

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591572

研究課題名（和文） キレート化エンドスタチンを用いた腫瘍増殖抑制に関する研究

研究課題名（英文） Antitumor effect of Chelated Endostatin

研究代表者

矢野 智紀 (YANO MOTOKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40315883

研究成果の概要（和文）：

エンドスタチン発現ベクターを作製し、エンドスタチンの抗腫瘍効果を検討した。マウスを用いて、ルイス肺癌細胞株を 1×10^6 注射し、腫瘍結節を作成、体積が 100mm^3 に達した時点でエンドスタチンや各種抗腫瘍薬(ドセタキセル、5-FU)を単剤もしくは併用で投与し、その腫瘍増殖抑制効果を検討した。エンドスタチンのマウスへの投与は、腫瘍周囲に plasmid を局注した。5-FU、ドセタキセルともにエンドスタチンによる抗腫瘍効果の増強は認めなかった。

研究成果の概要（英文）：

We have assessed antitumor effect of chelated endostatin generating vector which secret chelated endostatin. We injected Lewis lung cancer cells (1×10^6) at the lateral abdominal wall of the BALBC mice. When the produced cancer nodule became 100mm^3 in a volume, we started chemotherapy using endostatin transfection and/or anticancer agents (DTX, 5-FU). Then antitumor effect was assessed. Endostatin tranfection was performed by direct injection with plasmids surrounding the cancer nodule. Unfortunately we could not find any advantages of endostatin transfection accumulating anticancer agents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：胸部外科学

キーワード：エンドスタチン

1. 研究開始当初の背景

癌研究は近年の医学研究の中心であり、その発展はめざましく、肺癌領域においても多くの研究がなされてきた。肺癌は胃癌、乳癌等に比べ予後不良であり、近年癌による死因の第一位を維持している。肺癌の予後はその病変が局所に留まっているか否かで決定される。局所に限局されている場合には外科的切除によって治癒可能である。しかしながら病変が局所を越えた場合、有効とされる抗癌剤等を併用した集学的治療を行っても、その効果はあまり期待できない。近年 tumor dormancy therapy という概念が提唱されてきた。腫瘍の進行を停止または遅延させ、腫瘍死に至るまでの期間を延長させようという試みである。この tumor dormancy を導く一つ的手段として血管新生の抑制が挙げられている。Folkman らは angiogenic switch の概念を提唱した。腫瘍の増大には血管新生因子と血管新生抑制因子とのバランスが重要で、初期の微小腫瘍結節が形成された後、血管新生因子の相対的な増加で血管が新生し、腫瘍が増大する。血管新生因子として vascular endothelial growth factor (VEGF) が最も注目されており、肺癌領域においても抗 VEGF 抗体であるベバシズマブは切除不能肺癌症例に通常の抗癌剤に

よる化学療法の効果を増強することが近年報告されてきた。しかし抗体療法は高価であり、抗体療法に代わる安価な物質の開発は大変重要である。

tumor dormancy therapy の概念の下、血管新生抑制因子の重要性が示唆され、エンドスタチンやアンギオスタチンなどの有望な内因性血管新生抑制因子が発見された。我々は以前から endostatin に注目してきた。エンドスタチンは 18 型コラーゲンの C 末端であり、このエンドスタチンを発現するプラスミドを作製し、非ウイルス性の liposomal vector を用いて肺の内皮細胞及び早期の腫瘍結節に形質導入を実現した。この形質導入法を用いてマウス転移性肺腫瘍モデルに適応させ、その抗腫瘍効果を報告してきた。エンドスタチンは生体内タンパクのフラグメントであり、通常の抗癌剤のような副作用が無いという利点が予想される。その反面、その構造は不安定で、リコンビナント蛋白の投与では有効な結果が得られてこなかった。そのため有効な投与法は大量のエンドスタチンを持続的に投与するか、ヒトへの遺伝子導入が必要になるが、実際問題ヒトへの遺伝子導入には多くの障壁がある。そのためエンドスタチンは夢の薬剤として実地臨床応用は困難と考えられてきたが、近年ヒトリコンビナントのエンドスタチンの N 末端をキレート化し

安定化することが報告された。このキレート化エンドスタチンを利用することで大量の持続的投与と同程度の効果を期待することができ、リコンビナントのエンドスタチンの実用化が可能になると予想される。

