

平成 23 年 6 月 13 日現在

研究種目：基盤研究(C)
研究期間：平成 20 年度 ～ 平成 22 年度
課題番号：20591528
研究課題名(和文)：肝移植後肝癌再発に対する核酸シャペロンを用いた新規 IL-12 遺伝子治療の開発
研究課題名(英文)：Development of novel gene-therapy using IL-12 and DNA nanoassociate bearing hyaluronan-glycocalyx for recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation
研究代表者：副島雄二(SOJIMA YUJI)
独立行政法人国立病院機構九州がんセンター臨床研究部・統括診療部・消化器外科医長
研究者番号：30325526

研究成果の概要(和文)：

(1) IL-12 遺伝子発現プラスミドの精製：2ヶ所の発現領域(EcoRI, BamHI)を有する pCAGGS にそれぞれ 1008bp のマウス IL-12 p40 cDNA と 1260bp の IL-12 p35 cDNA を挿入したプラスミドを用い、LB 培地にて大量培養後、プラスミドを精製・回収し、目的とするプラスミドが得られている事を確認した。

(2) PLL-g-HA の精製を高分子ヒアルロン酸をヒアルロニダーゼを用いて切断し、低分子ヒアルロン酸を得た。ヒアルロン酸(HA)とポリ-L-リシン(PLL)の重合反応を行い、凍結乾燥にて PLL-graft-HA の粉末を得た。

(3) PLL-g-HA と pCAGGS-mIL12 の重合確認：1M NaCl 10mM PBS(-) (pH=7.4) に溶解したプラスミド DNA に、同バッファーに溶解した PLL-g-HA を N/P 比=0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 となるように加え、1時間室温にてインキュベーションした後、NaCl 濃度が 137mM となるようにリン酸緩衝液(pH=7.4)を加えて希釈。更に30分間のインキュベーションを行い重合反応とした。アガロースゲルにて電気泳動し、プラスミドのバンド消失をもって重合の確認とした。N/P 比=0.5 よりバンドの消失が認められ、N/P 比=3 にて完全なるバンドの消失を認めた。

(4) 腫瘍接種モデルの確立：MH134 肝癌細胞株を用いた C3H (H-2^k) マウス皮下腫瘍モデルを確立し、IL-12 遺伝子を組み込んだ plasmid を、エレクトロポレーション法を用いて腫瘍内に 100 μ g 遺伝子導入した。Day28 における各4群間での原発皮下腫瘍容積の比較を行ったところ、IL12 群で有意に腫瘍抑制効果を認めた。

PLL-g-HA/pCAGGS-mIL-12 による肝類洞内皮細胞への遺伝子発現の確認はできなかった。

研究成果の概要(英文)：In this project, we investigated the effectiveness of gene therapy using IL-12 and DNA nanoassociate bearing hyaluronan-glycocalyx targeting the sinusoidal endothelial cells for the treatment of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. First of all, mIL-12 plasmid DNA was purified. To develop a system for targeting foreign DNA to SECs, comb-type polycations having HA side chains were prepared by coupling HA to poly(L-lysine) (PLL). The HA-grafted-PLL copolymer (PLL-g-HA) thus formed was mixed with DNA in 154 mM NaCl to form soluble nanoassociates bearing hydrated hyaluronate shells. Agarose gel retardation assays revealed selective interaction of the PLL backbone with DNA despite the presence of polyanionic HA side

chains.PLL-g-HA. Polymerization of PLL-g-HA with mIL-12 plasmid DNA was then confirmed. However, stable production and supply of PLL-g-HA/pCAGGS-mIL-12 was difficult due to the lack of PLL-g-HA. C3H mice (H-2(k)) were s.c. implanted with 2.5×10^6 MH134 cells (H-2(k)) and we treated the established HCC with electroporation-mediated gene therapy using mIL-12 plasmid DNA. Intratumoral gene transfer of mIL-12 elevated intratumoral mIL-12, IFN-gamma, and IFN-gamma-inducible protein-10, significantly inhibited the growth of HCC, compared with HCC-transferred control pCAGGS plasmid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	2,800,000	840,000	3,640,000
21年度	800,000	240,000	1,040,000
22年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：外科系臨床医学
 科研費の分科・細目：外科学一般
 キーワード：移植外科学、肝細胞癌、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

