

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 24 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22659319
 研究課題名（和文）レックリングハウゼン病に対するナノバブルを用いた遺伝子導入による治療法の開発
 研究課題名（英文）Development of the cure by the transgenics using the nano bubble to the Recklinghausen disease
 研究代表者
 館 正弘（TACHI MASAHIRO）
 東北大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：50312004

研究成果の概要（和文）：

当初は von Recklinghausen 病の原因遺伝子である NF-1 遺伝子をベクターに組み込むことは困難であることが明らかとなったため、目標を von Recklinghausen 病に合併する Malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) に対する遺伝子治療法の開発に変更した。

MPNST 由来の細胞に対する IFN- α , IFN- γ 遺伝子を導入したところ、著明な細胞数の減少が得られた。

研究成果の概要（英文）：

Initially the aim of this study was development of a gene therapy of von Recklinghausen's disease. However, because it became clear that integration of NF-1 gene into the vector was difficult, we have changed the target to Malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST), complicating disease of von Recklinghausen's disease.

We have observed a marked decrease in number of cells by transfection of IFN- α and IFN- γ gene into cells delived from MPNST.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	0	1,300,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	480,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：(1)レックリングハウゼン病 (2)NFI 遺伝子 (3)ナノバブル

(4)遺伝子導入 (5)遺伝子治療

神経症腫が多発する遺伝性疾患であり、17番染色体にある NF-1 遺伝子の異常により発症することが明らかになっている。

申請者らは圧電素子を面振動させた高次モードの超音波装置(特願 2006-109894, 国際特許 PTC/JP2001/057878)を開発し、これとナノバブルを組み合わせることで、従来の方法よりも4倍高い効率でプラスミド DNA を体細胞に導入することに成功している。この手法はウイルスベクターによる免疫原性や細胞毒性がない反面、超音波が届く範囲に適応が限定される特性がある。

von Recklinghausen 病の治療は、現在は外科手術以外の方法は確立していないが、その目的は体表面の整容的整容の改善であることから、上記手法を用いた遺伝子治療の良い適応になり得るものと考えた。

当初は 17 番染色体にある NF-1 遺伝子のクローニングと、遺伝子導入による治療法の開発を目的としていた。しかし、その後の調査により、NF-1 遺伝子は全長で 300kbp と長大であり、さらに、その中のどの部分が発症に寄与しているかなど不明な部分が多いため、現時点で有効な遺伝子配列をベクターに組み込むことは困難であることが明らかとなった。

von Recklinghausen's disease は Cafe au lait spot や皮膚に多発する神経症腫のほかに、浸潤性で切除困難であり、且つ疼痛などの症状を伴う plexiform neurofibroma (PNF) や、悪性腫瘍である Malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) を合併することがあり、臨床上的問題となっている。これらに対しては放射線療法や化学療法、サイトカイン療法などが試みられているが、いまだ有効な手段は確立していない。

これを踏まえ、当初の計画から方針を変更し、von Recklinghausen's disease に合併する悪性腫瘍である、malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) に対する遺伝子治療法の開発を目指すことにした。

2. 研究の目的

MPNST は肉腫の 5~10% を占め、そのうちの約半数が von Recklinghausen's disease に合併しているとされている。その多くは体表面近傍に発症し、現在の唯一の治療法である広範切除では整容的な問題を生じることがあるだけでなく、再発率も高く頻回の手術を余儀なくされることもある。そこで、体表に近い部位に発生した MPNST に対し、整容を損ねることなく治療する方法の開発が期待されている。

申請者らがおこなっている遺伝子導入手法はウイルスベクターを用いることなく、naked plasmid DNA を直接標的部位のみに、

高効率に導入することが可能であり、標的部位が限定されている疾患に対する遺伝子導入手法として臨床応用が期待されている。

INF は抗ウイルス作用とともに抗腫瘍作用があることが知られており、悪性黒色腫などの一部の腫瘍に対しては既に臨床応用されている。しかし、von Recklinghausen's disease およびその合併症に対する応用は、一部に有効性を示唆する報告が散見されるものの、十分な研究報告はいまだなされていない。

von Recklinghausen's disease およびその合併症の研究において、knockout mouse などの動物モデルの報告は散見されるが、ヒトと同様に体表腫瘍が多発する動物モデルは確立しておらず、腫瘍に対する vivo での研究はほとんどなされていない。また、neurofibroma や PNF 由来の細胞株も確立しておらず、現時点で一般に入手可能なのは MPNST 由来の細胞株数種のみである。

