

平成22年 5月21日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791551

研究課題名 (和文) がん細胞の遺伝子治療における Del 1 および Fas L の影響

研究課題名 (英文) The effected of cancer gene therapy for Del 1 and Fas L

研究代表者

北野 尚孝 (KITANO HISATAKA)

日本大学・医学部・専修医

研究者番号：50424726

研究成果の概要 (和文) : FasL と FasL/E3D1 の変異遺伝子を作成しがん細胞に遺伝子導入した。観察にて、FasL、あるいは FasL/E3D1 の遺伝子導入した細胞は、Del1 によって FasL 蛋白が細胞外基質に濃縮され、その蛋白が有効にアポトーシスを起こし、さらに2回目の遺伝子導入効率を向上させることが確認された。Del1 の沈着ドメインが、種々の生理活性物質を、その機能を損なうことなく、組織に濃縮できることが示された。

研究成果の概要 (英文) : FasL and FasL/E3D1 was made and transfected for a cancer cell. In this examination, the transfected cells were concentrated to FasL protein for ECM by Del1. Andmore, the protein was effected to apoptosis and, second gene transfer. It was shown that the organization could concentrate it without a composed domain of Del1 losing the function with various kinds of bioactive substances.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：癌、遺伝子、蛋白質、バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の特徴的な性質は細胞が不死化していることである。不死化細胞は細胞自身によるアポトーシスが誘導されないため異常増殖をきたす。これまでの研究によって扁平上皮癌細胞表面の Fas タンパクと FasL の

結合はアポトーシスを誘導することが明らかとなっている (Elojeimy S, et al. Mol Ther, 2007, 15, 1258-1263)。Fas は受容体ドメインが細胞表面に露出した膜タンパクで、細胞障害性 T 細胞等の産生する FasL と結合する。

death factor として Fas 受容体に結合した FasL は、アポトーシスを誘導する。このアポトーシスの過程では、ICE(interleukin 1b converting enzyme)ファミリーのシステインプロテアーゼが順次活性化される (Gopalan B, et al. Cancer Res, 2005, 65, 3017-3024)。また、T細胞表面における Fas と FasL の結合はその結合により相補的な死活性化物質と結びついて T細胞にシグナル伝達する。それが caspase-8 を活性化し caspase カスケードを活性化する (Elojeimy S, et al. Cancer Gene Ther, 2006, 13, 739-745)。それによってアポトーシスを起こしたがん細胞の T細胞細胞による貪食作用が亢進するということが明らかになっている。

頭頸部癌は、体外から穿刺することで、比較的容易に組織特異的に遺伝子治療を行うことが可能なため、遺伝子治療の良い適応と考えられている。FasL 遺伝子を遺伝子導入されたがん細胞は FasL を過剰発現する。過剰発現した FasL は、がん細胞の Fas と結合し、がん細胞自身のアポトーシスを誘導する。

前述したようなメカニズムでがん細胞は除去されるのだが、がん細胞の防御機構も報告されている (Villa-Morales M, et al. Cancer Res, 2007, 67, 5107-5116)。例えば、肺癌や大腸癌などのがん細胞は、Fas と結合できないように、FasL と結び付いてふさぐ、可溶性の「おとり」分子を多量に分泌する。従って、細胞傷害性 T細胞は上記したメカニズムではがん細胞を殺すことができなくなる。また、他のがん細胞は FasL を大量に発現することで、がん細胞を破壊しようとする細胞傷害性 T細胞等を死滅させる。なぜなら、細胞傷害性 T細胞等もまた Fas を発現しているからである。したがって、FasL を利用した遺伝子治療において有効的に FasL を標的細胞により作用させるためには、FasL が標的とするが

ん細胞表面周囲に長時間存在し、繰り返し Fas と結合できる状況をつくるのが大切である。

Del 1 は胎児の内皮細胞に発現する細胞外基質タンパクであり内皮細胞周囲の細胞外基質に沈着する。構造上 3つの EGF ドメインと 2つの discoidin のドメインを持つ(図 1)(Hidai, et al. Genes Dev, 1998, 12, 21-33)。申請者は、Del 1 のドメイン解析を行い、それぞれのドメインが特徴的な機能を持つことを明らかにしてきた。申請者は、Dell の第一 discoidin ドメイン に細胞外基質への沈着機能があることを報告した (Hidai et al., Cell Tissue Res, 2007, 330(1), 83-95)。培養細胞を用いた実験では、このドメインを有するタンパクの 70%が細胞外基質に沈着する。容積あたりの濃度に換算すると、細胞外基質内の濃度は、培養液中の濃度の数百倍となる。この性質は in vivo においても認められた。また、この方法により細胞外基質に沈着させたアルカリフォスファターゼや他の酵素が、in vitro でも in vivo でも酵素活性を失わないことが確認されている(特許出願中)。