肝移植は既存の肝癌治療法である肝切除やラジオ波焼灼等の局所療法と違い、前がん病変である背景肝硬変をも含めて全ての肝組織を置換するため、肝細胞癌に対しての究極の治療法と考えられる(文献1)。しかし、ミラノ基準逸脱例(3cm3個以下もしくは5cm1個)の3年累積生存率および無再発生存率はそれぞれ68%、66%である。ミラノ基準外といえどもそのほとんどがStage IIIやStage IVaの進行肝癌である事を考えると満足すべき術後成績と考えられるが、健康なドナーの肝切除を必要とする特殊性およびそこに至る患者・家族の葛藤や期待を考えると、再発率は限りなく“0”に近いものを達成する事が移植医療に携わる我々の使命と考える。

最近、新しい遺伝子キャリアーとして、人工的に合成されたカチオン性高分子が注目されている。核酸シャペロンの一つであるカチオン性高分子は生体内での核酸の正確なハイブリッド形成を介助しており、塩基対の解離・再形成に伴うエネルギーバリアーを低め、より安定な核酸ハイブリッドの形成を促す(図3)。例えば、臨床研究でも頻用されているPCR反応では、不完全に対合した核酸を完全なハイブリッド状態に戻すためには再加熱しその後アニーリングさせる事で元の二重らせんに戻す事が出来る。しかし細胞内では加熱・アニーリング過程を行う事は不可能であり、その代わりに核酸シャペロンがその役を担っている事が最近の研究で明らかになってきた。丸山ら(九州大学工学部)が開発したカチオン性くし型共重合体(PLL-g-Dex)は非常に高い遺伝子導入効率を有する人工的核酸シャペロンであり、Tmを

高め核酸ハイブリッドを効果的に安定化させるばかりでなく、DNA 同士の認識を邪魔する事なくハイブリダイゼーション速度を約 50 倍速め 100 倍安定化する事が確認されている (図 4)。さらに DNA と多価相互作用するためポリイオンコンプレックスを形成し、細胞内への効率良く取り込まれる事が明らかとなった。さらヒアルロン酸付加 (PLL-g-HA) にて肝類洞内皮細胞への特異的遺伝子導入が可能となる事が明らかになった。

安全な遺伝子治療を行うためには、非ウイルスベクターの開発が不可欠であるが、これまで Naked DNA、HVJ-liposome、Electroporation、Sonoporation は遺伝子導入効率が不良あるいは組織特異的でなく導入時に組織障害を併発する等の問題があった。

本 PLL-g-HA をベクターとして用いることにより DNA の情報が肝類洞内皮細胞に特異的に導入・発現し効果を発揮することが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、マウス肝移植モデルでの類洞内皮細胞へ新しく開発された遺伝子キャリアであるカチオン性くし型共重合体 (PLL-g-Dex) を核酸シャペロンとして用いて肝癌細胞に特異的・選択的に特異的 IL-12 遺伝子導入を行うことで、肝癌に対する遺伝子治療を確立し実臨床の領域へと展開することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PLL-g-HA と pCAGGS-mIL-12 の重合確認

まず、PLL-g-HA と IL-12 遺伝子を発現するプラスミドの重合確認作業を行う。さらに IL-12 遺伝子が適切に肝類洞内皮細胞に発現する事を確認する。1 M NaCl, 10 mM PBS (-) (pH = 7.4) に溶解しているプラスミド DNA 1 mL (プラスミド DNA 0.1 mg) に、同バッファーに溶解している PLL-g-HA (1 mg/mL) を N/P = 0-5 になるように加える (total volume が同じになるように 1 M NaCl, 10 mM PBS でメスアップ)。1 時間室温でインキュベーション後、NaCl 濃度が 137 mM になるようにリン酸緩衝液 (pH = 7.4) を加えて希釈し、さらに 30 分間インキュベーションを行う。インキュベート後、0.8 % アガロースゲル電気