そこで、今回の研究は入手可能な細胞をもちいて、MPNST に対する IFN α および IFN γ 遺伝子治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

von Recklinghausen's disease に対する有効性を示唆されている IFN α 、IFN γ の MPNST への有効性を検証するため、まず in vitro. において、MPNST 由来の 2 種類の細胞株 (HS-Sch-2, HS-PSS) に対する増殖抑制効果を観察した。

(1) 細胞培養

細胞を 10% FBS 添加 DMEM 培養液で培養し、24well plate に $1.3 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^5$ / well の濃度で播種した。

(2) 遺伝子導入

plasmid vector は pORF-mIFN α , pORF5-mIFN γ (Invivogen) を増幅して 100ng/ μ l に調製したものをもちいた。また、in vitro. 実験での遺伝子導入には Lipofectamin LTX[®] (invitrogen) をもちい、培養液 37.3 μ l + Vector 2 μ l (200ng) + Plus reagent 0.2 μ l + Lipofectamin 0.5 μ l の反応試薬を調製した。

グループを① Control group: 上記反応試薬は用いず、代わりに DMEM 培養液を用いて培養液交換・洗浄操作のみを行った群

② No Vector group: 上記反応試薬の Vector を Buffer EB 2 μ l に置き換えた群

③ IFN α group: Vector として IFN α 遺伝子を含むプラスミドベクター (pORF-mIFN α) をもちいる群

④ IFN γ group: Vector として IFN γ 遺伝子を含むプラスミドベクター (pORF5-mIFN γ)

をもちいる群
の4群に分けた。

(3) 導入操作

24well plate に細胞播種した翌日、培養液を吸引し、PBS で洗浄したのち DMEM 培養液(FBS free) 200 μ l を添加した。

次いで(2) の反応液を各 well に添加して、37 $^{\circ}$ C で6時間反応させたのち、反応液を吸引除去してPBS で洗浄後 10%FBS 添加 DMEM 培養液 500 μ l を添加して 37 $^{\circ}$ C で培養した。

(4) 計測

① 発現確認；培養液中 IFN α 、IFN γ 濃度定量 (ELISA)

遺伝子導入の1・3・5日後の培養液を採取し、VerikineTM Mouse Interferon Alpha ELISA kit (pbl interferon source)および Quantikine[®] Mouse IFN- γ Immunoassay (R&D systems) をもちいて培養液中 IFN α 、IFN γ 濃度を定量した。

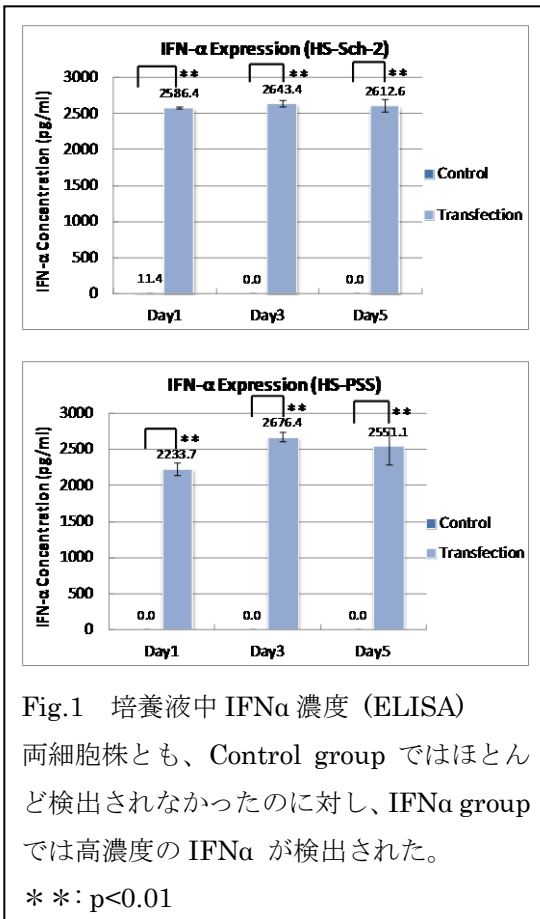


Fig.1 培養液中 IFN α 濃度 (ELISA)