また、同タンパクの第三 EGF ドメインに遺伝子導入効率を向上させる機能があることを明らかにした(投稿中)(特許出願中)。同ドメインを含むタンパクを培養液中加入することで、試したすべての遺伝子導入試薬の効果を 2 倍から 5 倍に増加することができた。この効果も、in vivo で確認されている。

## 2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮癌に対する FasL 遺伝子を用いた遺伝子治療の研究が行われている。申請者は、FasL 遺伝子に Dell の上皮由来成長因子(EGF)ドメインと discoidin ドメインを融合させることで、遺伝子治療の効果を飛躍

的に向上させることができると考えている。頭頸部扁平上皮癌における Fas ligand(以下 FasL)を用いた遺伝子治療の効果を飛躍的に向上させるための研究を行う。

### 3. 研究の方法

1. 適当な制限酵素サイトを含むプライマーを使いRT-PCRで作製したFasLのcDNAをHaloTag<sup>®</sup>がついているpFC8Aに組み込む(pFasL)。次に、De11のcDNAから、pFasLを作製した時に使用した制限酵素サイトを含むプライマーを使用し、第三EGFドメインと第一discoidinドメインをコードする配列をPCRで増幅する。これをpFasLのFasLのC末端に組み込み、pE3D1/FasLを作製する。またLacZ遺伝子のcDNAをpFC8Aに組み込む(pLacZ)。その後シーケンスを行い目標遺伝子が組み込まれていることを確認する。

2. 培養がん細胞(口腔扁平上皮癌細胞株: SCC KN, NA, K0)にpE3D1/FasLおよびpFasLをそれぞれ遺伝子導入する。陰性コントロールとして空のpFC8Aを遺伝子導入する。また、遺伝子導入された細胞を標識するため、pLacZをco-transfectする。pE3D1/FasLを遺伝子導入したがん細胞とpFasLを遺伝子導入したがん細胞で遺伝子導入効率を観察、比較するために、遺伝子導入された細胞の一部をとり、細胞表面に提示されるHaloTag<sup>®</sup>融合タンパクを蛍光リガンドであるHaloTag<sup>™</sup> Resinで単離し、その活性を計測して標準化する。

3. 実際に融合タンパクが細胞外基質に沈着していることを確認するためにHaloTag<sup>®</sup>融合タンパクを蛍光リガンドであるHaloTag<sup>®</sup>TMRにて染色を行う。

4. pE3D1/FasLを遺伝子導入されたがん細胞およびpFasLを遺伝子導入されたがん細胞はFasLおよび第三EGFドメインの影響によりアポトーシスを起こすため培養液中にLDHが漏出する。培養液中に漏出したLDH活性を測定し、細胞傷害性を評価する。また、細胞よりDNAを採

取しDNAの寸断状況をアガロースゲルを用いたDNAの電気泳動にて調べる。

5.  $\beta$  ガラクトシダーゼ染色とTagの染色を行い、遺伝子導入された細胞とその周囲の細胞に及ぶ影響を経時的に観察する。アポトーシスの判定にはHoechst33258染色を行う。

6. 生き残っているがん細胞に1回目と同様に2回目の遺伝子導入を行う(図2)。その際、1回目にpE3D1/FasLを使用したがん細胞とpFasLを使用したがん細胞での2回目の遺伝子導入効率を観察、比較するために、2回目の遺伝子導入後、単離させたHaloTag<sup>®</sup>融合タンパクの活性を計測して標準化する。

7. 2回目の遺伝子導入後、培養液中に漏出したLDH活性を測定し、 $\beta$  ガラクトシダーゼ染色と、Hoechst33258染色によるアポトーシスの判定を行う。