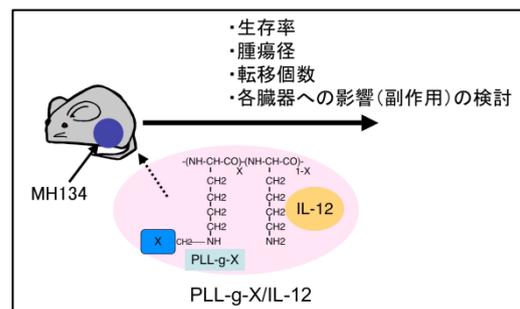
泳動 (20 分) を行ない、ethidium bromide で染色して観察する。この結果により最も効率の良い N/P 比を検討する。

(2) PLL-g-HA/pCAGGS-mIL-12 による肝類洞内皮細胞への遺伝子発現の確認

C3H マウス (8 週齢) に上記で作成した PLL-g-HA/pCAGGS-mIL-12 を尾静脈投与し、その発現量と期間を ELISA 法にて評価する。投与後 1, 6, 12 時間、1, 3, 5, 7 日目に肝臓組織、肺組織、血中の IL-12 を ELISA にて評価する。

(3) 腫瘍接種モデルにおける PLL-g-HA/pCAGGS-mIL-12 の抗腫瘍効果の検討

C3H マウス (8 週齢) に同種同系で確立された MH134 hepatoma cell line を接種した腫瘍モデルを作成する。肝被膜下に 1×10^6 個の腫瘍を接種する。接種後 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 日目に接種した腫瘍径及び、遠隔転移の有無について評価する。後の治療群との比較のため癌部・非癌部の組織より IL-12 及び IFN γ を ELISA にて測定する。IFN γ は腫瘍特異的な T 細胞の活性指標となる。C3H マウス (8 週齢) に MH134 を前述実験 3 に従い接種し、腫瘍モデルを作製する。PLL-g-HA/pCAGGS-mIL-12 を pCAGGS-mIL-12 換算 $100 \mu\text{g}$ の尾静脈投与を腫瘍接種と同日に行いその抗腫瘍効果について判定する。また、その際癌部・非癌部の組織より IL-12 及び IFN γ の測定を ELISA にて行い、コントロール群と比較する。



(4) 免疫抑制下における PLL-g-HA/pCAGGS-mIL-12 の抗腫瘍効果の検討

上記 4 にて確認した抗腫瘍効果が同様に免疫抑制状態においても発揮されることを確認する。C3H マウス (8 週齢) に Balb/c マウス (8 週齢) の全肝移植を行う。肝臓移植の際にバックテーブルで MH134 を肝被膜下に 1×10^6 個接種する。

閉腹後 PLL-g-HA/pCAGGS-mIL-12 を pCAGGS-mIL-12 換算 100 μ g 尾静脈注射する。接種後 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 日目に接種した腫瘍径及び、遠隔転移の有無について評価する。また、癌部・非癌部の組織より IL-12 及び IFN γ の測定を ELISA にて行い、コントロール群と比較する。

