics of a neuropeptidase. Proc Natl Acad Sci USA 93 : 749-753, 1996
21) Liu H, Rajasekaran AK, Moy P, Xia Y, Kim S, Navarro V, Rahmati R and Bander NH : Constitutive and antibody-induced internalization of prostate-specific membrane antigen. Cancer Res 58 : 4055-4060, 1998
22) Heston WD : Characterization and glutamyl preferring carboxypeptidase function of prostate specific membrane antigen : a novel folate hydrolase. Urology 49 : 104-112, 1997
23) Cleutjens KB, van Eekelen CC, van der Korput HA, Brinkmann AO and Trapman J : Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. J Biol Chem 271 : 6379-6388, 1996

24) Cleutjens KB, van der Korput HA, van Eekelen CC, van Rooij HC, Faber PW and Trapman J : An androgen response element in a far upstream enhancer region is essential for high, androgen-regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. Mol Endocrinol 11 : 148-161, 1997
25) Suzuki S, Tadakuma T, Kunitomi M, Takayama E, Sato M, Asano T, Nakamura H and Hayakawa M : Liposome-mediated gene therapy using HSV-TK/ganciclovir under the control of human PSA promoter in prostate cancer cells. Urol Int 67 : 216-223, 2001
26) Suzuki S, Tadakuma T, Asano T and Hayakawa M : Coexpression of the partial androgen receptor enhances the efficacy of prostate-specific antigen promoter-driven suicide gene therapy for prostate cancer cells at low testosterone concentrations. Cancer Res 61 : 1276-1279, 2001
27) Israeli RS, Powell CT, Corr JG, Fair WR and Heston WD : Expression of the prostate-specific membrane antigen. Cancer Res 54 : 1807-1811, 1994
28) Gong MC, Chang SS, Watt F, O'Keefe DS, Bacich DJ, Uchida A, Bander NH, Reuter VE, Gaudin PB, Molloy PL, Sadelian M and Heston WD : Overview of evolving strategies incorporating prostate-specific membrane antigen as target for therapy. Mol Urol 4 : 217-222, 2000
29) O'Keefe DS, Su SL, Bacich DJ, Horiguchi Y, Luo Y, Powell CT, Zandvliet D, Russell PJ, Molloy PL, Nowak NJ, Shows TB, Mullins C, Vonder Haar RA, Fair WR and Heston WD : Mapping, genomic organization and promoter analysis of the human prostate-specific membrane antigen gene. Biochim Biophys Acta 1443 : 113-127, 1998
30) Soule HD, Vazguez J, Long A, Albert S and Brennan M : A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J Natl Cancer Inst 51 : 1409-1416, 1973
31) Tompkins WA, Watrach AM, Schmale JD, Schultz RM and Harris JA : Cultural and antigenic properties of newly establisned cell strains derived from adenocarcinomas of the human colon and rectum. J Natl Cancer Inst 52 : 1101-1110, 1974
32) Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA and Murphy GP : LNCaP model of human prostatic carcinoma. Cancer Res 43 : 1809-1818, 1983
33) Wu HC, Hsieh JT, Gleave ME, Brown NM, Pathak S and Chung LW : Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines : role of bone stromal cells. Int J Cancer 57 : 406-412, 1994
34) Cory AH, Owen TC, Barltrop JA and Cory JG : Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. Cancer Commun 3 : 207-212, 1991
35) Nishiyama T, Kawamura Y, Kawamoto K, Matsumura H, Yamamoto N, Ito T, Ohyama A, Katsuragi T and Sakai T : Antineoplastic effects in rats of 5-fluorocytosine in combination with cytosine deaminase capsules. Cancer Res 45 : 1753-1761, 1985
36) Horoszewicz JS, Kawinski E and Murphy GP : Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients. Anticancer Res 7 : 927-935, 1987
37) Watt F, Martorana A, Brookes DE, Ho T, Kingsley E, O'Keefe DS, Russell PJ, Heston WD and Molloy PL : A tissue-specific enhancer of the prostate-specific membrane antigen gene, FOLH1. Genomics 73 : 243-254, 2001
