

Caveolin-1 プロモーターを用いた Herpes Simplex Virus-thymidine kinase 遺伝子発現アデノウィルスによる 前立腺癌遺伝子治療における有効性と安全性の検討

江 原 伸

キーワード: caveolin-1 promoter, prostate cancer cell line, orthotopic model

緒 言

前立腺癌はアメリカ合衆国において男性癌死の第1位であり¹⁾, 日本においても近年患者数ならびに死亡者数が増加している。癌が前立腺内に限局している早期癌では前立腺全摘出術が一般的に行われているが, 前立腺被膜外に浸潤し手術適応のない場合や遠隔転移を認める進行癌に対しては主としてホルモン療法が選択される。しかし数年後に局所再発や遠隔転移病巣の出現ないし増強が認められることがあり, 特にホルモン療法中に再燃した場合は現在のところ有効な治療法が確立されていない。このような再燃性前立腺癌に対する新たな試みとして遺伝子治療法が注目されている。

遺伝子治療法のひとつとしてアデノウィルスベクターに組み込まれた Herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tk) 遺伝子の導入とそれに続く抗ウィルス薬である Gancyclovir (GCV) の投与を行う, いわゆる自殺遺伝子治療がある。この自殺遺伝子治療に特徴的なのは, 遺伝子が導入された細胞数よりも多くの細胞が障害されるという by-

stander effect 現象が認められることであり²⁾⁴⁾, このことは必ずしも全ての細胞に HSV-tk 遺伝子が導入される必要がないことを意味している。Eastham らはヒトまたはマウスの前立腺癌細胞株を用いて HSV-tk/GCV 遺伝子治療の in vitro, in vivo における有効性⁵⁾, Herman らは放射線治療後に局所再発を起こした前立腺癌患者での HSV-tk 遺伝子治療の第1相試験においてその安全性と有効性を報告している⁶⁾。また, HSV-tk アデノウィルスベクターを用いた自殺遺伝子治療の前臨床研究, 臨床研究は前立腺癌のみならず様々の癌種に対しても実施されている⁷⁾⁸⁾⁹⁾。

これらの研究において用いられているアデノウィルスベクターに組み込まれるプロモーターは Cytomegalovirus (CMV) プロモーターまたは Rous sarcomavirus (RSV) プロモーターである。これらのプロモーターは癌細胞もしくは臓器に特異的なプロモーターではないこと, ならびに CMV プロモーター HSV-tk アデノウィルスベクターの大腸癌肝転移モデルで肝機能障害が引き起こされたという報告¹⁰⁾など問題点も少なくない。そこで腫瘍が特異的に産生する糖蛋白などを標的としたプロモーターを用いることで HSV-tk 遺伝子が正常細胞には発現されず, 腫瘍組織内だけに発現されるような試みが行われている¹¹⁾¹²⁾¹³⁾。しかし, in vivo において CMV プロモーター, RSV プロモーター HSV-tk に匹敵するような抗腫瘍効果が誘導されるかについては未だ検

(平成13年7月24日受理)

岡山大学大学院医歯学総合研究科泌尿器病態学

指導: 公文裕巳教授

論文請求先: 岡山大学大学院医歯学総合研究科泌尿器病態学教室

電話: 086-235-7287 FAX: 086-231-3986

E-mail: uro2@md.okayama-u.ac.jp

討段階にある。

一方, Nasu らは細胞膜の陥凹である caveola の構成蛋白である caveolin-1 導入によってホルモン依存性前立腺癌細胞がホルモン抵抗性を示すこと, caveolin-1 が転移性またはホルモン抵抗性前立腺癌細胞に過剰発現されていること, またホルモン抵抗性前立腺癌細胞の caveolin-1 発現を実験的に抑制することでホルモン抵抗性細胞のホルモン依存性が回復することを報告した¹⁴⁾。そこで今回 caveolin-1 プロモーターを用いた HSV-tk アデノウィルスベクターを作成して, 従来のプロモーターとの比較を行うこととした。比較に際し, 現時点の HSV-tk 遺伝子治療が前立腺局所投与を前提としたものであることより, caveolin-1 が正常前立腺において平滑筋細胞や血管内皮細胞にも局在することが in vivo の治療においてはより高い抗腫瘍効果につながる可能性を考えて実験を組み立てた。同時に, 局所投与といえども血中への溢流にともない肝障害につながる可能性もあり, 安全性という観点からも CMV, RSV プロモーターとの比較を試みた。

材 料 と 方 法

1) Prostate cancer cell line

Caveolin-1 高発現前立腺癌細胞株として PC-3, 178BMA, Caveolin-1 低発現前立腺癌細胞株として LNCaP, 178PA を用いた。ヒト前立腺癌細胞株である PC-3, LNCaP はそれぞれ Ham's F12K, RPMI 1640 を培養液として用いた。マウス前立腺癌細胞である 178PA, 178BMA は Thompson らにより確立された mouse prostate reconstitution (MPR) system によって得られた 129SV 由来マウス前立腺細胞株である¹⁵⁾。細胞培養はそれぞれの培養液中で 37°C, 5% CO₂ 下で静置培養を行い, 継代は 0.025% trypsin にて行った。使用された薬品はすべて GIBCO Labs (Gaithersburg) より購入した。