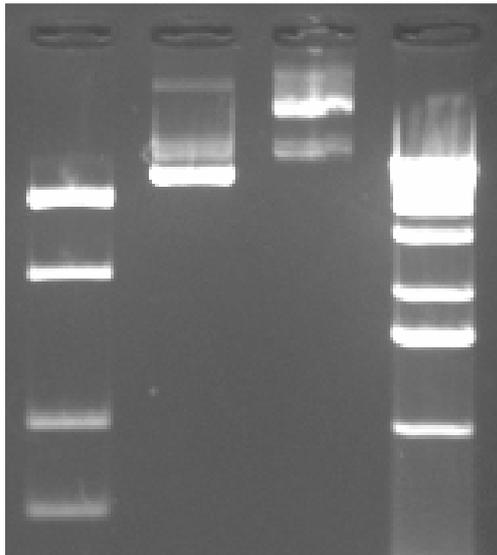
4. 研究成果

(1) PLL-g-HAとpCAGGS-mIL-12の重合確認

1) IL-12 遺伝子発現プラスミドの精製：2ヶ所の発現領域(EcoR1, BamHI)を有する pCAGGSにそれぞれ 1008bpのマウスIL-12 p40 cDNAと 1260bpのIL-12 p35 cDNAを挿入したプラスミドを用い E. coli JM109 competent cellを形質転換し、LB培地にて大量培養後、QIAGEN Mega kitを用いプラスミドを精製・回収し、その純度(O.D. 260/280)が 1.9 以上である事を確認した。さらに、HindIII、EcoR1にて酵素処理後、アガロースゲルにて電気泳動し、目的とするプラスミドが得られている事を確認した。

pCAGGS-mIL12			
sample No.	濃度(ng/ μ l)	純度(260/280)	収量(ng)
1	4956.4	1.79	991280
2	2911.4	1.91	582280
3	1529.2	1.93	305840
4	1497.2	1.93	299440
5	4180.2	1.86	836040
6	2483.7	1.91	496740
7	1797.1	1.92	359420
8	2666.1	1.89	533220
total			4404260

?? EcoR1 HindIII Plasmid
 切断 切断 のみ

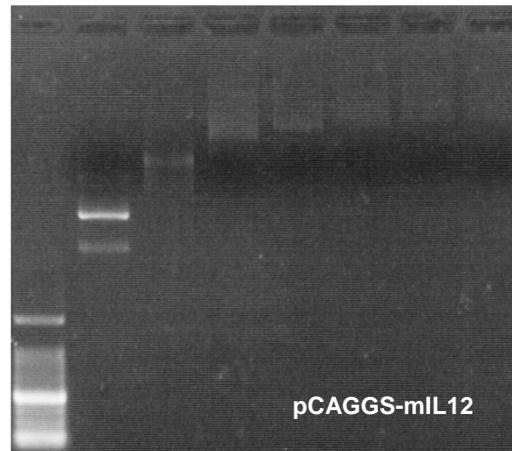


2) PLL-g-HAの精製：高分子ヒアルロン酸をヒアルロニダーゼを用いて切断し、低分子ヒアルロン酸を得た。水酸化シアノほう素ナトリウム(NaBH₃CN)を還元剤とし、0.1M pH8.0のホウ酸ナトリウムバッファー内にてヒアルロン酸(HA)とポリ-L-リシン(PLL)の重合反応を行い、恒温攪拌槽(40度)にて5日間処理した後、限外濾過(MWCO:25000)にて重合できなかったヒアルロン酸を取り除いた。さらに凍結乾燥にてPLL-graft-HAの粉末を得た。

3) PLL-g-HAとpCAGGS-mIL12の重合確認：1 M NaCl 10mM PBS(-) (ph=7.4)に溶解したプラスミドDNAに、同バッファーに溶解したPLL-g-HAをN/P比=0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5となるように加え、1時間室温にてインキュベーションした後、NaCl濃度が137mMとなるようにリン酸緩衝液(ph=7.4)を加えて希釈。更に30分間のインキュベーションを行い重合反応とした。アガロースゲルにて電気泳動し、プラスミドのバンド消失をもって重合の確認とした。N/P比=0.5よりバンドの消失が認められ、N/P比=3にて完全なるバンドの消失を認めた。

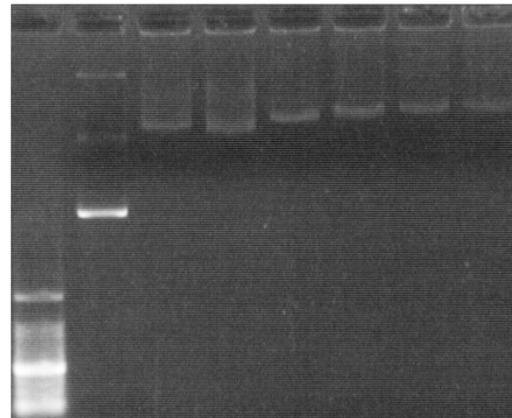
(N/P 比)