両細胞株とも、Control group ではほとんど検出されなかったのに対し、IFN α group では高濃度の IFN α が検出された。

** : p<0.01

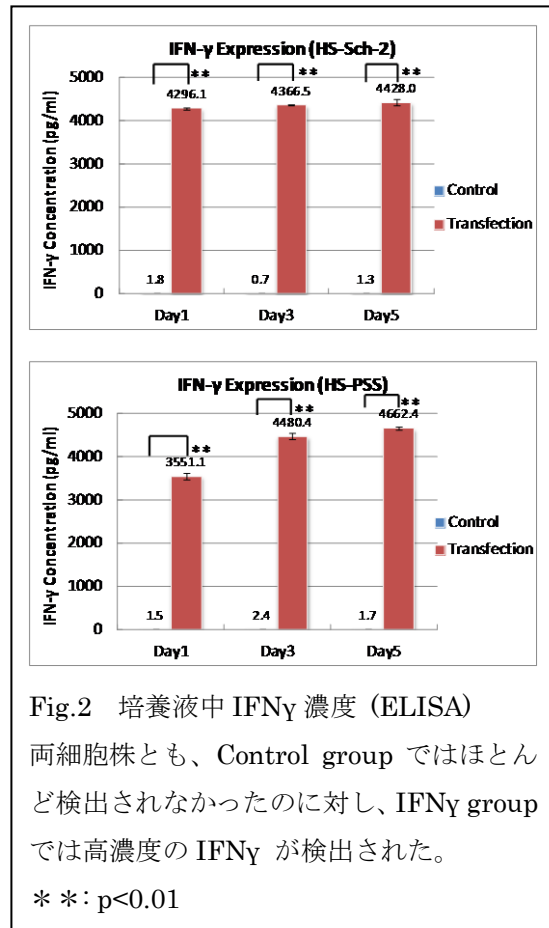


Fig.2 培養液中 IFN γ 濃度 (ELISA)

両細胞株とも、Control group ではほとんど検出されなかったのに対し、IFN γ group では高濃度の IFN γ が検出された。

** : p<0.01

② 細胞数定量

遺伝子導入の1・3・5日後に、5mg/ml の MTT solution 50 μ l を添加して 1hr 培養したのちに培養液を吸引除去し、DMSO を 300 μ l 添加してマイクロタイプレートリーダー (Sunrise Rainbow[®], TECAN) で 590nm の吸光度を計測することで、細胞数の定量をおこなった。

(5) 評価

① 培養液中 IFN α 、IFN γ 濃度を No Vector group と IFN α group, IFN γ group とのあいだで比較した。

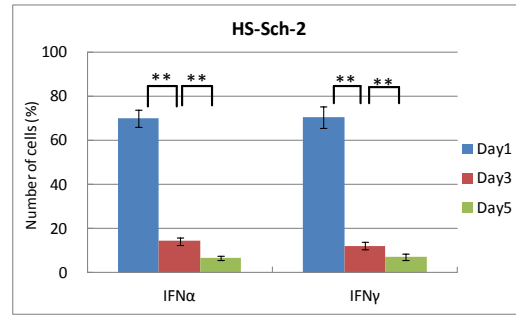
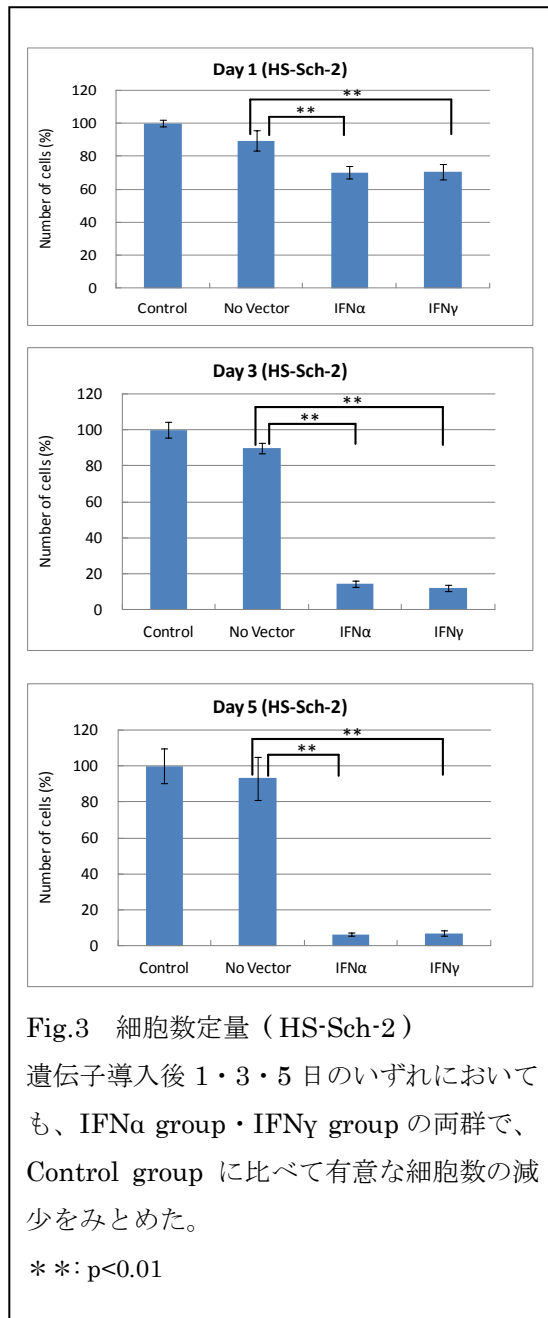
② 細胞数は Control group を 100% としたときの比(%) で評価し、No vector group と IFN α group, IFN γ group との差を比較した。
また、導入後の日数間の比較、細胞種間の比較も行った。

