

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学フォーラム (2014.02) 14巻1号:53～54.

平成23.24年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題
9) アデノ随伴ウイルスを用いた肝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

9) アデノ随伴ウイルスを用いた肝多段階発癌モデル の研究手法の検討

研究代表者 山本 雅大

[目的]

我々は、変異原性肝発癌物質であるジエチルニトロソアミン (DEN) や非変異原性肝発癌物質である四塩化炭素を用いたマウス肝化学発癌モデルを用いて、多段階発癌メカニズムの研究を行っている。化学発癌モデルは高率に再現性良くマウス肝臓に腫瘍を誘導できる良い方法であるが、腫瘍細胞の遺伝子発現を人為的に変化させることが困難で、発癌におけるそれら遺伝子発現の役割を検討することが難しい。そのため、我々は本研究課題において、アデノ随伴ウイルスを用いて腫瘍細胞で遺伝子発現を誘導する系の確立を検討した。

多段階発癌モデルでは、はじめに正常肝細胞が腫瘍細胞に変化し、次にそれが癌化するというように、多段階的に発癌がおこる。正常肝細胞が腫瘍細胞に変化する際に遺伝子発現が起こるように、腫瘍で発現が亢進している alpha-fetoprotein (AFP) プロモーター・エンハンサーで遺伝子が発現する系について検討する。また、腫瘍化した肝細胞が癌化する段階を検討するために、腫瘍に特異的に感染するとされている変異型 AAV3 を検討する。

[方法]

AFP プロモーター・エンハンサーは全体で約 2.7 kbp と大きく、5 kbp 以上の大きさの遺伝子を挿入するとウイルス作製効率が低下するとされている AAV には不向きである。そこで、マウス AFP エンハンサーは 3 つのコア部位からなるため、このコア部位のみを使ってエンハンサーを短縮したものを作製し、蛍光蛋白質 *Aequorea coerulea* green fluorescent protein (AcGFP) を下流につなげ、そのプロモーター活性について DEN 誘発マウス肝腫瘍細胞株を用いて検討した。

変異型 AAV3 は hepatocyte growth factor (HGF) 受容体の c-Met 蛋白を介して感染する肝腫瘍特異的な AAV として報告されている¹⁾。CAGGS プロモーター下に AcGFP をつなげた変異型 AAV3 と正常肝細胞に感染する AAV9 を作製し、*in vitro* でマウス DEN 誘発肝腫瘍細胞株に感染させ検討した。更に、*in vivo* でウイルスをマウスに静脈注射し、初期 (4-5 ヶ月齢) と後期 (8-9 ヶ月齢) の DEN 腫瘍および四塩化炭素誘発肝腫瘍 (AAV9 のみを検討) における感染効率を検討した。

[結果]

マウス DEN 誘発肝腫瘍細胞株のうち AFP 高発現株と低発現株について AFP プロモーター・エンハンサー全長とエンハンサーのコア部分にしたものをリポフェクション法で導入し AcGFP の発現を検討したが、非常に発現が弱く、AFP の発現との関連性は見られなかった。

DEN 誘発肝腫瘍細胞株 11 株に変異型 AAV3 と AAV9 を感染させ AcGFP の発現を検討したところ、AAV3 は 3 株に強い発現を認め、AAV9 は 4 株に弱い発現を認めた。

DEN 誘発肝腫瘍を持つマウスに変異型 AAV3 を静脈注射し、10 日後に AcGFP の発現を検討したが、腫瘍および正常細胞には発現は見られなかった。一方、同様に AAV9 で検討したところ、驚くべきことに、正常肝細胞に比べ腫瘍に強く・高率に AcGFP のシグナルが見られ、これは DEN 腫瘍の初期および後期どちらでも同様であった (図 1)。また、四塩化炭素を 33 週間投与して誘導した肝腫瘍においては、AAV9 による AcGFP の発現誘導は個々の腫瘍によりばらつ