2) アデノウィルスベクター

アデノウィルスベクターは以前報告された方法にて¹⁶⁾ Dr. Timothy Thompson Lab. で作製されたものである。ウィルス titer は 293 細胞内で決定され,

plaque-forming units (pfu) として表現した。

3) In vitro transduction

HSV-tk 遺伝子導入と GCV によるヒトまたはマウス前立腺癌細胞株に対する細胞障害活性を調べるため, 各細胞数を 2.5×10^4 cells/cm² に培養後, 100 MOI の濃度にて各アデノウィルスベクターを導入した。導入時間中は培養液を serum-free medium (SFM: DMEM, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.1% bovin serum albumin) に変え, 2 時間感染させた。培養液を新しい SFM に変え 24 時間培養した後, PBS もしくは GCV を 10 µg/ml に濃度調節した培養液で 72 時間培養した。トリプシン処理後, 生細胞を trypan blue で染色し染色された細胞数を測定した。

4) マウス前立腺癌同所移植モデルを用いた in vivo gene therapy

HSV-tk アデノウィルスベクターとそれに引き続く GCV 治療によるマウス前立腺癌細胞に対する in vivo 効果を評価するため, トリプシン処理したマウス前立腺細胞株 178BMA を Hank's balanced saline solution (HBSS) に single cell suspension とし生細胞数 5×10^3 個/10 µl の細胞浮遊液を同種の 129SV マウス前立腺に注入した。注入 7 日後, 各 HSV-tk アデノウィルスベクターを 5×10^8 pfu/25 µl になるよう HBSS で希釈し, 腫瘍内に注入した。この時, 腫瘍全体にベクター溶液が暴露されるよう針先を調整した。ベクター注入翌日から 6 日間, GCV 100 mg/kg body を一日 2 回, 12 時間毎に腹腔内投与した。

ベクター注入 14 日後, マウスを屠殺し腫瘍のサイズを測定した。ホルマリン固定, パラフィン包埋された腫瘍組織は, 4–5 µm 切片にスライスし標本を作製した。また腫瘍組織は OCT compound 内にも凍結保存し, 4–5 µm 切片にスライスし, 免疫組織学的検討のためアセトンにて固定した。

5) Quantitative immunohistochemical analysis

OCT compound 内に凍結保存された腫瘍組織を 4–5 µm 切片にスライスしアセトンにて固定した後, avidin-biotin-peroxidase Vectastain Elite

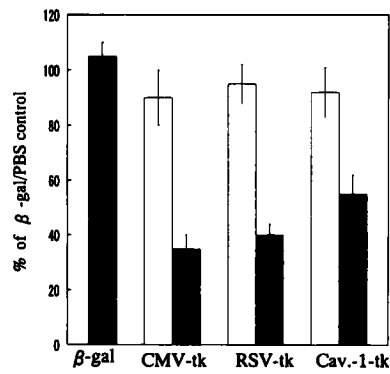
ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて免疫染色法を行った。primary antibody として anti-CD 4 (clone : H129.19, PharMingen), anti-CD 8 (clone : 53-6.7, PharMingen), anti-Factor VIII (rabbit polyclonal A 0082, Dako) を使用した。Second antibody は biotinylated goat anti-rat immunoglobulin (Vector Laboratories) を使用した。また apoptosis index, % necrosis を測定するため、ホルマリン固定、パラフィン包埋された腫瘍組織を 4-5 μ m 切片にスライスした後 TUNEL 法によって解析した。腫瘍組織の

necrosis, apoptosis は computer-assisted image analyzer (Bioscan) によって定量的に測定した。

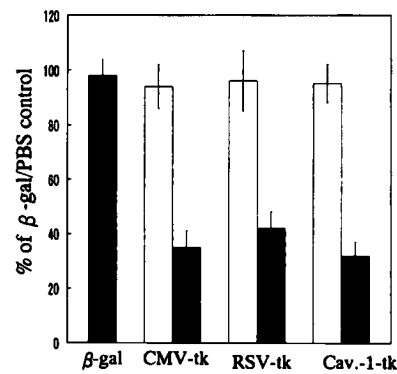
6) In vivo vector toxicity

各種 HSV-tk アデノウィルスベクターを用いた自殺遺伝子治療による副作用を検討するため、血清 Aspartate aminotransferase (AST) レベルをモニタリングして肝障害の評価を行った。各 HSV-tk アデノウィルスベクターを 1×10^9 pfu/100 μ l になるよう HBSS で希釈し、マウスの尾静脈より注入、翌日より 6 日間 GCV 10mg/kg を 1 日 2 回、12 時間毎に腹腔内投与した。ベクター注入 1 日後、2 日後、3 日

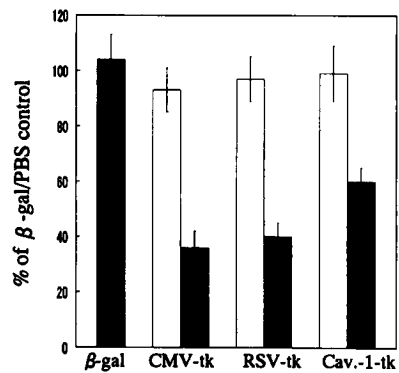
A. 178PA



B. 178BMA



C. LNCap



D. PC-3

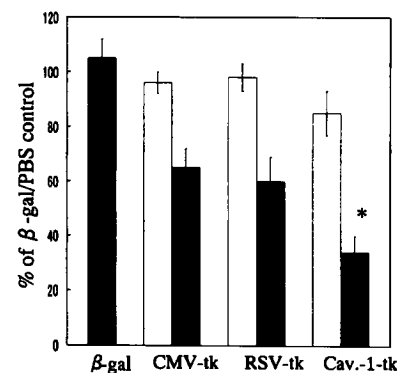


Fig. 1 In vitro cytotoxicity
RSV-β-gal /PBS コントロールとの細胞数の比較
□-PBS 処理, ■-GCV 処理
PC-3 細胞において RSV-β-gal/GCV と比較して有意差が認められた ($P < 0.038$)
Bars : Means $\pm$ standard deviation (SD)