M 0 0.5 1 2 3 4 5



(N/P 比)

M 0 0.5 1 2 3 4 5

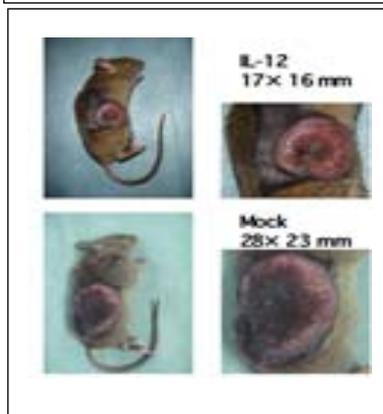
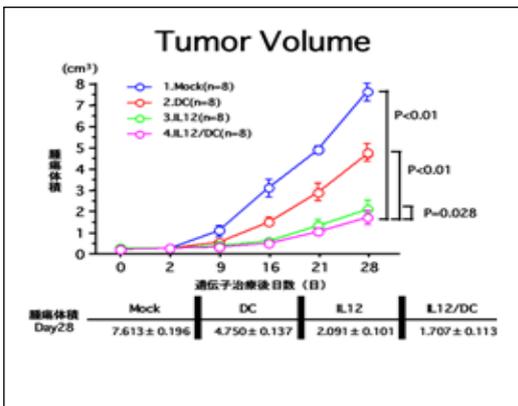


(2) PLL-g-HA/pCAGGS-mIL-12による肝類洞内皮細胞への遺伝子発現の確認

未実験。

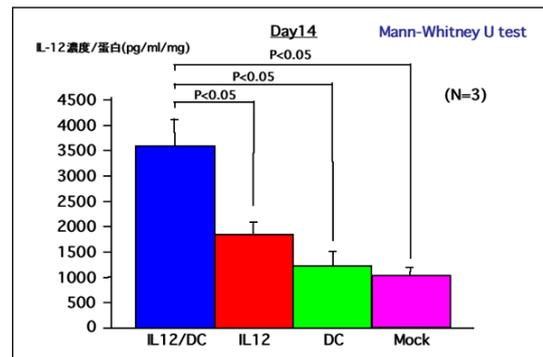
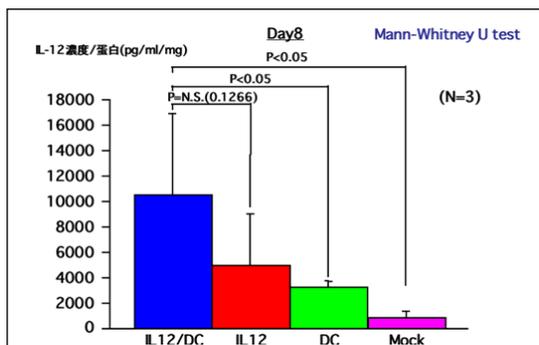
(3) 腫瘍接種モデルにおけるPLL-g-HA/pCAGGS-mIL-12の抗腫瘍効果

1) 腫瘍接種モデルの確立



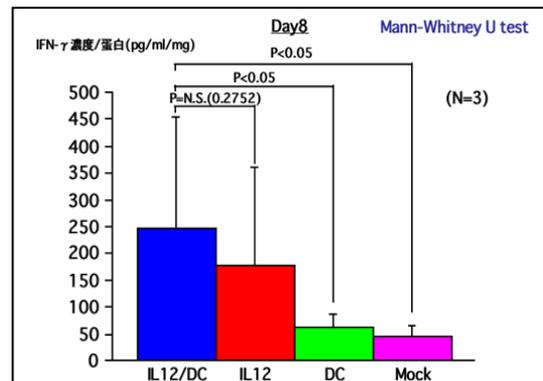
Day28における各4群間での原発皮下腫瘍容積の比較を行ったところ、Mock群：7.61 ± 0.20cm³、IL12群：2.09 ± 0.10cm³であり、IL12群で有意に腫瘍抑制効果を認めた。PLL-g-HA/pCAGGS-mIL-12は、持続安定的に供給ができず、本実験への使用ができなかった。

