

機関番号：32651

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591868

研究課題名 (和文) ホルモン抵抗性前立腺癌に対する新しい遺伝子治療の開発

研究課題名 (英文) Development of novel gene therapy for hormone refractory prostate cancer

研究代表者

清田 浩 (KIYOTA HIROSHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30153240

研究成果の概要 (和文)：本研究はホルモン抵抗性前立腺癌への新しい治療法として、アンドロゲン除去環境下でも前立腺癌細胞特異的に高力価で遺伝子導入を行う、新規ウイルスベクターシステムの開発を目的として研究を行った。前立腺特異的プロモーターを用いたレンチウイルスベクターを作成し、*in vitro* および *in vivo* 実験系により、抗腫瘍効果を検討した。ベクターは前立腺癌モデルにおいて抗腫瘍効果を示し、その有効性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The aim of this study is to develop the new gene therapy using lentiviral vector with prostate-specific promoter that induces therapeutic gene to prostate cancer specifically. Lentiviral vectors with prostate-specific promoters were constructed and the efficiency was observed *in vitro* and *in vivo* models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：(1) 癌 (2) 泌尿器科 (3) 前立腺癌 (4) 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は欧米先進国において男性が罹患する最も頻度の高い癌であり、高齢化社会を迎えた本邦においてもその頻度は近年急速に増加し、最も注目されている疾患のひとつである。前立腺癌はアンドロゲン依存性に発育することから、進行性および再発前立腺癌に対してはアンドロゲン遮断療法が選択されるが、多くの場合、治療開始後5年以内にホルモン抵抗性を獲得して再燃する。再燃癌に対する有効な治療法はなく、ほとんどの前立腺癌患者が再燃により癌死している現在、ホルモン抵抗性前立腺癌に対する新た

な治療法の開発が急務である。近年ホルモン抵抗性獲得の新たな機序として前立腺癌幹細胞の存在が提唱されている。前立腺癌幹細胞は静止期にあり、またアンドロゲンレセプター(AR)が発現していないため通常ホルモン療法などの前立腺癌治療では残存し、それが再燃癌発生の機序であろうと考えられている。そのため、癌幹細胞を標的とした治療戦略が前立腺癌の根治には必要であると考えられる。

前立腺癌幹細胞は静止期にあり、AR など治療の標的となる蛋白の発現様式が通常の前立腺癌と異なるため、これまでの治療法は

効果が低いと考えられている。そこで、癌幹細胞に有効な新しい治療法として遺伝子治療が期待されている。近年前立腺癌に対する新たな治療として遺伝子治療が試みられ、本邦でも臨床試験が行われているが、現状のウイルスベクターを用いた遺伝子治療は遺伝子導入効率、安全性の面で深刻な問題を抱えている。レンチウイルスベクターは宿主DNAに組み込まれ、長期の遺伝子発現が可能なウイルスベクターである。さらに水疱性口内炎ウイルスG蛋白(VSV-G)エンベロープでシェードタイプ化したベクターは高濃度に濃縮が可能で、静止期細胞にも感染することから、造血幹細胞への遺伝子導入などでは既に臨床応用されている。これらの特性は癌幹細胞を標的とした新たな治療法としても期待されている。しかし宿主DNAに組み込まれるレンチウイルスは長期の遺伝子発現が期待できる半面、正常細胞への insertional mutagenesis (挿入変異) による発癌という深刻な問題を抱える。この問題を克服するため、研究分担者である木村らは臓器特異的プロモーターを用いたウイルスベクターを開発してきた(Kimura T, et al. Mol Ther. 2007; 15(7):1390-9.)。しかし、これまで前立腺癌に使用されてきた多くの前立腺特異的プロモーターはアンドロゲン依存性に働くため、その多くが前治療によりアンドロゲンが去勢レベルにあるホルモン抵抗性前立腺癌患者への実用化は困難であった。本研究ではアンドロゲン非依存性に働く前立腺特異的プロモーターである PSES プロモーター

2. 研究の目的

(Lee SJ et al, Mol Ther. 2002, 3:415-21) を用いることで、ホルモン抵抗性前立腺癌に対する根治的な遺伝子治療の開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) 前立腺特異的レンチウイルスベクターの作製

第三世代 self inactivating レンチウイルスベクターのベクタープラスミドのCMVプロモーターを前立腺特異的プロモーターと置換し、前立腺特異的レンチウイルスベクターを作製した(図1)。置換した前立腺特異的プロモーターは、PSESプロモーター、ARR2PBプロモーター、PCA3プロモーターの3種類を用いた。導入遺伝子はマーカー遺伝子で

ある Green Fluorescent Protein (GFP) および治療遺伝子として yeast cytosine deaminase (yCD) を使用した。これらのベクタープラスミドと VSV-G エンベローププラスミド、ウイルス構成蛋白である gag, pol 発現プラスミドおよび rev 発現プラスミドの4種類のパッケージングプラスミドを293T細胞に co-transfection させることでプロウイルスを産生し、更に超遠心機で濃縮し、高濃度ウイルス液を作成した。