後, 7日後, 14日後にマウスを屠殺し血液を採取, 血液を2000rpm/min で遠心分離し血清を採取し, AST 値を測定した。

結 果

1) In vitro cytotoxicity

プロモーターの違いによる HSV-tk 遺伝子の細胞障害活性をマウス前立腺癌細胞株, およびヒト前立腺癌細胞株を用いて比較検討した (Figure 1)。コントロールベクターとして RSV プロモーター下で bacterial β -galactosidase 遺伝子が組み込まれたアデノウィルスベクター (RSV- β -gal) を使用した。RSV- β -gal 導入後 PBS 入り培養液にて72時間培養し測定された細胞数を基準値とし, それぞれの治療群での細胞数を%で表示した。Caveolin-1 を相対的に高発現している178BMA マウス細胞株では有意差はないものの, Cav.-1-tk 群において生存細胞数が減少しており(32%), より強い細胞障害活性を示すことが認められた (Figure 1 C)。さらに Caveolin-1 を相対的に高発現しているヒト前立腺癌細胞である PC-3 細胞では Cav.-1-tk 群 (34%) において CMV-tk 群 (65%) に比べ細胞障害活性に有意な差が認められた ($P < 0.038$) (Figure 1 D)。一方 Caveolin-1 発現が相対的に低い178PA, LNCap 細胞株では Cav.-1-tk の効果が弱いことが認められた (Figure 1 A, 1 B)。

2) マウス前立腺癌同所移植モデルを用いた in vivo gene therapy

in vitro での caveolin-1 高発現細胞に対する Cav.-1-tk アデノウィルスベクターの細胞障害活性効果に基づき, 178BMA を用いて in vivo における抗腫瘍効果を比較検討した (Figure 2)。コントロール群に比して各治療群では primary tumor のサイズが有意に抑制されていた。Cav.-1-tk (1.02 ± 0.3 g : wet weight $\pm$ SD), CMV-tk (1.23 ± 0.34 g), RSV-tk (1.56 ± 0.35 g) 各群間に有意な差は認められなかったが, Cav.-1-tk において腫瘍形成は最も抑制されていた。

3) Quantitative immunohistochemical analysis

腫瘍抑制のメカニズムを評価するため, 屠殺したマウスの腫瘍組織中の apoptosis 及び necrosis level を評価した (Figure 3)。Apoptosis index は RSV- β -gal コントロール群 (0.98 ± 0.15 cells/hp) に比して全ての治療群において有意に上昇していたが, 各治療群間には有意な差は認めなかった (Cav.-1-tk : 2.52 ± 0.98 cells/hp, CMV-tk : 2.27 ± 0.74 cells/hp, RSV-tk : 1.73 ± 0.68 cells/hp, Figure 3 A)。

一方, % necrosis は Cav.-1-tk 群 (17.3 ± 2.9 %/hp) において RSV- β -gal コントロール群 (8.5 ± 1.4 %/hp) に比して有意に高値を示した (Figure 3 B)。また, factor VIII を指標とした microvessel density については, Cav.-1-tk 群 (16.6 ± 2.1 cells/hp), RSV-tk 群 (19.2 ± 3.0 cells/hp) において RSV- β -gal コントロール群 (29.9 ± 3.4 cells/hp) に比して有意に低下していた (Figure 3 C)。

次に HSV-tk アデノウィルスベクターによって誘導された T cell の腫瘍内浸潤を評価するため CD 4, CD 8 positive T cell を顕微鏡下に測定し, その評

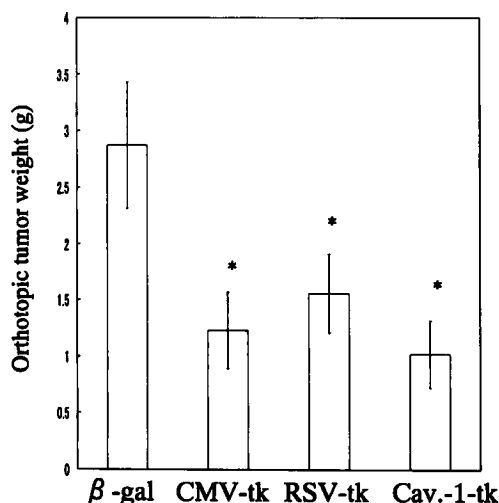


Fig. 2 In vivo gene therapy
 5×10^6 pfu の HSV-tk アデノウィルスベクターを orthotopic tumor に injection した。RSV- β -gal に比して HSV-tk による治療群すべてにおいて腫瘍サイズは有意に縮小していた ($P < 0.0005$)。Bars : Means $\pm$ standard deviation (SD)