2. 研究の目的

近年肺癌診療において分子標的薬が脚光を浴びており、その中でも強力な血管新生因子である血管内皮成長因子 (VEGF) の抗体であるベバシズマブが注目され、抗癌剤との併用で生存期間の延長を認めている。しかし抗体療法は高価であり、抗体療法に代わる薬剤の開発が急務であり、我々はエンドスタチンに注目してきた。このエンドスタチンは生体に存在する物質であり、副作用がない。その不安定性から実地臨床には不適と思われたが、不安定性を解消するために N 末端をキレート化し、安定化出来ることが報告された。このキレート化エンドスタチンを精製しその効果を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

我々はマウスエンドスタチンを分泌する pSECtag-II-end を作成してきた。この手技と同様にヒト cDNA ライブラリーよりヒト 18 型コラーゲンを発現するプライマーを作成し、分泌配列を付加したプラスミド pSECtag-II に組み込み、さらにその N 末端に金属キレートシーケンス

(MGGSHHHHH) を発現する遺伝子を組み込み、キレート型ヒトリコンビナントエンドスタチンを分泌する

pSECtag-II-hEnd-Zn を作成する。これを大腸菌に導入し、大量培養を行い、

pSECtag-II-hEnd-Zn を大量に産生する。

これを 293T 細胞に導入し、培養液を回収する。これを Zn 配位カラムを用いて精製しキレート型ヒトリコンビナントエンドスタチン(hr-End-Zn)を作成する。

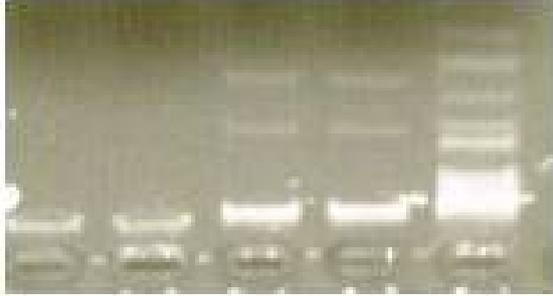
この安定化したキレート化エンドスタチンを精製、ウエスタンブロット法で確認する。ヒト肺癌細胞株で作成したヌードマウスの腫瘍モデルの周囲に局所注入し、腫瘍容積の変化を計測し、腫瘍増殖効果を評価する。腫瘍の増殖抑制効果の評価に加えて、血管新生抑制効果 (抗 CD31、抗 CD34 染色)、アポトーシスの評価を行い、キレート化エンドスタチンの効果を検討する。

4. 研究成果

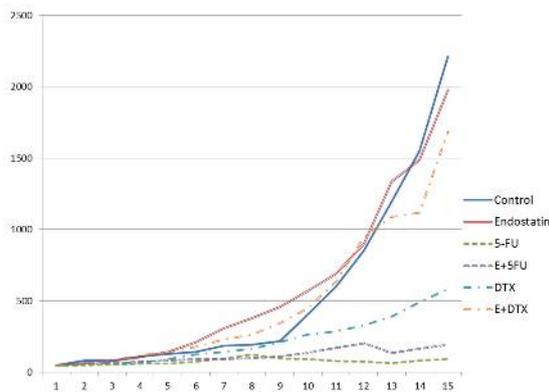
キレート化エンドスタチンの作成に先立ち、エンドスタチン発現ベクターを作製し、エンドスタチンの抗腫瘍効果を検討した。

Specific pathogen free マウスを用いて、Lewis 肺癌細胞株 1×10^6 をマウス側腹部皮下に注射、腫瘍結節を作製した。腫瘍体積が 100mm^3 に達した時点でエンドスタチンや各種抗腫瘍薬(ドセタキセル、5-FU)を単剤もしくは併用で投与し、その腫瘍増殖抑制効果を比較検討した。エンドスタチンは遺伝子を組み込んだ vector を大腸菌に導入し、培養、

plasmid を抽出。エンドスタチンを組み込んだ plasmid と、組み込まれていない vector 由来の plasmid の双方を電気泳動し、両者のバンドが異なることを確認した。



エンドスタチンのマウスへの投与は、腫瘍周囲に plasmid を局注した。薬剤投与後 14 日で動物実験規定にそって犠牲死させた。腫瘍増殖は 5-FU で著明に抑制された。5-FU、ドセタキセルともにエンドスタチンによる抗腫瘍効果の増強は認めず、とりわけドセタキセルではエンドスタチンとの併用により逆に抗腫瘍効果の減弱を認めた。



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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 智紀 (YANO MOTOKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40315883

(2) 研究分担者

佐々木 秀文 (SASAKI HIDEFUMI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00336695

横田 圭右 (YOKOTA KEISUKE)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床研究医

研究者番号：30569257

(3) 連携研究者

なし