様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　３０　年　　５　月　１６　日現在

機関番号：　１４１０１
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2015～2017
課題番号：　１５Ｋ２０５１４

研究課題名（和文）口腔悪性腫瘍治療効果の向上を目的にしたＢａｘ　ｍＲＮＡ遺伝子治療の開発

研究課題名（英文）Development of Bax mRNA gene therapy aimed at improving the effect of oral malignant tumor treatment

研究代表者

奥村　健哉（Okumura, Kenya）

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：５０５８２０７９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,100,000円

研究成果の概要（和文）：われわれは口腔悪性腫瘍を対象に新たな方法としてBax mRNA lipofection法を用いた遺伝子治療の研究を行っている（Baxは腫瘍抑制因子として機能し、mRNA はplasmidよりも効率的に遺伝子導入される）。本研究ではヒト下顎骨肉腫（HOSM-1細胞）に対して、liposomeを用いてBax mRNAをヌードマウス移植腫瘍へ投与し、抗腫瘍効果について検討した。
Bax mRNA療法はplasmidを使用したBax遺伝子療法よりも高い抗腫瘍効果が得られたが、in vivoでの遺伝子発現の分布や化学療法との併用効果については今後検討する必要がある。

研究成果の概要（英文）：Gene transfer by mRNA lipofection is more efficient than plasmid DNA lipofection. We study the gene therapy using a new method, Bax mRNA lipofection for oral malignant tumors (Bax is a pro-apoptotic molecule that functions as a tumor suppressor.). In this study, we examined the antitumor effect in nude mice transplanted tumors of the Bax mRNA transfected using a cationic liposome against human mandibular osteosarcoma (HOSM-1 cells).
Although Bax mRNA therapy has higher antitumor effect than Bax gene therapy using plasmid, the distribution of mRNA gene expression in vivo and the effects of the combination therapy with chemotherapy need to be studied in the future.

研究分野：　口腔外科学

キーワード：　遺伝子治療　口腔がん　Bax mRNA　Liposome

１．研究開始当初の背景

(1) 今日、癌に対する遺伝子治療の研究はさまざまな分野で行われているが、口腔領域についての研究報告例はほとんどみられず、特に口腔原発の骨肉腫に関しては知る限りでは皆無である。また、顎骨骨肉腫は放射線治療の感受性が低く、化学療法の効果も低い。さらに解剖学的に切除後の機能障害が大きく、遺伝子治療の臨床応用が待たれている。

(2) Bax 遺伝子治療の研究に至った径緯

Bax はミトコンドリアから cytochrome c を細胞質内へ放出させ、Caspase-3 の活性化を経て apoptosis を誘導することが明らかとなっている。また、liposome はウイルスベクターに比べ免疫反応、バイオハザードの問題が少ないことから、安全でかつ反復投与も可能で、有用なベクターであると考えられる。そこで、独自に教室で樹立した口腔由来の悪性腫瘍に対して cationic liposome をキャリアーとする Bax 遺伝子治療の研究を行ってきた。

骨肉腫(HOSM-1 細胞)に対しては in vitro、in vivo ともに抗腫瘍効果が得られた（Int J Oncol 2005; 27: 433-8、Oncol Rep 2007; 17: 769-73.）が、悪性黒色腫細胞（HMG 細胞）に対しては著明な効果が得られなかった。

(3) Bax mRNA 遺伝子治療の研究に至った径緯

前述した Bax 遺伝子治療では充分な効果が得られなかった要因の一つに導入効率が低いことが考えられた。しかし、通常用いる plasmid DNA に替えて mRNA を導入すると導入効率が向上することが報告されている(Mol Cell Biol 2001; 21: 5200-13、RNA 2001; 7: 1486-95)。

この報告をもとに、Bax mRNA を作成し、悪性黒色腫細胞株（HMG）に対し Bax mRNA の導入を行った。その結果、plasmid の約 2 倍の導入効果が得られ、in vitro および in vivo において、抗腫瘍効果は従来の Bax plasmid の 1.5 倍以上に向上した（J Gene Med 2008; 10: 910-7)。

さらに口腔由来の悪性腫瘍細胞株である扁平上皮癌(KB)、骨肉腫(HOSM-1、HOSM-2)、悪性黒色腫(MMN9、PMP) に対して in vitro での抗腫瘍効果ついて検討してきた。その結果すべての細胞株で従来の plasmid を用いた遺伝子治療より遺伝子導入効率や Bax タンパク発現は向上し、apoptosis の発現は 1.5 倍以上の効果が得られた。