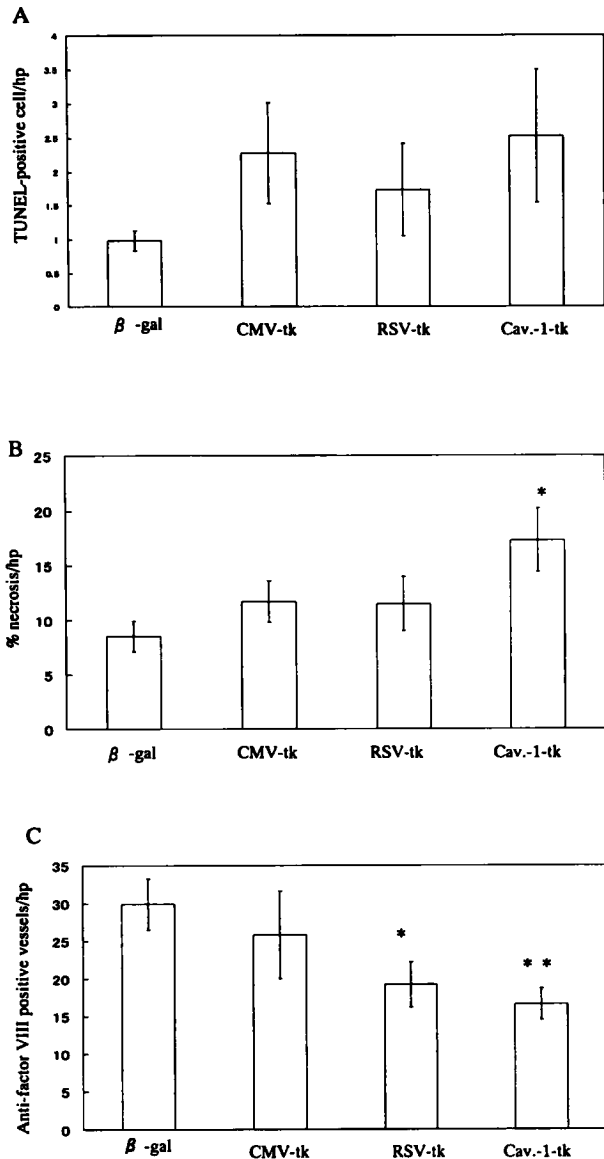


Fig. 3 Quantitative immunohistochemical analysis
 A: Apoptosis index. HSV-tk 治療群すべてにおいて RSV-β-gal コントロールに比して有意差を認めた (CMV-tk: $p < 0.005$, RSV-tk: $p < 0.05$, Cav.-1-tk: $p < 0.005$).
 B: % necrosis. Cav.-1-tk においてのみ RSV-β-gal コントロールとの比較にて有意差を認めた ($P < 0.05$).
 C: microvessel density. RSV-tk ($P < 0.05$), Cav.-1-tk ($P < 0.005$) において RSV-β-gal コントロールとの比較にて有意差を認めた. Bars: Means $\pm$ standard deviation (SD)

価を行った (Figure 4). CD4 positive T cell においては各治療群間に差は認められなかった (Cav.-1-tk: 7.9 ± 1.7 cells/hp, CMV-tk: 8.4 ± 1.2 cells/hp, RSV-tk: 7.6 ± 1.3 cells/hp, RSV-β-gal: 4.8 ± 1.3 cells/hp, Figure 4 A). CD-8 positive T cell においてもコントロール群との間で有意な差は認められなかったものの, Cav.-1-tk 群 (11.2 ± 3.3 cells/hp) において CD-8 positive T cell の数が多い傾向が見られた (CMV-tk: 8.9 ± 1.6 cells/hp, RSV-tk: 9.2 ± 1.6 cells/hp, RSV-β-gal: 7.6 ± 2.2 cells/hp, Figure 4 B).

4) in vivo vector toxicity

各種 HSV-tk アデノウィルスベクターを用いた自

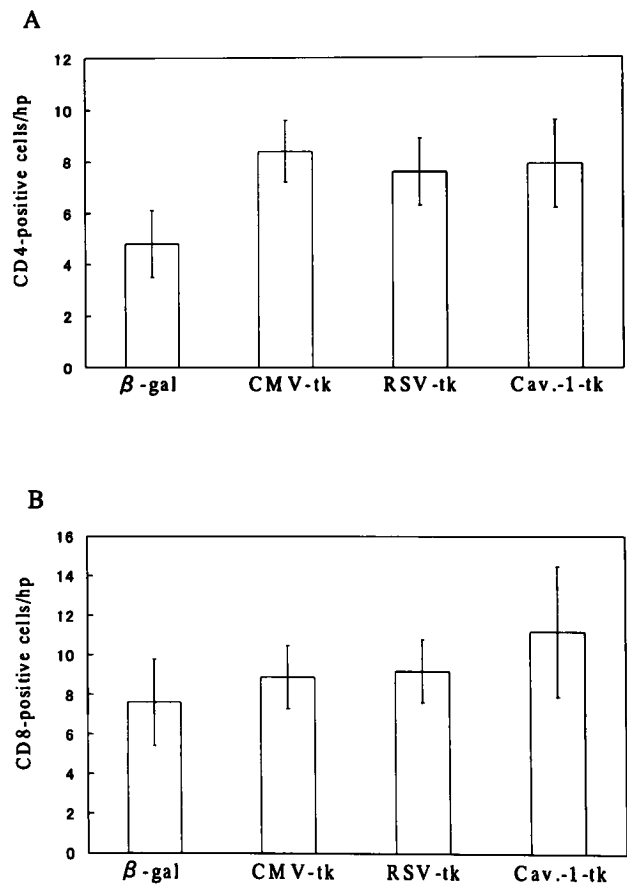


Fig. 4 Tumor infiltrating T cell analysis
 A: CD4-positive T cells
 B: CD8-positive T cells
 Bars: Means $\pm$ standard deviation (SD)