38) Zelivianski S, Comeau D and Lin MF : Cloning and analysis of the promoter activity of the human prostatic acid phosphatase gene. Biochem Biophys Res Commun 245 : 108-112, 1998
39) Riegman PH, Vlietstra RJ, van der Korput JA, Brinkmann AO and Trapman J : The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element. Mol Endocrinol 5 : 1921-1930, 1991
40) Hakalahti L, Vihko P, Henttu P, Autio-Harmainen H, Soini Y and Vihko R : Evaluation of PAP and PSA gene expression in prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma using northern-blot analyses, in situ hybridization and immunohistochemical stainings with monoclonal and bispecific antibodies. Int J Cancer 55 : 590-597, 1993
41) Wright GL, Jr., Grob BM, Haley C, Grossman K, Newhall K, Petrylak D, Troyer J, Konchuba A, Schellhammer PF and Moriarty R : Upregulation of prostate-specific membrane antigen after androgen-deprivation therapy. Urology 48 : 326-334, 1996
42) Silver DA, Pellicer I, Fair WR, Heston WD and Cordon-Cardo C : Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. Clin Cancer Res 3 : 81-85, 1997
43) Pangalos MN, Neefs JM, Somers M, Verhasselt P, Bekkers M, van der Helm L, Fraiponts E, Ashton D and Gordon RD : Isolation and expression of novel human glutamate carboxypeptidases with N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase and dipeptidyl peptidase IV activity. J Biol Chem 274 : 8470-8483, 1999
44) Chung LW : The role of stromal-epithelial interaction in normal and malignant growth. Cancer Surv 23 : 33-42, 1995
45) Ruokonen M, Shan JD, Hedberg P, Patrikainen L and Vihko P : Transfecting well-differentiated prostatic cancer cell line LNCaP. Biochem Biophys Res Commun 218 : 794-796, 1996
46) Petersen D, Demertzis S, Freund M, Schumann G and Oellerich M : Individualization of 5-fluorocytosine therapy. Chemotherapy 40 : 149-156, 1994

47) Marshall ME, Wolf M, O'Rourke M, Barnett TC and Crawford ED : Treatment of stage D2 hormone refractory carcinoma of the prostate with 5-fluoroura cil and Roferon-A : a Southwest Oncology Group study. Cancer Biother Radiopharm 11 : 119-123, 1996
48) Shinohara N, Demura T, Matsumura K, Toyoda K, Kashiwagi A, Nagamori S, Ohmuro H, Ohzono S and Koyanagi T : 5-fluorouracil and low-dose recombinant interferon-alpha-2a in patients with hormone-refractory adenocarcinoma of the prostate. Prostate 35 : 56-62, 1998
49) Kanai F, Kawakami T, Hamada H, Sadata A, Yoshida Y, Tanaka T, Ohashi M, Tateishi K, Shiratori Y and Omata M : Adenovirus-mediated transduction of Escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase gene sensitizes cancer cells to low concentrations of 5-fluorouracil. Cancer Res 58 : 1946-1951, 1998
50) Erbs P, Regulier E, Kintz J, Leroy P, Poitevin Y, Exinger F, Jund R and Mehtali M : In vivo cancer gene therapy by adenovirus-mediated transfer of a bifunctional yeast cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene. Cancer Res 60 : 3813-3822, 2000
51) Liu H, Moy P, Kim S, Xia Y, Rajasekaran A, Navarro V, Knudsen B and Bander NH : Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium. Cancer Res 57 : 3629-3634, 1997
52) Chang SS, Reuter VE, Heston WD, Bander NH, Grauer LS and Gaudin PB : Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. Cancer Res 59 : 3192-3198, 1999
53) Chang SS, O'Keefe DS, Bacich DJ, Reuter VE, Heston WD and Gaudin PB : Prostate-specific membrane antigen is produced in tumor-associated neovasculature. Clin Cancer Res 5 : 2674-2681, 1999