

平成21年 5月26日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18791168

研究課題名（和文） 難治性婦人科腫瘍に対する遺伝子治療の基礎的研究

研究課題名（英文） Basic research on the gene therapy for refractory gynecological tumor

研究代表者

竹井 裕二（TAKEI YUJI）

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：00398520

研究成果の概要：我々は、予後不良とされる婦人科進行癌に対して、遺伝子治療の開発に着手した。腫瘍は自らを栄養する血管やリンパ管を新たに導き（血管新生やリンパ管新生と呼ばれる）、それにより増殖や転移を起こす。卵巣癌や子宮体癌モデルマウスに対し、血管新生やリンパ管新生を抑制する遺伝子治療を行った。その結果、治療用遺伝子を用いると腫瘍増殖や転移の抑制が認められた。これは婦人科癌に対する将来の遺伝子治療の可能性を示唆した結果である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000		1,300,000
2007年度	800,000		800,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	270,000	3,270,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：遺伝子・癌・婦人科・血管新生抑制・リンパ管新生抑制・ウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

化学療法をはじめとした治療法の進歩により、婦人性器癌の予後は改善されつつあるが、腹膜播種を伴う進行卵巣癌、進行子宮体癌、子宮頸部小細胞癌などは、完治例は少なく、依然として予後不良の疾患である。既存の抗癌剤による化学療法には限界が見えている。

癌の進展、播種、転移には、血管新生、特にvascular endothelial growth factor (VEGF) が強く関与している。VEGFの産生抑制、

あるいはその働きを抑制出来れば、これらの難治性婦人科癌の増殖、進展を抑制出来る可能性がある。そこで、我々は、VEGFを標的とした分子標的治療ならびに遺伝子治療の研究をスタートさせた。

VEGF阻害因子として、VEGF受容体-1の可溶性で、VEGFのアンタゴニストとして作用するsoluble Flt-1 (sFlt-1) に注目した。また、sFlt-1を生体内で長期にわたり発現させるための手段として、筋肉等の正常細胞にも遺伝子導入可能なアデノ随伴ウイルス (AAV) ベ

クターに注目した。そこで、sFlt-1発現AAVベクター(AAV-sFlt-1)を作製し、これを用いた難治性婦人科癌に対する遺伝子治療の確立に向けて基礎的研究を企図した。

2. 研究の目的

(1) sFlt-1発現AAVベクター(AAV-sFlt-1)を作製し、担癌マウスへのAAV-sFlt-1の筋注により、卵巣癌腹膜播種、リンパ節転移・遠隔転移を伴った子宮体癌、子宮頸部小細胞癌に対する腫瘍進展抑制効果を検討する。

(2) sFlt-1に血管新生抑制作用があることは確認済みだが、sFlt-1に癌細胞の遊走抑制作用や浸潤抑制作用などがあるかどうかについても検討する。

(3) AAVベクターは現在、血清型が1型から11型まで11種類存在するが、血清型により臓器親和性が異なる。各々の癌種に最も効果的な血清型と投与対象臓器を検討する。

(4) 将来のヒトへの臨床応用に向けて、AAV-sFlt-1の肝機能、腎機能、創傷治癒などの有害事象について検討する。

3. 研究の方法

(1) sFlt-1に関する研究方法

① AAV-sFlt-1、および、コントロールベクターの AAV-LacZ を作製: Iodixanol を使用した密度勾配超遠心法により精製し、ドットプロットハイブリダイゼーション法により力価を測定した。

② 卵巣癌腹膜播種モデルマウスに対する、AAV-sFlt-1 の効果の検討: AAV-sFlt-1 あるいは AAV-LacZ をヌードマウス骨格筋に注射し、同時に、卵巣癌細胞株を腹腔内に接種した。その後、腹水貯留量、腹膜播種重量、生存期間について比較検討した。

③ sFlt-1 の血管新生抑制作用以外の作用機序の検討: sFlt-1 に、癌細胞の遊走抑制作用、浸潤抑制作用があるかどうかを各々、*in vitro* scratch wound healing assay、*in vitro* invasion assay にて行った。

④ AAV-sFlt-1 の有害事象の検討: AAV-sFlt-1 あるいは AAV-LacZ を筋肉内投与したヌードマウスの体重変化、創傷治癒過程を観察した。また、同マウスから採血し、血算、腎機能、肝機能、電解質を測定した。