殺遺伝子治療副作用を、肝障害を指標として検討するため各アデノウィルスベクターをマウスの尾静脈より注入し、肝逸脱酵素である血清 AST をモニタリングした (Figure 5). ベクター注入後 2 日目, つまり GCV 腹腔内投与 1 日目から血清 AST レベルが上昇し, GCV 腹腔内投与 2 日目で血清 AST レベルはピークとなった. 特に, CMV-tk 投与群において血清 AST レベルは著明に上昇した (501.33 ± 60.33 IU/L). RSV-tk 投与群においても CMV-tk 投与群と同様に GCV 投与 2 日目で明らかな上昇 (373.00 ± 70.13 IU/L) をみとめた. 一方, Cav.-1-tk 投与群では GCV 腹腔内投与 2 日目で血清 AST レベルの上昇がもっとも小さく (154.67 ± 38.01 IU/L), CMV-tk 投与群 ($P < 0.0001$) と RSV-tk 投与群 ($P = 0.0054$) との間に有意差が認められた. なおデータには示していないが, 肝機能障害が原因と推察されるマウスの死亡はどの投与群においても認められなかった.

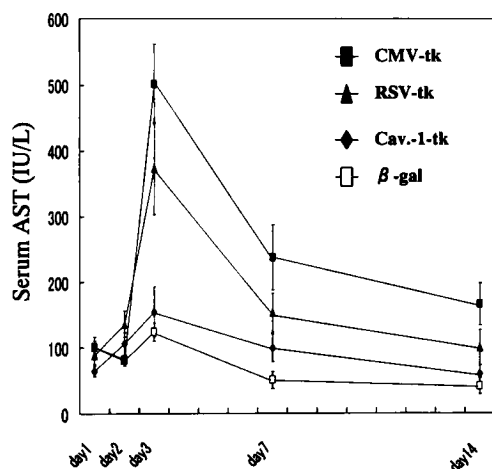


Fig. 5 in vivo vector toxicity
 1×10^9 pfu の HSV-tk アデノウィルスベクターをマウス尾静脈より注入後, 血清 AST を測定した. GCV 投与 2 日目の血清 AST レベルは Cav.-1-tk 投与群にて最も小さく CMV-tk 投与群 ($p < 0.0001$) および RSV-tk 投与群 ($p = 0.0054$) との間に有意差が認められた.
 Bars: Means $\pm$ standard deviation (SD)

考 察

遺伝子治療において導入された遺伝子の発現レベルはベクターの導入効率およびベクターに組み込まれたエンハンサー/プロモーターに大きく左右されると考えられている¹⁷⁾. それゆえ導入に使用するベクターは強い転写活性をもつ様にデザインされている. HSV-tk アデノウィルスベクターにおけるプロモーター活性については, 種々の癌細胞株において評価されてきた¹¹⁾¹²⁾¹⁸⁾. Cytomegalovirus (CMV) immediate early gene プロモーターおよび Rous sarcoma virus (RSV) long terminal repeat プロモーターは強力な転写活性を有することが知られており, HSV-tk 遺伝子だけでなく他の遺伝子導入についても幅広く使用されている¹⁹⁾²⁰⁾. CMV プロモーターおよび RSV プロモーターで転写コントロールされる HSV-tk アデノウィルスベクターは in vitro, in vivo において卓越した抗腫瘍効果をもたらすものの¹⁶⁾²¹⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾²⁵⁾, 大腸癌肝転移モデルでの CMV プロモーター HSV-tk アデノウィルスベクター導入によって重篤な肝障害が認められたとの報告もある¹⁰⁾²⁶⁾. したがって標的細胞において特異的に HSV-tk 遺伝子が発現され, 肝細胞を含む正常細胞では HSV-tk 遺伝子が発現されないようなプロモーターを使用するアデノウィルスベクターを考慮することが必要となる. このような観点から α -fetoprotein (AFP) や carcino-embryonal antigen (CEA) といった腫瘍が特異的に産生する糖蛋白などを標的とした腫瘍細胞特異的なプロモーターを用いることで HSV-tk 遺伝子が正常細胞には発現されず, 腫瘍組織内だけに発現されるような試みが行われている¹¹⁾¹²⁾¹⁸⁾. Prostate-specific antigen (PSA) は前立腺癌の特異的な腫瘍マーカーとして知られており, PSA プロモーターを用いた前立腺癌に対する遺伝子導入が試みられている¹³⁾²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾. しかし, 最近の研究では in vivo での遺伝子導入効率には限界があること, および組織学的に未分化なタイプまたは転移性の前立腺癌では PSA の産生能が相対的に低いことなどから十分な抗腫瘍効果は得られていない³¹⁾.