そこで顎骨骨肉腫においても、Bax mRNA を導入させることにより、従来の plasmid を用いた遺伝子治療よりも高い抗腫瘍効果が期待できる。

２．研究の目的

下顎骨由来骨肉腫細胞株を用いて *in vitoro*, *in vivo* での Liposome-Bax mRNA の投与を行い、抗腫瘍効果の高い投与方法について検討を行う。

３．研究の方法

使用した細胞株はヒト下顎骨骨肉腫細胞(HOSM-1 細胞)を用いた。

(1) mRNA の作製

GFP plasmid（EGFP cDNA を pcDNA3.1(+) plasmid（invitrogen 社）に挿入）から mMESSAGE mMACHINETM T7 Ultra Kit (Ambion 社)を用いて GFP mRNA を作製した。
RFP mRNA、Luc2 mRNA、Bax mRNA も同様に plasmid を作成し、kit を用いて作製した。

(2) Cationic Liposome の作製

陽性脂質; DOTAP と中性脂質; DOPE を混合し、ロータリーエバポレーターを用いて作製した。

(3) *In vitro* での遺伝子発現効率の測定

HOSM-1 細胞に Liposome GFP plasmid、Liposome-GFP plasmid を導入し、蛍光顕微鏡で観察し、フローサイトメータにて発現効率を測定。Plasmid 群と mRNA 群とで導入効率を比較検討した。

(4) *In vivo* での mRNA 遺伝子発現の分布

骨肉腫 HOSM-1 細胞をヌードマウスの背部に移植し、Liposome-RFP mRNA の静脈内投与を投与量を変えて行い、IVIS Imaging System を用いてマウス全身への遺伝子発現の分布を経時的に測定した。

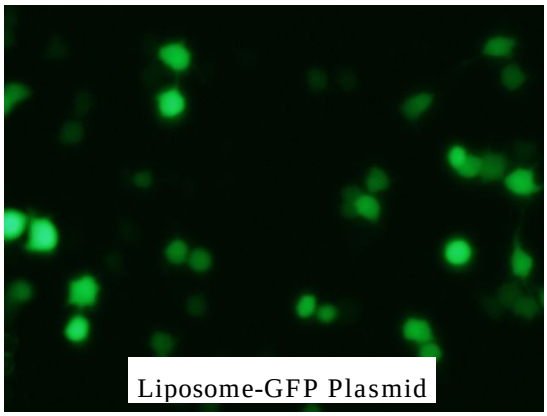
(5) 腫瘍増殖抑制効果についてはヌードマウスの背部皮下に腫瘍細胞を移植、腫瘍径 5mm となった時点を Day0 として、Liposome-Bax mRNA もしくは Bax plasmid を静脈内注射（50μg）し、投与後 20 日間の腫瘍体積を測定した。

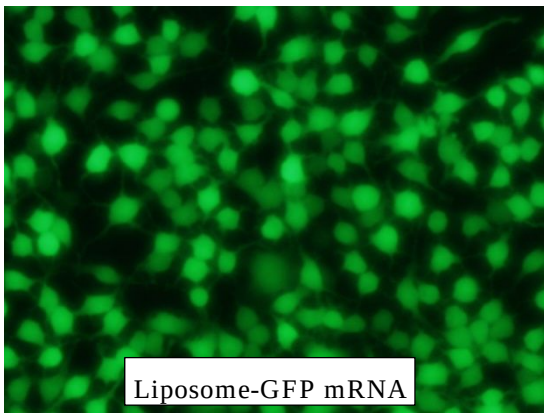
## ４．研究成果

### （１）HOSM-1 細胞への遺伝子発現効果

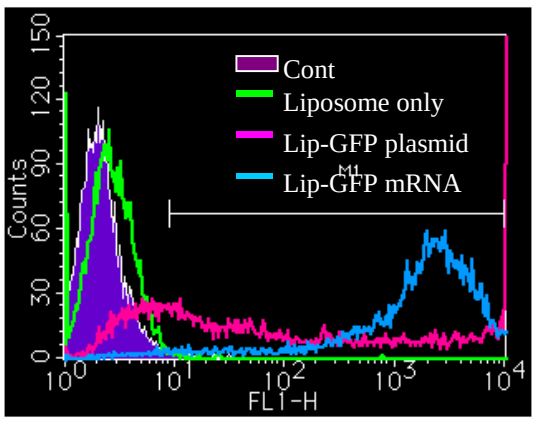
蛍光顕微鏡で観察したところ GFP plasmid 導入群に比較して GFP mRNA 導入群では多数の発現が増強した細胞がみられた

