

7) アデノ随伴ウイルスを用いた多段階発癌モデルの 研究方法の検討

研究代表者 山本 雅大

[背景と目的]

われわれは diethylnitrosamine (DEN) を用いた肝化学発癌マウスモデルを用いて研究している。このモデルは、foci、adenoma などの前癌病変を経て、肝細胞癌に移行する多段階発癌モデルである¹⁾。しかしながら、この多段階発癌メカニズムは不明な点が多いので、その解明のために発癌段階特異的に遺伝子発現を誘導できる実験系を確立する必要があると考え本研究を行った。発癌過程のうち (1) 正常肝細胞が腫瘍化する段階 (initiation) および (2) 腺腫から肝細胞癌に移行する段階 (progression) の2つを検討対象とした。遺伝子発現ベクターは、ウイルス自体が炎症を起こさずかつ1年以上の長期に安定して遺伝子発現を誘導することが可能なアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus, AAV) を用いた。(1) initiation の段階を標的としたシステムは、正常肝細胞に感染して、肝細胞が腫瘍化する際に遺伝子発現がおこるものが最適と考えた。肝細胞が腫瘍化する際に、alpha-fetoprotein (AFP) の発現がおこることが知られているので、AFP promoter/enhancer 下にマーカー遺伝子を挿入した AAV9 (initiation AAV) を作成し、検討することにした。(2) また、progression の段階を標的としたシステムは、腫瘍肝細胞に特異的に感染して遺伝子発現を誘導するものが最適と考えた。肝腫瘍細胞は、hepatocyte growth factor (HGF) の受容体の c-met が過剰発現していることが知られているので、c-met を介して感染する血清型の変異型 AAV3²⁾ (progression AAV) を用い、腫瘍細胞

に特異的な遺伝子導入を検討することにした。

[方法]

(1) initiation AAV の検討

AFP promoter/enhancer を用いた遺伝子発現系を検討した。AAV がパッケージ可能な遺伝子のサイズは約 5 kbp で、それに比し AFP promoter/enhancer は約 2.7 kbp と大き過ぎる。そのため、3つ存在するマウス AFP enhancer のコア領域のみと promoter を組み合わせた AFP enhancer/promoter 領域が小さい数種類のベクターを作成した。遺伝子発現マーカーとして、分泌型ルシフェラーゼ (Gluc) と蛍光タンパク質 AcGFP を IRES2 配列で繋いだものを用いた。これらプラスミドを DEN 由来肝腫瘍細胞株にトランスフェクションし、遺伝子発現活性を検討する。

(2) progression AAV の検討

CAG プロモータ下に Gluc-IRES2-AcGFP をもつ変異型 AAV3 を作成し、ヒト肝癌細胞株 (Huh7, Hep3B, HepG2) および DEN 肝腫瘍由来細胞株に感染させ遺伝子導入効率を検討した。また、DEN 誘導肝臓腫瘍をもつ5ヶ月齢マウスに 1e12 vg のウイルスを静脈注射し、肝臓腫瘍での AcGFP の発現を検討した。

[結果と考察]

- (1) 様々な AFP enhancer をもつプラスミドを作成した。今後、DEN 誘発肝腫瘍細胞株を用いて、どのプラスミドが遺伝子導入に最適かを検討する。
- (2) AAV3-CAG-Gluc-IRES2-AcGFP を作成した。これらをヒト肝癌細胞株および DEN 肝腫瘍由来細胞株に *in vitro* で感染させ AcGFP を検討したところ、ヒト肝細胞株は3種類検討したうちの HepG2 が、マウス肝細胞株は 11 株検討して 3 株で AcGFP の強い発現が認められ、細胞株により遺伝子導入効率にばらつきがあることが明らかになった。また、5ヶ月齢の DEN 腫瘍をもつマウスに AAV3 を静脈注射後 12 日目で腫瘍の遺伝子発現を検討したが、腫瘍 5 個いずれも AcGFP の発現は見られなかった。これら結果より、AAV3 は腫瘍細胞株において遺伝子導入できない株があり、また、実際に DEN 肝腫瘍には感染しないことが分かり、残念ながら AAV3 は progression AAV として利用できないことが明らかになった。

今後、AFP プロモータを用いた initiator AAV の検討を *in vitro* および *in vivo* で検討する。

[謝辞]

変異型 AAV3 作成プラスミドはフロリダ大学の Dr. Arun Srivastava より供与いただきました。

[参考文献]

- 1) Vesselinovitch, S. D. & Mihailovich, N. Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse. *Cancer Res.* 43, 4253-4259 (1983).
- 2) Cheng, B. et al. Development of optimized AAV3 serotype vectors: mechanism of high-efficiency transduction of human liver cancer cells. *Gene Therapy* 1-10 (2011).doi:10.1038/gt.2011.105