検定には t 検定を用い、p<0.05 を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 導入遺伝子発現確認

培養液中の IFN α ・IFN γ 濃度は、いずれの細胞株においても、Control 群（遺伝子導入なし）では極微量あるいは検出下限以下であったのに対し、Transfection 群(IFN α group、IFN γ group)では、IFN α : 2233~2612 pg/ml, IFN γ : 3551~4662 pg/ml と高い濃度で検出され、導入した IFN が強く発現するとともに、導入後早期より培養液中に放出されていることが確認された。（Fig.1, 2）



(2) 細胞数の定量

① HS-Sch-2 では、IFN α group、IFN γ group とも、全計測時において Control group に比べて有意に細胞数が減少を認めた。（Fig.3）

また、その効果は経時的に有意に増強されており、遺伝子導入後 5 日では IFN α group で $6.4 \pm 1.0\%$ 、IFN γ group では $7.0 \pm 1.4\%$ と、強い細胞増殖抑制効果のみとめた。（Fig.4）

② HS-PSS でも、HS-Sch-2 と同様に、全計測時点で IFN α group、IFN γ group ともに Control group に比べて有意な細胞数の減少を認めた。（Fig.5）

また、計測時点間の比較においても、HS-Sch-2 ほど顕著ではないものの、統計的に有意な細胞増殖抑制効果の経時的増強がみられた。（Fig.6）

両細胞株における細胞数の経時変化を比較したところ、IFN α では HS-Sch-2 で Day3 : $14.2 \pm 1.8\%$ 、Day5 : $6.4 \pm 1.0\%$ と強い増殖抑制効果のみとめるのに対し、HS-PSS では Day3 : $59.6 \pm 3.0\%$ 、Day5 : $40.1 \pm 10.7\%$ と効果が比較的弱く、両細胞種間に有意な差のみとめた。

また、IFN γ においても同様に、HS-Sch-2 で Day3 : $12.1 \pm 1.6\%$ 、Day5 : $7.0 \pm 1.4\%$ であったのに対し、HS-PSS では Day3 : $56.0 \pm 1.5\%$ 、Day5 : $44.5 \pm 3.6\%$ と、HS-Sch-2 のほうが HS-PSS に比べて有意に強い増殖抑制効果のみとめた。（Fig.7）