2) 原発皮下腫瘍におけるIL-12蛋白濃度の測定



各群の原発皮下腫瘍におけるIL-12蛋白濃度をELISAにて測定した。Day8（免疫抑制剤使用前）では、IL12/DC群とIL12群で差を認めなかったが、Day14（免疫抑制剤使用后6日目）では、IL12/DC群で他の3群と比較して有意にIL12濃度が高値であった。Day28では、4群間でIL12濃度に差は認められなかった。

3) 原発皮下腫瘍接種モデルにおけるIFN-γ蛋白濃度



各群の原発腫瘍におけるIFN-γ蛋白濃度を同様にELISAにて測定した。原発皮下腫瘍におけるIL-12蛋白濃度と同じく、Day14（免疫抑制剤使用后6日目）では、IL12/DC群で他の3群と比較して有意にIFN-γ濃度が高値であった。Day28では、4群間でIFN-γ濃度に差は認められなかった。

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 6件）

1. Soejima Y., Fukuhara T., Morita K., Yoshizumi T., Ikegami T., Yamashita Y., Sugimachi K., Taketomi A., Maehara Y.: A simple hilar dissection technique preserving maximum blood supply to the bile duct in living donor liver transplantation. Transplantation. 2008.

- 86(9): 1468-1469.
2. Soejima Y., Meguro M., Taketomi A., Ikegami T., Yamashita Y., Harada N., Ito S., Uchiyama H., Yoshizumi T., Maehara Y. Transpl Int. 2008. 21(4): 384-389.
 3. Soejima Y., Taketomi A., Ikegami T., Yoshizumi T., Uchiyama H., Yamashita Y., Meguro M., Harada N., Shimada M., Maehara Y. Living donor liver transplantation using dual grafts from two donors: a feasible option to overcome small-for-size problems? Am J Transplant. 2008. 8(4): 887-892.
 4. Soejima Y., Ueda N., Fukuhara T., Yoshizumi T., Ikegami T., Yamashita Y., Sugimachi K., Taketomi A., Maehara Y. One-step venous reconstruction for a right lobe graft with multiple vein orifices in living donor liver transplantation. Liver Transpl. 2008. 14(5): 706-708.
 5. Soejima Y., Ueda S., Sanefuji K., Kayashima H., Yoshizumi T., Ikegami T., Yamashita Y., Sugimachi K., Iguchi T., Taketomi A., Maehara Y. Sequential pancreatoduodenectomy after living donor liver transplantation for cholangiocarcinoma. Am J Transplant. 2008. 8(10): 2158-2162.
 6. Soejima Y., Takeishi K., Ikegami T., Uchiyama H., Taketomi A., Maehara Y. "All-in-one" ex vivo self-reconstruction technique using an autologous inferior vena cava for a right lobe liver graft with multiple and complex venous orifices. Liver Transpl. 2010. 16: 909-913.

[学会発表] (計2件)

1. 第108回日本外科学会 国際シンポジウム (平成20年5月15-17日、長崎)
「Salvage living donor liver

transplantation for recurrent hepatocellular carcinoma.」副島 雄二、武富 紹信、吉住 朋晴、山下 洋市、杉町 圭史、前原 喜彦

2. 第110回日本外科学会定期学術集会総会 (平成22年4月8-10日、名古屋) 国際シンポジウム「Extended indication for living donor liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: Kyushu University experience using a newly developed risk score.」Soejima Y., Shirabe K., Taketomi A., Yoshizumi T., Uchiyama H., Ikegami T., Maehara Y.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

副島 雄二 (SOEJIMA YUJI)

(独) 国立病院機構九州がんセンター臨床

研究部・消化器外科医長

研究者番号: 30325526

(2) 研究分担者

前原喜彦 (MAEHARA YOSHIHIKO)

九州大学・教授

研究者番号: 80165662

(2) 研究分担者

武富紹信 (TAKETOMI AKINOBU)

九州大学・助教

研究者番号: 70363364