一方, Nasu らは, Caveolin-1 が転移性前立腺癌細胞またはホルモン抵抗性前立腺癌細胞に高発現し, Caveolin-1 を高発現させることでホルモン依存性細胞がホルモン抵抗性に変化すること, また逆に Caveolin-1 を高発現しているホルモン抵抗性細胞の Caveolin-1 の発現を抑制することでホルモン依存性が回復することを報告している¹⁴⁾. 前立腺癌に対する遺伝子治療の目標が, ホルモン抵抗性癌の治療にあることより, caveolin-1 プロモーターの現実的有効性を検証することは, これからの前立腺癌に対する遺伝子治療の方向性を検証するのに極めて有意義であると考えられた. また, Caveolin-1 は Yang らによって前立腺癌患者における前立腺全摘出術後の組織内での Caveolin-1 高発現が術後再発の予測因子となることとともに, 正常前立腺においては Caveolin-1 が平滑筋細胞や血管の内皮細胞に局在していることが報告された³²⁾. 当面の前立腺癌に対する遺伝子治療が前立腺への局所投与であることを考えると, Caveolin-1 プロモーターを転写コントロールとした HSV-tk アデノウィルスベクターを使用する場合に, HSV-tk 遺伝子が癌細胞だけでなく栄養血管などにも導入されることは, 腫瘍細胞への直接効果のみならず腫瘍内血管障害による間接効果を通じてより強い抗腫瘍効果が得られる可能性につながるものと考えられる.

In vitro cytotoxicity において Cav.-1-tk は Caveolin-1 を相対的に高発現している178BMA マウス前立腺癌細胞株, PC-3 ヒト前立腺癌細胞株において CMV-tk および RSV-tk とほぼ同等またはより強い細胞障害活性を示した. 一方, Caveolin-1 発現が相対的に低い178PA マウス前立腺癌細胞株, LNCap ヒト前立腺癌細胞株においては Cav.-1-tk の細胞障害活性が CMV-tk, RSV-tk に比して弱い結果となった. このことは Cav.-1-tk の癌細胞に対する細胞障害活性が, 癌細胞内の Caveolin-1 発現と相関を示すものと解釈される.

In vivo の実験に関しては, ホルモン抵抗性前立腺癌を想定し Caveolin-1 発現の高いマウス前立腺癌細胞株である178BMA 細胞株を使用し, マウス前立

腺癌同所移植モデルを作成して抗腫瘍効果を検討した. 治療群間で腫瘍のサイズに有意な差はなかったものの Cav.-1-tk 治療群にて腫瘍のサイズが最も小さく, apoptosis もより多く生じている傾向が認められた. 特筆すべき点は腫瘍組織内における壊死の範囲の指標となる% necrosis が Cav.-1-tk 治療群のみコントロールに比し有意に上昇していたこと, ならびに腫瘍内の microvessel density の指標となる anti-factor VIII positive vessel の数が Cav.-1-tk 治療群にて最も低下していたことである. これらの結果は Cav.-1-tk によって tumor vasculature がより破壊され, 栄養血管を失った腫瘍細胞の necrosis が生じたことも抗腫瘍効果の一因と考えられる. さらに HSV-tk/GCV によって生じた局所における癌細胞の apoptosis, necrosis から全身的な抗腫瘍免疫が誘導されているか否か評価するため, CD4, CD8-positive T cell の腫瘍内浸潤を解析した. CD4 T cell の腫瘍内における数において治療群とコントロール群間で有意な差は認められなかったものの, CD8 T cell においては Cav.-1-tk 治療群にて他の HSV-tk 治療群に比して positive cell の数が多い傾向が認められた.

HSV-tk アデノウィルスベクターを腫瘍内局所注入した場合にベクターが前立腺を超えて発現することは, Timme らのマウスの実験³³⁾, ならびに Herman ら⁹⁾の phase 1 clinical trial において重篤な副作用がほとんど認められなかったことから推察される. しかし CMV プロモーター下の HSV-tk アデノウィルスベクター導入によって引き起こされた重篤な肝障害の報告例¹⁰⁾や caveolin-1 が間質系細胞に発現していることを考慮すると, 臨床応用時の安全性という観点から caveolin-1 プロモーター HSV-tk の肝障害の有無を他のプロモーターを用いた HSV-tk と比較検討する必要があると考えられた. そこで各アデノウィルスベクターをマウスの尾静脈より注入し, 肝逸脱酵素である血清 AST を指標として肝機能障害の程度を比較検討した. 検討した3種類のベクターにおいて, ベクター注入後2日目, つまり GCV 腹腔内投与1日目から血清 AST レベルが上

昇し, GCV 腹腔内投与 2 日目で投与群の血清 AST レベルはピークとなった。しかし Cav.-1-tk 投与群で血清 AST レベルの上昇がもっとも小さく, CMV-tk 投与群, RSV-tk 投与群との比較においても有意に血清 AST レベルは低値であった。

以上の結果から前立腺癌, 特に caveolin-1 を高発現している前立腺癌において caveolin-1 プロモーター転写コントロール下の HSV-tk アデノウィルスベクターは腫瘍内に局所注入するという点で, 現在転写活性が最も強いとされている CMV または RSV プロモーター転写コントロール下の HSV-tk アデノウィルスベクターに比して有効かつ安全であると思われる。