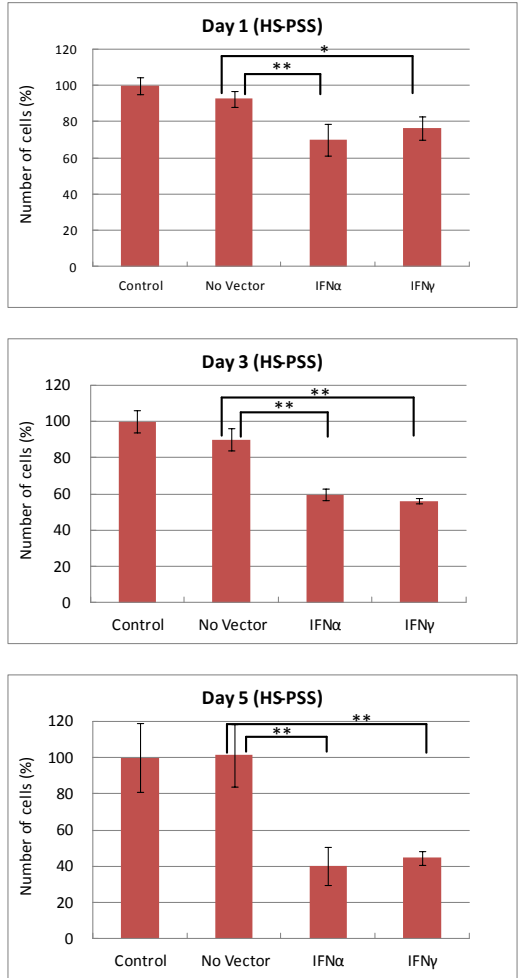


Fig.5 細胞数定量 (HS-PSS)
 遺伝子導入後 1・3・5 日のいずれにおいても、IFNα group・IFNγ group の両群で、Control group に比べて有意な細胞数の減少をみとめた。
 * : p<0.05, ** : p<0.01

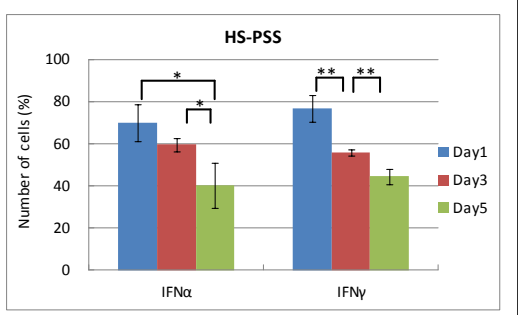


Fig.6 細胞数の経時的変化 (HS-PSS)
 IFNα group・IFNγ group の両群で、経時的な細胞増殖抑制効果の増強をみとめた。
 * : p<0.05, ** : p<0.01

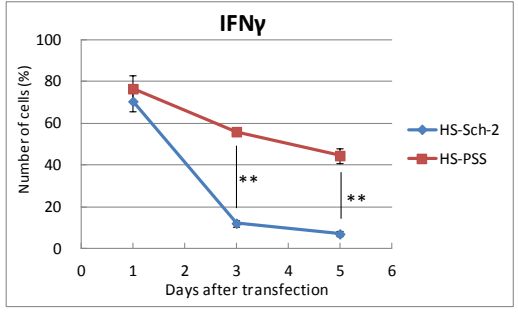
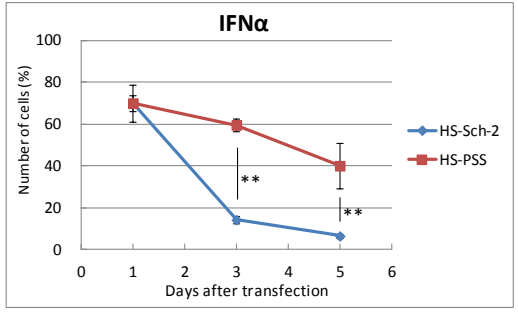


Fig.7 細胞株による増殖抑制効果の比較
 IFNα group・IFNγ group とともに、遺伝子導入後 3・5 日で、細胞種間で増殖抑制効果に有意な差がみとめられた。
 * : p<0.01

以上より、IFNα・IFNγ とともに MPNST 由来細胞に対して強い増殖抑制効果が認められ、遺伝子治療の対象となり得ることが示唆された。

一般に IFNγ は単独での抗腫瘍作用は比較的弱い、IFNα などの抗腫瘍作用の増強効果を得られるとされている。今回の実験では両者の効果に明らかな差は認められなかったが、培養液中 IFN 濃度をみると IFNγ の方が IFNα より高濃度で検出されており、この濃度差により差が相殺されている可能性も考えられる。今後は両遺伝子の共導入、あるいは共発現ベクターによる効果の検証も意義があるのではないと思われる。

今回の実験では細胞種間に細胞増殖抑制効果の差がみとめられた。現時点でその機序は不明であるが、この所見は IFN の抗腫瘍作用の機序を考える上での一助となる可能性がある。

今回は vitro 実験のみであったが、今後は動物皮下に培養細胞を移植して腫瘍モデルを作製し、ナノ/マイクロバブル+超音波による遺伝子導入手法をもちいて、その抗腫瘍作用の検証を行う方針である。また、将来的に von Recklinghausen's disease の動物モデルが確立すれば、良性の neurofibroma や plexiform neurofibroma にまでその適応を

拡大し得るものとする。

()
研究者番号：

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)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

館 正弘 (TACHI MASAHIRO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50312004

(2) 研究分担者

小玉 哲也 (KODAMA TETSUYA)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40271986

今井 義道 (IMAI YOSHIMICHI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80323012

(3) 連携研究者