

Title	Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticles
Sub Title	ヒト肝細胞特異的ナノ粒子を用いた肝腫瘍に対する遺伝子治療
Author	岩崎, 靖士
Publisher	慶應医学会
Publication year	2007
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.84, No.2 (2007. 6) ,p.29-
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=AN00069296-20070602-0029">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20070602-0029</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.

# Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticles

(ヒト肝細胞特異的ナノ粒子を用いた肝腫瘍に対する遺伝子治療)

岩 崎 靖 士

## 内容の要旨

遺伝子治療は肝細胞癌 (HCC) に対する新たな治療法として期待され、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子 (HSV-tk) とガンシクロビル (GCV) を用いた自殺遺伝子法 (HSV-tk/GCVシステム) もその一つである。しかし、治療遺伝子が標的細胞以外の細胞で発現した場合に予期せぬ副作用を起こす可能性があるため、治療遺伝子が正しくその効果を発揮するためには、遺伝子を標的細胞へ特異的に送達するベクターが望まれる。肝細胞特異的ナノ粒子 (HBsAgLナノ粒子) の表面には、B型肝炎ウイルスが肝細胞に感染する際に必要なヒト肝細胞レセプターを含むpre-S1領域が提示されており、かつウィルスゲノムが完全に排除されている。前報でこのLナノ粒子がマウスモデルにおいてヒト肝細胞を特異的に認識することを報告した。本研究では、Lナノ粒子を治療遺伝子のベクターとして用い、肝腫瘍に対するHSV-tk/GCVシステムの抗腫瘍効果をラットモデルで検討することを目的とした。

遺伝子組換え酵母*Saccharomyces cerevisiae* AH22Rより分離精製したHBsAgLナノ粒子を遺伝子ベクターとして用いた。GFP発現プラスミドおよびHSV-tkプラスミド、それぞれ20 $\mu$ gをLナノ粒子100 $\mu$ gと混合し、エレクトロポレーション法にて封入した。F344/Nヌードラット皮下にヒト肝腫瘍培養細胞株NuE、ヒト大腸癌培養細胞株WiDrを移植した。GFP発現実験ではGFPプラスミド封入Lナノ粒子をラットに静注後7日目に皮下腫瘍、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、腸管、骨格筋を摘出し、樹脂固定後、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡にて各組織のGFP発光の有無を比較検討した。自殺遺伝子治療実験では腫瘍移植日よりラットに持続的にGCVを投与し、腫瘍移植日から5日目にHSV-tk封入Lナノ粒子を静注した。粒子静注後2、4、7日目に腫瘍体積を測定し、抗腫瘍効果を検討した。

GFP発現実験で摘出した皮下腫瘍 (NuE、WiDr)、肝臓、脾臓、腎臓の大きさと重量をコントロール群と比較したところ各組織の大きさ、重量には差は認められなかった。GFP発光はNuE腫瘍のみに認められ、PBSを静注したコントロール群ではNuE腫瘍を含むいずれの組織も発光を認めなかった。自殺遺伝子治療実験では、HSV-tk封入Lナノ粒子静注群のNuE腫瘍の成長がコントロール群に比べ有意に抑制された一方、WiDr腫瘍の成長は粒子静注群と、コントロール群で差が認められなかった。

以上の結果よりLナノ粒子がヒト肝細胞を特異的に認識し、ヒト肝腫瘍に対して安全な治療遺伝子ベクターになりうる可能性が示された。

## 論文審査の要旨

本研究では、従来より報告してきた、遺伝子治療のベクターとしてヒト肝細胞特異的Lナノ粒子の生体に対する安全性、ならびに、HSV-tkを導入したLナノ粒子を作製し、ヒト肝腫瘍株の皮下移植ラットモデルにてヒト肝腫瘍に対するGCVの抗腫瘍効果を実験的に明らかにした。

審査ではまず、酵母から産生されるLナノ粒子中の酵母由来のタンパク質の混入に対する安全性の確認がなされた。酵母の全可溶性タンパク質の約40%がLナノ粒子のタンパク質を構成しており、そのタンパク質の安全性は、同様の産生過程をとっているB型肝炎ワクチンがすでに市販されていることから高い安全性を確保していると考えられると回答された。続いてLナノ粒子のヒト肝細胞への結合様式に対する質問がなされた。ヒト肝細胞への特異的結合部位は粒子のpreS1領域に存在することまで明らかになっている一方で、その結合様式についてはまだ完全に解明されておらず、今後の検討課題とされた。HSV-tk/GCVシステムのbystander effectによる腫瘍組織周囲の正常肝細胞への影響や、未分化肝癌に対する本ベクターの認識能についての質問がなされたが、このLナノ粒子には正常肝組織と癌組織を判別する能力はなく、腫瘍への特異性を向上させるためにはAFP等の腫瘍組織に特異的なプロモーターを導入する必要があると回答された。リポソームやアデノウイルス等の遺伝子導入ベクターとの比較において、遺伝子導入効率の高さ、導入できる遺伝子の大きさが、最大40kbまで確認されている点、ウィルスDNAを含まず、生体に対する安全性の高さ、そしてヒト肝組織に対する高い特異性や、preS1領域の変更による組織再標的化が可能という点で、現状で存在する遺伝子ベクターに対する有利点が示された。一方で、治療ベクターとして生体に用いた際には大量かつ複数回の投与を必要とされるため、宿主に対する免疫原性の克服が重要であると指摘された。B型肝炎ワクチン接種者の中に生じるHBVエスケープ変異体を今後Lナノ粒子に導入する予定であり、実験を行っているという回答された。

また今回はヒト肝腫瘍に対する治療効果の検討をしたが、非腫瘍性疾患に対する臨床応用の可能性について質問された。血友病等の単一遺伝子欠損症に対する遺伝子補充療法や、インターフェロン遺伝子を導入した、マラリア、肝炎、肝硬変治療に応用が期待されると回答されたが、腫瘍移植モデルではなく、ヒト正常肝組織を移植した動物実験モデルでの検討が必要であるとの助言がなされた。

以上のように、本研究は今後、粒子構造のヒト肝細胞に対する親和性についての詳細な検討や、免疫原性の克服など検討されるべき課題を残しているものの、肝疾患に対する新しい治療遺伝子ベクターになりうる可能性を示した点で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹  
内科学 日比 紀文 先端医科学 河上 裕  
分子生物学 清水 信義  
学力確認担当者：池田 康夫  
審査委員長：日比 紀文

試問日：平成18年12月26日