結 語

Caveolin-1 プロモーター転写コントロール下の HSV-tk アデノウィルスベクターの前立腺癌に対する有効性および安全性について検討した。

- 1) Caveolin-1 を相対的に高発現しているマウスおよびヒト前立腺癌細胞株において, Cav.-1-tk アデノウィルスベクターはより強い細胞障害活性を示した。
- 2) in vivo において Cav.-1-tk, CMV-tk, RSV-tk 各群間に有意な差は認められないものの, Cav.-1-tk 治療群で腫瘍形成は最も抑制されている傾向が見られた。
- 3) 抗腫瘍効果の評価としては Cav.-1-tk 治療群で% necrosis または microvessel density に有意差が認められたことから Cav.-1-tk によって癌細胞だけでなく tumor vasculature が破壊され, 栄養血管を失った腫瘍細胞が necrosis を引き起こしたことも抗腫瘍効果発現に寄与していると考えられた。
- 4) 血清 AST レベルを指標とした安全性の検討において Cav.-1-tk 投与群では CMV-tk 投与群, RSV-tk 投与群との比較において有意に血清 AST の変動は軽微であった。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 本研究に対し御指導いただいた Baylor 医科大学 Dr. Timothy C. Thompson, 岡山大学津島知靖助教授, 那須保友講師に深謝いたしますとともに御指導いただき, また御校閲を賜りました恩師公文裕巳教授に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Landis SH, Murray T, Bolden S and Wingo PA : Cancer statistics, 1999. CA Cancer J Clin (1999) **49**, 8—31.
- 2) Fyfe JA, Keller PM, Furman PA, Miller RL and Elion GB : Thymidine kinase from herpes simplex virus phosphorylates the new antiviral compound, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. Journal of Biological Chemistry (1978) **253**, 8721—8727.
- 3) Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS and Moolten FL : The “bystander effect” : Tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. Cancer Research (1993) **53**, 5274—5283.
- 4) Hamel W, Magnelli L, Chiarugi VP and Israel MA : Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells. Cancer Research (1996) **56**, 2697—2702.
- 5) Eastham JA, Chen SH, Sehgal I, Yang G, Timme TL, Hall SJ, Woo SLC and Thompson TC : Prostate cancer gene therapy : Herpes simplex virus thymidine kinase gene transduction followed by ganciclovir in mouse and human prostate cancer models. Human Gene Therapy, (1996) **7**, 515—523.
- 6) Herman JR, Adler HL, Aguilar CE, Thompson TC and Scardino PT : In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate : A phase I clinical trial. Human Gene Therapy (1999) **10**, 1239—1249.
- 7) Eck SL, Alavi JB, Alavi A, Davis A, Judy K, Mollman J, Phillips PC, Wheeldon EB and Wilson JM : Treatment of advanced CNS malignancies with the recombinant adenovirus H5.010RSVTK : A phase I trial. Human Gene Therapy (1996) **7**, 1465—1482.
- 8) Serman DH, Treat J, Litzky LA, Amin KM, Coonrod L and Molnar LR : Adenovirus-mediated

- herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy in patients with localized malignancy : Results of a phase I Clinical trial in malignant mesothelioma. *Human Gene Therapy* (1998) **9**, 1083–1092.
- 9) Alvarez RD and Curiel DT : A phase I study of recombinant adenovirus vector-mediated intraperitoneal delivery of herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK) gene and intravenous ganciclovir for previously treated ovarian and extraovarian cancer patients. *Human Gene Therapy* (1997) **8**, 597–613.
 - 10) van der Eb M, Cramer SJ, Vergouwe Y, Schagen FHE, van Krieken JHJM, van der EB AJ, Borel-Rinkes IHM, van de Velde CJH and Hoebe RC : Severe hepatic dysfunction after adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir administration. *Gene Therapy* (1998) **5**, 451–458.
 - 11) Kaneko S, Hallenbeck P, Kotani T, Nakabayashi H, McGarrity G, Tamaoki T, Anderson WF and Chiang YL : Adenovirus-mediated gene therapy of hepatocellular carcinoma using cancer-specific gene expression. *Cancer Research* (1995) **55**, 5283–5287.
 - 12) Brand K, Löser P, Arnold W, Bartels TH and Strauss M : Tumor cell-specific transgene expression prevents liver toxicity of the adeno-HSVtk/GCV approach. *Gene Therapy* (1998) **5**, 1363–1371.
 - 13) 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. *Molecular Endocrinology* (1991) **5**, 1921–1930.
 - 14) Nasu Y, Timme TL, Yang G, Bangma CH, Li L, Ren C, Park SH, Deleon M, Wang J and Thompson TC : Suppression of caveolin expression induces androgen sensitivity in metastatic androgen-insensitive mouse prostate cancer cells. *Nature Medicine* (1998) **4**, 1062–1064.
 - 15) Thompson TC, Southgate J, Kitchner G and Land M : Multi-stage carcinogenesis induced by ras and mic oncogenes in a reconstituted organ. *Cell* (1989) **56**, 917–930.
 - 16) Chen SH, Shine HD, Goodman JC, Grossman RG and Woo SLC : Gene therapy for brain tumors : Regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1994) **91**, 3054–3057.
 - 17) Serfling E, Jasin M and Schaffner W : Enhancers and eukaryotic gene transcription. *Trends in Genetics* (1985) **1**, 224–230.
 - 18) Wills KN, Huang WM, Harris MP, Machemer T, Maneval DC and Gregory RJ : Gene therapy for hepatocellular carcinoma : chemosensitivity conferred by adenovirus-mediated transfer of the HSV-1 thymidine kinase gene. *Cancer Gene Therapy* (1995) **2**, 191–197.
 - 19) Mujoo K, Maneval DC, Anderson SC and Gutterman JU : Adenoviral-mediated p53 suppressor gene therapy of human ovarian carcinoma. *oncogene* (1996) **12**, 1617–1623.
 - 20) Zhang W, Fang X, Mazurr W, French BA, Georges R and Roth JA : High-efficiency gene transfer and high-level expression of wild-type p53 in human lung cancer cells mediated by recombinant adenovirus. *Cancer Gene Therapy* (1994) **1**, 5–13.
 - 21) Vincent AJPE, Esandi MC, Avezaat CJJ, Vecht C and Smitt PS : Preclinical testing of recombinant adenoviral herpes simplex virus-thymidine kinase gene therapy for central nervous system malignancies. *Neurosurgery* (1997) **41**, 442–451.
 - 22) Qian C, Bilbao R, Bruna O and Prieto J : Induction of sensitivity to ganciclovir in human hepatocellular carcinoma cells by adenovirus-mediated gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase. *Hepatology* (1995) **22**, 118–123.
 - 23) O'Malley BW, Chen SHJ, Schwartz MR and Woo SLC : Adenovirus-mediated gene therapy for human head and neck squamous cell cancer in a nude mouse model. *Cancer Research* (1995) **55**, 1080–1085.
 - 24) Smythe WR, Hwang HC, Amin KM, Eck SL, Davidson BL, Wilson JM, Larry R, Steven K and Alberda M : Use of recombinant adenovirus to transfer the herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) gene to thoracic neoplasm : An effective in vitro drug sensitization system. 1994.
 - 25) Ross B, Kim B and Davidson B : Assessment of ganciclovir toxicity to experimental intracranial gliomas following recombinant adenoviral-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase

- gene by magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy. *Clinical Cancer Research* (1995) **1**, 651—657.
- 26) 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 Therapy* (1997) **4**, 9—16.
- 27) Pang S, Taneja S, Dardashti K, Cohan P, Kaboo R, Sokoloff M, Tso CL, Dekernion JB and Belldégrun AS : Prostate tissue specificity of the prostate-specific antigen promoter isolated from a patient with prostate cancer. *Human Gene Therapy* (1995) **6**, 1417—1426.
- 28) Schuur ER, Henderson GA, Kmetec LA, Miller JD, Lamparski HG and Henderson DR : Prostate-specific antigen expression is regulated by an upstream enhancer. *Journal of Biological Chemistry* (1996) **271**, 7043—7051.
- 29) Cleutjens KB, van Eekelen CC, van der Korput HA, Brinkman AO and Trapman J : Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *Journal of Biological Chemistry* (1996) **271**, 6379—6388.
- 30) Pang S, Dannull J, Kaboo R, Xie Y, Tso CL, Michel K, deKernion JB and Belldégrun AS : Identification of a positive regulatory element responsible for tissue-specific expression of prostate-specific antigen. *Cancer Research* (1997) **57**, 495—499.
- 31) Thompson TC : In situ gene therapy for prostate cancer. *Oncology Research* (1999) **11**, 1—8.
- 32) Yang G, Truong LD, Wheeler TM and Thompson TC : Caveolin-1 Expression in Clinically Confirmed Human Prostate Cancer : A Novel Prognostic Marker. *Cancer Research* (1999) **59**, 5719—5723.
- 33) Timme TL, Hall SJ, Barrios R, Woo SLC, Cordova EA and Thompson TC : Local inflammatory response and vector spread after direct intraprostatic injection of a recombinant adenovirus containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir therapy in mice. *Cancer Gene Therapy* (1998) **5**, 74—82.

**The efficacy and toxicity resulting from recombinant HSV-tk
adenoviral vector under the transcriptional control of
caveolin-1 promoter for prostate cancer**

Shin EBARA

Department of Urology,

Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry

Okayama 700-8558, Japan

(Director : Prof. H. Kumon)

The efficacy and toxicity of adenoviral vectors that express Herpes Simplex Virus-thymidine kinase (HSV-tk) gene under the transcriptional control of caveolin-1 promoter (cav.-1-tk) was compared to Cytomegalovirus (CMV) promoter or Rous sarcoma virus (RSV) promoter HSV-tk for prostate cancer. The cav.-1-tk demonstrated the strong cytotoxicity *in vitro* for mouse human prostate cancer cell line (178BMA) and human prostate cancer cell line (PC-3), which overexpress caveolin-1 levels. On the other hand, the cytotoxicity was weak for mouse (178PA) and human (LNCaP) prostate cancer cell line, which express low caveolin-1 levels. The antitumor efficacy was observed in each vector *in vivo* orthotopic model using 178BMA prostate cancer cell line. The immunohistochemical analysis results indicated that not only cancer cells but also tumor vasculature were destroyed by cav.-1-tk. The serum AST levels of cav.-1-tk was minimal change following intravenous injection.

Taken together, adenovirus-mediated HSV-tk *in situ* gene therapy under the transcriptional control of caveolin-1 promoter may be effective and safe for prostate cancer compared to CMV or RSV promoter HSV-tk adenoviral vectors.