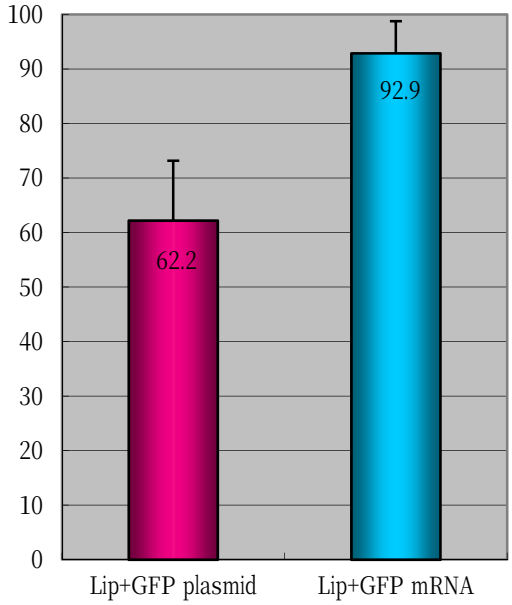
＜蛍光顕微鏡写真＞




フローサイトメーターで発現が増強した細胞を測定すると GFP plasmid 群に比較して、GFP mRNA 群で蛍光強度は増強し、遺伝子発現効率は GFP plasmid 群 62.2%であったのに対し、GFP mRNA 群では 92.9%にまで増加していた。



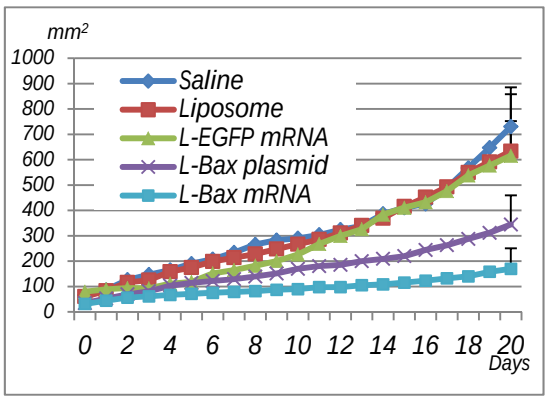




### （２）*In vivo* での mRNA 遺伝子発現の分布

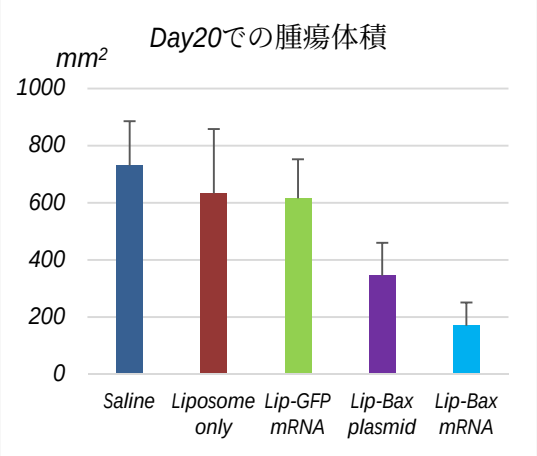
GFP mRNA および RFP mRNA を作製し、HOSM-1 細胞をヌードマウスの背部へ移植後、腫瘍径が 5mm となった時点で、Liposome-GFP の投与を行い、IVIS Imaging System を用いてマウス全身への遺伝子発現の分布を測定したが、蛍光強度が弱く、測定できなかった。そこで RFP mRNA を作製し、同様に測定を行ったが、蛍光強度が弱いため測定できなかった。現在、発行遺伝子である Luc2 mRNA を作製し、同様に測定予定である。

### （３）腫瘍増殖抑制効果

ヌードマウスでの遺伝子発現の分布の測定に難渋していたため、効率よく遺伝子発現する投与方法は測定できなかっが、予備実験として、Bax mRNA50μg を静脈内投与し、20 日間継時的に腫瘍系を測定した。



Dya20 での腫瘍体積は Liposome-Bax plasmid 群では生食群の 47.2 であったのに対し、%Liposome-Bax mRNA 群では生食群の 23.3%に増殖抑制されており、plasmid より高い増殖抑制効果が得られた。




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）

６．研究組織
(1)研究代表者
奥村 健哉（OKUMURA, Kenya）
三重大学・医学系研究科・助教
研究者番号：50582079