(2) PTEN に関する研究方法

PTEN は、最近 VEGF の産生抑制作用があると言われている癌抑制遺伝子である。PTEN を

用いての癌遺伝子治療の可能性についても探るため、以下の実験を行った。

① 卵巣癌モデルマウスに対する、PTEN の効果の検討: 卵巣癌細胞株 SHIN-3 に PTEN を遺伝子導入し、得られた安定発現株 SHIN-3/PTEN をヌードマウスの皮下あるいは腹腔内に投与した。その後、皮下腫瘍の増殖あるいは腹膜播種の程度や生存期間について観察した。

② PTEN の卵巣癌抑制作用機序の一端を解明するための実験: SHIN-3/PTEN の培養上清中の VEGF 濃度、および、SHIN-3/PTEN 腹腔内接種マウスの腹水中の VEGF 濃度を測定した。また、SHIN-3/PTEN 皮下接種マウスの皮下腫瘍内新生血管数を測定した。

(3) sFlt-4 に関する研究方法

リンパ節転移が独立予後因子となっている子宮体癌に対する遺伝子治療の可能性を探る実験を行った。用いた遺伝子は、リンパ管新生因子である VEGF-C の受容体 Flt-4 の可溶型で、リンパ管新生抑制作用を有する sFlt-4 である。

① 子宮体癌モデルマウスの作製: 子宮体癌細胞株 HEC-1A を用いて、子宮体癌の主な進展形式である、リンパ節転移、腹膜播種、肺転移、各々のモデルマウスを作製した。

② AAV-sFlt-4 の作製: AAV-sFlt-1 と同様の方法で作製した。

③ AAV-sFlt-4 の効果の検討: AAV-sFlt-4 をヌードマウス骨格筋に注射し、子宮体癌の各種モデルマウスに対する治療効果を検討した。具体的には、リンパ節転移数、肺転移数について測定した。

4. 研究成果

(1) sFlt-1 に関する研究成果

① AAV-sFlt-1 と AAV-LacZ の作製: AAV の血清型は1型から11型まで11種類存在するが、最も頻用されている2型だけではなく、5型と1型も作製した。英字論文として発表した実験では、効果が最も強かった1型(AAV1-sFlt-1)を使用した。sFlt-1 を発現する AAV ベクターで1型を使用した発表は世界で初めてのものではあった。

② 卵巣癌腹膜播種モデルマウスに対する、AAV1-sFlt-1 の効果の検討: AAV1-sFlt-1 筋注群において、腹水貯留量、腹膜播種重量がコントロールと比較し有意に抑制された。なお、AAV ベクターの血清型については、2型、5型、1型の順に効果を試したが、1型が最も強い腹膜播種抑制効果を発揮した。ただし、生存期間の延長効果までは認められなかったため、今後、AAV ベクターの他の血清型による検討や筋注以外の投与経路の検討により、さらなる効果を目指し検討が必要と

考える。

③sFlt-1 の血管新生抑制作用以外の作用機序の検討: sFlt-1 に、癌細胞の遊走抑制作用、浸潤抑制作用があるかどうかを各々、*in vitro* scratch wound healing assay, *in vitro* invasion assay にて行ったが、いずれもコントロールと差はなかった。

④ AAV1-sFlt-1 の有害事象の検討: AAV1-sFlt-1 を筋肉内投与したヌードマウスの体重変化、創傷治癒過程を観察したがコントロールと差がなかった。また、同マウスから採血し、血算、腎機能、肝機能、電解質を測定したが、こちらもコントロールと差はなかった。よって、AAV1-sFlt-1 の筋注は、検討した範囲内では有害事象は認められなかったということになる。

(2)PTEN に関する研究成果

①卵巣癌モデルマウスに対する、PTEN の効果の検討: SHIN-3/PTEN 群ではコントロールと比較し、皮下腫瘍の増殖が顕著に抑制され、腹膜播種を抑制し、マウスの生存期間を延長させた。

②PTEN の卵巣癌抑制作用機序の一端を解明するための実験: SHIN-3/PTEN の培養上清中の VEGF 濃度、および、SHIN-3/PTEN 腹腔内接種マウスの腹水中の VEGF 濃度を測定したところ、コントロールと比較し有意に減少していた。また、SHIN-3/PTEN 皮下接種マウスの皮下腫瘍内新生血管数を測定したところ、こちらもコントロールと比較して有意に抑制されていた。すなわち、PTEN の卵巣癌抑制作用機序の一端として、VEGF 抑制を介した血管新生抑制作用が考えられた。