図1 作成ベクター

PRL-SIN (SINベクタープラスミド)

pRRL-cPPT-ARR2PB-GFP

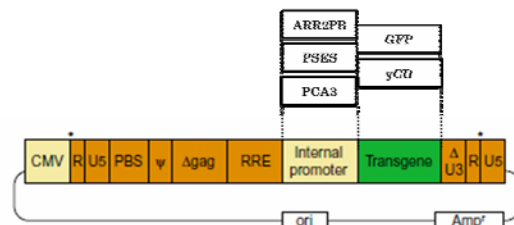
pRRL-cPPT-ARR2PB-yCD

pRRL-cPPT-PSES-GFP

pRRL-cPPT-PSES-yCD

pRRL-cPPT-PCA3-GFP

pRRL-cPPT-PCA3-yCD



(2) In vitro 実験系による臓器特異性・導入効率の検討

① ヒト前立腺癌細胞株における遺伝子導入効率および特異性の検討

ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP およびコントロールとして前立腺癌以外の細胞株 293T およびヒト膀胱癌細胞株 RT4 に GFP 発現レンチウイルスベクターを感染させ、48 時間後の GFP 発現を解析し、導入効率および臓器特異性を検討した。また、アンドロゲン除去環境下でも同様の実験を行い、同ベクターのアンドロゲン非依存性を確認した。

② ヒト前立腺癌幹細胞分画への遺伝子導入の検討

慈恵医大病院で得られた前立腺癌手術摘除検体から前立腺癌初代培養を樹立した (JDCaP 細胞)。細胞はホルモン依存性を有し、ヌードマウス皮下移植により継代可能である。JDCaP の *in vitro* における培養および癌幹細胞の同定を試みた。

③ In vitro 実験系による治療効果の検討

ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP およびコントロール細胞 (293T および RT4) に yeast cytosine deaminase (yCD) 発現レンチウイルスベクターを感染させ、48 時間後に 5-fluorocytosine を投与し、ベクターによる治療効果を検討した。

(3) In vivo 腫瘍モデルによる治療効果の検討

8 週齢の雄ヌードマウス皮下に前立腺癌

細胞 LNCaP, JDCaP およびコントロール細胞 RT4 を移植する。腫瘍径が 5mm になったところで, yCD 発現レンチウイルスベクターを腫瘍内投与する。48 時間後より 5-fluorocytosine を 2 週間連日腹腔内投与し, 治療効果を判定する。5-fluorocytosine は遺伝子導入細胞で発現している yCD により, 5-fluorouracil へと代謝され抗腫瘍効果を発揮する。また, 皮下腫瘍が樹立した後にマウスを去勢し, 腫瘍が再増殖した時点でベクターを投与し, 同様の検討を行い, 治療効果がアンドロゲン非依存性に認められることを検討する。さらに長期生存したマウスの臓器から DNA を抽出し, ウイルスシーケンスを標的とした定量的リアルタイム PCR にて正常多臓器へのウイルス播種を検討する。また, 長期生存マウスの発癌等, ベクターの安全性を検討する。

4. 研究成果

(1) 前立腺特異的レンチウイルスベクターの作製

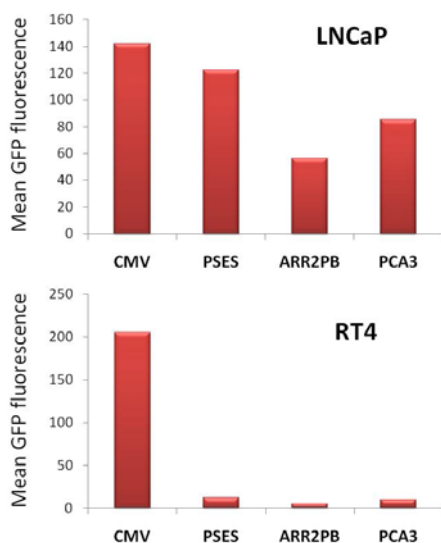
「研究の方法」に記載した方法に従い, 前立腺特異的レンチウイルスベクターを作成した。また, 高濃度ウイルス液の濃縮にも成功した。

(2) In vitro 実験系による臓器特異性・導入効率の検討

①ヒト前立腺癌細胞株における遺伝子導入効率および特異性の検討

LNCaP および 293T および RT4 に GFP 発現レンチウイルスベクターを感染させ, 48 時間後の GFP 発現を観察した。非特異的 CMV プロモーターレンチウイルスベクターがすべての細胞で GFP を強発現していたのに対し, PSES プロモーター, ARR2PB プロモーター, PCA3 プロモーターレンチウイルスベクターすべてが前立腺細胞特異的な遺伝子発現を示した (図 2)。