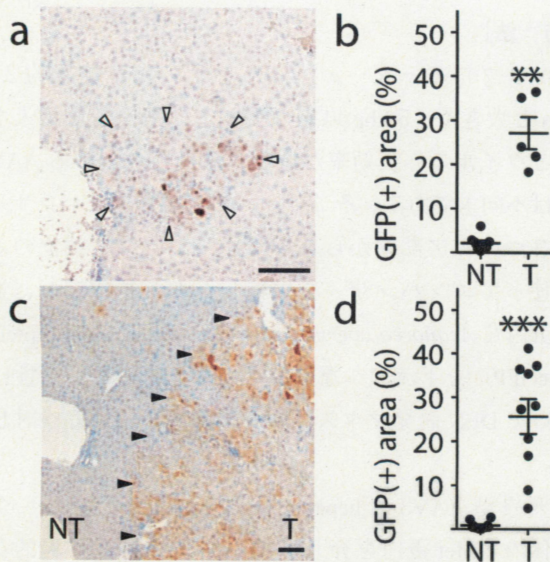


図1 AAV9はDEN腫瘍に効率よく感染する (a) 4-5ヶ月DEN腫瘍のGFP免疫染色、(b) 定量結果腫瘍部(白矢頭)に高い陽性率をしめしている。(c) 8-9ヶ月DEN腫瘍のGFP染色、(d) 定量結果非腫瘍部(NT)に比べ腫瘍部(T, 黒矢頭より右)に高い陽性率を示している。scale bar: 100 μ m. mean \pm SEM **: $p < 0.01$, Mann-Whitney U-test, ***: $p < 0.001$, Student's t-test with Welch's correction.

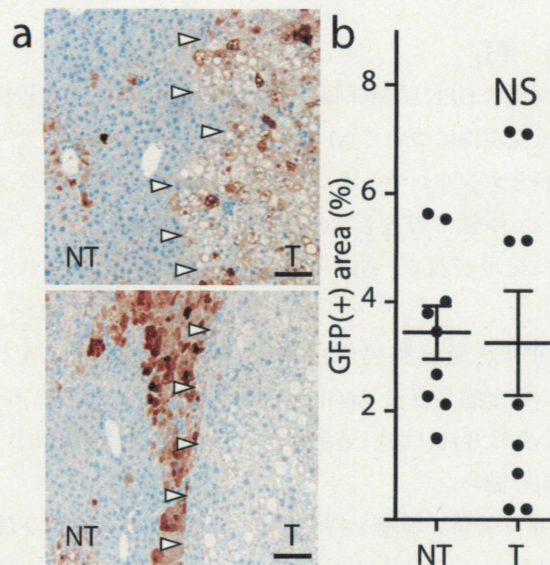


図2 AAV9の四塩化炭素誘発肝腫瘍への感染効率は腫瘍によりばらつきがある (a) GFP免疫染色上図に示すように高率に感染する腫瘍(T, 矢頭右)もあれば、下図に示すように感染効率が低い腫瘍もある。(b) 定量結果腫瘍によりGFP陽性率にばらつきがあり、非腫瘍部と腫瘍部で有意な差がない。NT: 非腫瘍部, T: 腫瘍部, scale bar: 100 μ m. NS: $p > 0.05$, Student's t-test.

きがあり、正常部に比較して腫瘍で有意な発現の亢進は見られなかった(図2)。

[考察]

AFPプロモーター・エンハンサーを用いた検討に関しては、AFP高発現株においても弱い発現しか観察されず、うまく機能していないことが分かり、改善する必要があると考えた。

変異型AAV3は、腫瘍特異的に感染することが期待されていたが、*in vitro*では確かにいくつかのDEN誘発肝腫瘍株において高率に感染したものの、*in vivo*においては、全く機能しなかった。

AAV9は、正常肝細胞に感染することが期待されていたが、予期せずDEN誘発肝腫瘍の初期および後期病変どちらにも高率に感染することが新たに明らかになった。一方、四塩化炭素誘発腫瘍においては、腫瘍により感染効率にばらつきがあり、四塩化炭素誘発肝発癌モデルでは有用なベクターとなり得ないことが分かった。

AAV9がDEN腫瘍に高い効率で感染することが分かり、DEN誘発肝発癌モデルの解析に有用なウイルスベクターとなることが期待される。今後、発癌に関連する遺伝子を発現するAAV9ベクターを作製し、その遺伝子のDEN誘発発癌過程における役割を明らかにしてゆきたいと考えている。

[文献]

1) Cheng B *et al.*: Development of optimized AAV3 serotype vectors: mechanism of high-efficiency transduction of human liver cancer cells. *Gene Therapy*. 19, 375-384 (2012)