(3)sFlt-4 に関する研究成果

①子宮体癌モデルマウスの作製: 子宮体癌細胞株 HEC-1A を用いて、子宮体癌の主な進展形式である、リンパ節転移、腹膜播種、肺転移、各々のモデルマウスを作製した。ひとつの細胞株で3種類の転移モデルマウスを作製したのは、子宮体癌研究では貴重な成果である。

②AAV-sFlt-4 の作製: sFlt-4 の研究成果は数少なく、AAV-sFlt-4 を用いた研究は世界で初めてである。

③AAV-sFlt-4 の効果の検討: AAV-sFlt-4 をヌードマウス骨格筋に注射し、子宮体癌の各種モデルマウスに対する治療効果を検討した。その結果、コントロールマウスと比較し、リンパ節転移数の抑制、肺転移数の抑制が認められた。これは、子宮体癌に対する、将来の遺伝子治療の可能性を示唆するものである。

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 2件)

① Takei Y, Saga Y, Mizukami H, Takayama T, Ohwada M, Ozawa K, Suzuki M. Overexpression of PTEN in ovarian cancer cells suppresses i.p. dissemination and extends survival in mice. *Mol Cancer Ther* 7:704-711, 2008. (査読あり)

② Takei Y, Mizukami H, Saga Y, Yoshimura I, Hasumi Y, Takayama T, Kohno T, Matsushita T, Okada T, Kume A, Suzuki M, Ozawa K. Suppression of ovarian cancer by muscle-mediated expression of soluble VEGFR-1/Flt-1 using adeno-associated virus serotype I-derived vector. *Int J Cancer* 120: 278-284, 2007. (査読あり)

[学会発表] (計 8件)

①Takahashi K, Mizukami H, Saga Y, Takei Y, Urabe M, Kume A, Suzuki M, Ozawa K. Therapeutic efficacy of AAV vectors encoding *sflt-4* against. Endometrial cancer model with lymph node metastasis. 第 67 回日本癌学会総会、名古屋、2008.10.28-30.

②高橋佳容子、嵯峨泰、竹井裕二、高野貴弘、和田智明、町田静生、大和田倫孝、鈴木光明. 可溶性 VEGF レセプター3による子宮体癌遺伝子治療に関する研究. 第 44 回日本婦人科腫瘍学会、名古屋、2008.7.17-19.

③高橋佳容子、嵯峨泰、竹井裕二、高野貴弘、和田智明、町田静生、大和田倫孝、鈴木光明. 可溶性 VEGF レセプター3によるリンパ節転移を標的とした子宮体癌遺伝子治療に関する研究 (優秀演題賞受賞). 第 60 回日本産科婦人科学会、横浜、2008.4.12-15.

④竹井裕二、嵯峨泰、高橋佳容子、町田静生、野中宏亮、高澤環志、高橋詳史、大和田倫孝、鈴木光明: 癌抑制遺伝子 PTEN 強発現による卵巣癌腹膜播種抑制とその作用機序の検討. 第 60 回日本産科婦人科学会、横浜、2008.4.12-15.

⑤Takei Y, Saga Y, Mizukami H, Ohwada M, Ozawa K, Suzuki M. Overexpression of PTEN in ovarian cancer cells suppresses peritoneal dissemination and extends survival in mice. 第 66 回日本癌学会総会、横浜、2007.10.3-5.

⑥竹井裕二、嵯峨泰、高橋佳容子、高野貴弘、町田静生、高橋詳史、野中宏亮、大和田倫孝、鈴木光明. 癌抑制遺伝子 PTEN 強発現による卵巣癌遺伝子治療の基礎研究. 第 6 回日本婦人科がん分子標的研究会、熊本、2007.7.21.

⑦竹井裕二、嵯峨泰、高野貴弘、町田静生、高橋佳容子、和田智明、大和田倫孝、鈴木光明. Soluble Flt-1 (VEGF 受容体の可溶型) 発現 adeno-associated virus (AAV) vector 筋肉内接種による卵巣癌遺伝子治療の試み. 第 59 回日本産科婦人科学会総会、京都、2007. 4. 14-17.

⑧竹井裕二、嵯峨泰、高野貴弘、和田智明、町田静生、高橋佳容子、大和田倫孝、今野良、鈴木光明. 癌抑制遺伝子 PTEN の VEGF 産生抑制作用を介した卵巣癌遺伝子治療の可能性 (優秀演題賞候補演題). 第 58 回日本産科婦人科学会総会、横浜、2006. 4. 22-25.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹井 裕二 (TAKEI YUJI)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：00398520