

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)
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.33-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030602-0033">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030602-0033</a>

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.

# Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Promoter/Enhancerを用いた 組織特異的自殺遺伝子治療

内 田 厚

## 内容の要旨

前立腺特異膜抗原（以下PSMA）は前立腺上皮細胞に発現する30kDの膜蛋白で前立腺癌細胞で過剰発現している。現在臨床で広く用いられる前立腺特異抗原（以下PSA）と異なり、PSMAの発現は抗アンドロゲン療法下で減弱せずむしろ増強することから、PSMAは前立腺癌治療の上で魅力的な標的となり得る。著者らは先にPSMA遺伝子の第3イントロン中に正の転写調節活性の存在することを発見した。本研究では、この転写調節領域が前立腺癌細胞中で強力かつ特異的に遺伝子を発現し、自殺遺伝子である大腸菌由来シトシンデアミナーゼ（以下CD）を用いた前立腺癌の遺伝子治療モデルで有用であるかを検討した。

PSMA遺伝子第3イントロンの2kb領域から、異なる長さのDNA断片をPCR法で作製し、ルシフェラーゼ発現プラスミドに組み込んだ。前立腺癌（LNCaP、C4-2細胞）及び、非前立腺癌細胞（MCF-7乳癌細胞、H157肺癌細胞、HCT8結腸癌細胞）に遺伝子導入して、ルシフェラーゼアッセイにより転写活性を定量した。最大の活性を有する塩基配列をPSMAプロモーターと組み合わせて、CD発現プラスミドに組み込んだ。これを上記の癌細胞株に遺伝子導入し、プロドラッグである5-フルオロシトシン（以下5-FU）に対する感受性を殺細胞試験で定量した。さらに同プラスミドをC4-2細胞に遺伝子導入し、ヌードマウスに皮下移植して（n=16）、600mg/kgの5-FUを21日間腹腔内投与することにより腫瘍縮小効果を観察した。対照として生食投与群を設け、さらに非CD発現プラスミド導入C4-2細胞移植群、親C4-2細胞移植群も同様の条件で観察し、腫瘍重量、宿主動物の血清PSA値、腫瘍組織所見を比較した。

ルシフェラーゼアッセイによる、最大の活性をもつ1.6kb領域をエンハンサー配列として同定した。このエンハンサーはPSMAプロモーターのみと比べて約100倍に転写を増強し、活性は前立腺癌細胞特異的であった。*in vitro*での5-FUの殺細胞効果は前立腺癌細胞へのPSMAプロモーター、エンハンサー転写調節下CD発現プラスミド導入により特異的に生じた。特にC4-2細胞では、10%未満の遺伝子導入効率で50%増殖阻止濃度が300 $\mu$ M以下となり、5-FUの生理的濃度にまで感受性の増強が見られた。ヌードマウスの皮下腫瘍モデルにおいては、同プラスミド導入C4-2細胞移植群に5-FUを腹腔内投与することにより腫瘍が著明に縮小した。

以上から、PSMAエンハンサーが前立腺特異的な遺伝子発現に有用であることを示し、将来の前立腺癌遺伝子治療への応用の可能性を示唆された。

## 論文審査の要旨

内分泌療法抵抗性前立腺癌に対し新たな治療が模索されているが、遺伝子治療はその有力な候補の一つである。癌に対する遺伝子治療では多くの場合、標的臓器への選択的な遺伝子導入、もしくは選択的な遺伝子発現が望まれる。後者の手段として、組織特異的エンハンサーを用いることが有用である。そこで本研究ではPSMA遺伝子の転写調節領域を探索し、組織特異性、前立腺癌の自殺遺伝子治療への応用の可能性が検討された。

その結果、PSMA遺伝子第3イントロンに見出されたPSMAエンハンサーは、前立腺癌LNCaP細胞とそのアンドロゲン非依存性株であるC4-2細胞で活性を有するが、3つの非前立腺癌細胞では活性を持たないことが示された。また、*in vitro*および*in vivo*において、PSMAエンハンサーの制御下で発現する大腸菌由来シトシンデアミナーゼ（CD）の遺伝子導入により、PSMA発現細胞で5-FUの殺細胞効果が発揮されることが示された。

審査においては、組織特異性を解明するため、より多くの細胞でエンハンサー活性を検討すべきと指摘された。これに対し、免疫組織染色、その他の解析結果によるとPSMAは前立腺に多く発現する一方、十二指腸、腎、唾液腺、脳、癌の新生血管などでも発現が認められることから、PSMAエンハンサーがこれらの組織中で活性を持つかさらに詳細に検討することが今後の課題であると回答された。続いて*in vivo*の実験においては安定遺伝子導入細胞が使われており、臨床的な遺伝子導入の条件との違いが指摘された。これに対し、現状では前立腺癌細胞へのリポソームを用いた一過性遺伝子導入は効率が低いため、アデノウイルスなど他のベクターを試みている事が回答された。

本実験モデルにおける非遺伝子導入細胞に対する殺細胞効果（bystander効果）の有無とその機序について質問があった。これに対し、今回の実験で細胞傷害性が細胞培養液を介して伝搬することが証明され、CD遺伝子療法によるbystander効果は細胞間の接着を必要としないという、これまでの報告を裏付ける結果であったと回答された。

また前立腺癌の化学療法における5-FUの意義についての質問があった。概して前立腺癌の抗癌剤に対する感受性は低いが、5-FUの低濃度持続投与は高濃度一過性投与と異なった制癌効果を有することが近年に明らかになり、CD遺伝子治療でも、5-FUの感受性を修飾する方法、すなわち放射線、インターフェロンなどの併用療法により、さらに治療効果の向上を期待できると回答された。

以上のように、本研究ではさらに改善すべき点があるものの、前立腺癌の遺伝子治療においてPSMAエンハンサーを用いた手法が有用な選択肢になることを示した点で意義があると評価された。

論文審査担当者 主査 泌尿器科学 村井 勝  
先端医科学 河上 裕 病理学 坂元 亨宇  
分子生物学 清水 信義 産婦人科学 野澤 志朗  
学力確認担当者：北島 政樹、河上 裕  
審査委員長：河上 裕

試問日：平成15年3月19日