8. ノードマウスの背部皮下に頭頸部癌由来の細胞株(SCCKN, NA, K0等)を注射し、ノードマウス背部皮下移植腫瘍を作成する。このノードマウス移植腫瘍に、以前作成したpE3D1/FasLから組み込んだcDNAを取り出し、安全キャビネット内でウイルスベクターを使用して組換えDNAを作製し、それを局所注射する。また、コントロール群として、同様に作製されたFasLの組換えDNAを局所注射する。さらに、陰性コントロール群として空ベクターをノードマウス移植腫瘍に局所注射する。そして、それぞれの移植腫瘍の体積を経時的に測定し遺伝子導入の癌組織に対する治療効果を解析する。

また、初回の遺伝子導入から1週間ごとに2回目、3回目の遺伝子導入を1回目と同様に行う。2回目以降の遺伝子導入にはウイルスベクターでなく、プラスミドを使用する。ウイルスベクターの場合、抗原性が問題となることがあり、そのために臨床では繰り返しの治療を避けることが好ましいからである。その間

も経時的に移植腫瘍の体積を測定する。腫瘍組織のH-E染色を行って組織学的な検討を行う。さらにHaloTag®タンパクの染色を行い遺伝子導入効率および導入された細胞の周囲に存在していると思われる導入遺伝子産物の検索を行う。さらにTUNEL染色を行いアポトーシスの検索を行う。

#### 4. 研究成果

RT-PCRで作製したFasLのcDNAをpcDNA3.1D/V5-His-TOPOに組み込んでpFasLを作製した。次に、Del1のcDNAから、アポトーシス誘導作用を有する第三EGFドメインと細胞外基質への沈着作用を有する第一discoidinドメインをコードする配列をPCRで増幅し、これをpFasLのFasLのC末端に組み込み、pFasL/pE3D1を作製した。口腔扁平上皮癌細胞株 (SCCKN) にpFasL/pE3D1およびpFasLをそれぞれ遺伝子導入した。また、遺伝子導入された細胞を蛍光タンパクによって標識するため、EYFP遺伝子をco-transfectした。Hoechst33258染色とEYFPの観察により、pFasL、あるいは、pFasL/pE3D1の遺伝子導入により、がん細胞にアポトーシスが誘導されることが明らかになった。また、pFasL/pE3D1の蛋白が細胞外基質に沈着していることが、免疫染色によって証明された。これらの結果により、Del1によってFasL蛋白が細胞外基質に濃縮され、その蛋白が有効にアポトーシスを起こすことが確認された。培養4日の口腔扁平上皮癌細胞株 (SCCKN) にpFasL/pE3D1およびpFasLをそれぞれ遺伝子導入した。その後、48時間後に培養液中のLDHの量を検討すると行うとpFasLを遺伝子導入した細胞よりも、pFasL/pE3D1を遺伝子導入した細胞のほうがアポトーシスをより誘導することが明らかになった。また、pFasL/pE3D1およびpFasLをそれぞれ遺伝子導入し、72時間後にAP-tag-4を遺伝子導入し、さらに24時間後に培養上清中のAP活性を検討した。pFasL/

pE3D1を遺伝子導入したほうが2回目のAP-tag-4の遺伝子導入率が亢進していた。つまり、Del1によってFasL蛋白が細胞外基質に濃縮され、その蛋白が有効にアポトーシスを起こし、さらに2回目の遺伝子導入効率を向上させることが確認された。Del1のEGF3ドメインおよび沈着ドメインが、種々の生理活性物質をその機能を損なうことなく、組織に濃縮できることが示され、今後は、様々な遺伝子療法への応用が期待される。

#### 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 Hisataka Kitano, Shinichiro Kokubun, Chiaki Hidai. The Extracellular Matrix Protein Del1 Induces Apoptosis via its Epidermal Growth Factor Motif, *Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)*, 393(4):757-76, 1, 2010. (査読有)
- ② Chiaki Hidai, Hisataka Kitano, Shinichiro Kokubun. The Del1 deposition domain can immobilize 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the extracellular matrix without interfering with enzymatic activity, *Bioprocess Biosyst Eng.*, 32(5): 569-573, 2009. (査読有)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

北野 尚孝 (KITANO HISATAKA)  
日本大学・医学部・専修医  
研究者番号：50424726