図2 前立腺特異的レンチウイルスベクターの遺伝子導入



②ヒト前立腺癌幹細胞分画への遺伝子導入の検討

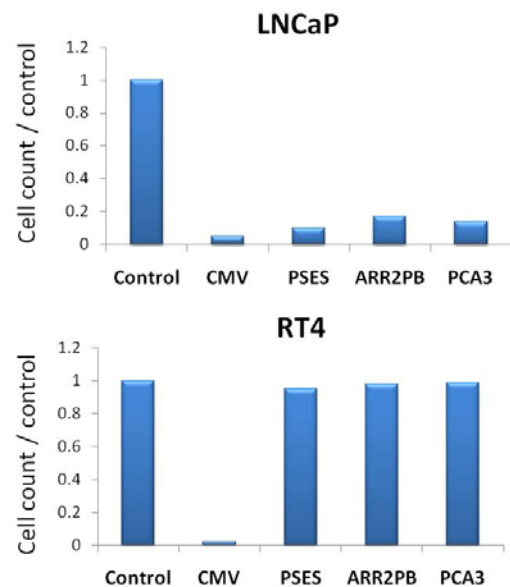
慈恵医大病院で得られた前立腺癌手術摘除検体から前立腺癌初代培養を樹立した (JDCaP 細胞)。細胞はホルモン依存性を有し, スドマウス皮下移植により継代可能であった。JDCaP の *in vitro* における培養および癌幹細胞の同定を試みた。

多種の培養液, 不死化を試みたが, JDCaP の *in vitro* 培養系の樹立には至らなかった。また, それに伴い癌幹細胞の同定にも至らなかった。今後の検討課題として, hTERT 発現レンチウイルスベクターなどによる不死化などの方法を検討する必要があることが示唆された。

③In vitro 実験系による治療効果の検討

ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP およびコントロール細胞 (293T および RT4) に yeast cytosine deaminase (yCD) 発現レンチウイルスベクターを感染させ, 48 時間後に 5-fluorocytosine を投与し, さらに 48 時間後 cell count 法にて, ベクターによる治療効果を検討した。非特異的 CMV プロモーターレンチウイルスベクターがすべての細胞で抗腫瘍効果を示したのに対し, PSES プロモーター, ARR2PB プロモーター, PCA3 プロモーターレンチウイルスベクターすべてが前立腺細胞特異的な遺伝子発現を示した前立腺癌特異的に抗腫瘍効果を示した (図 3)。

図2 前立腺特異的レンチウイルスベクターによる抗腫瘍効果

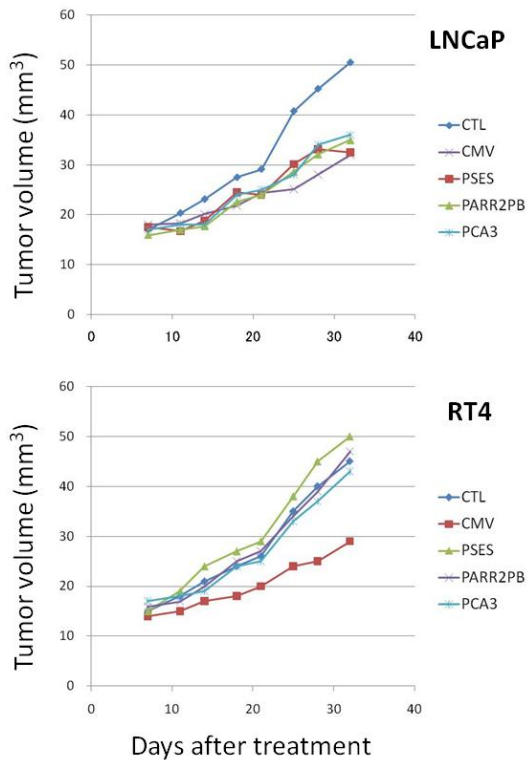


(3) In vivo 腫瘍モデルによる治療効果の検討

ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP, JDCaP および

コントロール細胞 RT4 をヌードマウス皮下に移植後、腫瘍が触知された段階で、yeast cytosine deaminase (yCD) 発現レンチウイルスベクターを腫瘍内投与し、48 時間後に 5-fluorocytosine を腹腔内投与することで、ベクターによる治療効果を検討した。非特異的 CMV プロモーターレンチウイルスベクターがすべての細胞で抗腫瘍効果を示したのに対し、PSES プロモーター、ARR2PB プロモーター、PCA3 プロモーターレンチウイルスベクターすべてが前立腺細胞特異的な遺伝子発現を示し、新規遺伝子治療の有効性が示唆された (図 4)。

図2 前立腺特異的レンチウイルスベクターによる *in vivo* 抗腫瘍効果



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清田 浩 (KIYOTA HIROSHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30153240

(2) 研究分担者

木村高弘 (KIMURA TAKAHIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：00307430

三木淳 (MIKI JUN)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：00328361

(3) 連携研究者

なし