

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29日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22792019

研究課題名（和文） In vivo の遺伝子治療における Del-1 の効果

研究課題名（英文） The effect of Del-1 by in vivo gene therapy

研究代表者

北野 尚孝 (KITANO HISATAKA)

日本大学・医学部・専修指導医

研究者番号：50424726

研究成果の概要（和文）：

口腔扁平上皮癌細胞：SCCKNをヌードマウスの背部皮下に注射し移植腫瘍を作成した。移植腫瘍に対してpFasLおよびpFasL/pE3D1を用いて遺伝子治療を行った。腫瘍に対する治療は7日毎に腫瘍に注射を行った。

コントロールあるいは、pFasL の遺伝子導入を行ったマウスは治療開始 49 日後に全て死亡した。また、pFasL/pE3D1 で治療したマウスは、治療開始 49 日後の生存率は 87%であった。ヌードマウスの移植腫瘍に対し pFasL/E3D1 を投与すると腫瘍の増殖を抑制して延命効果があることが確認された。

研究成果の概要（英文）：

A nude mouse was injected an oral squamous cell carcinoma cell line : SCCKN at the subcutaneously back and made a transplant tumor. The transplant tumor was treated by the gene therapy of pFasL or pFasL/E3D1 gene. The pFasL or pFasL/E3D1 gene was injected every week. The all mice of control group and/or treated of pFasL gene group were dead of 49th days. But, the survival rate of mice with treated by pFasL/E3D1 was 87% at 49th days. It was confirmed that the dosage of pFasL/E3D1 controls the increase of tumor, and there is a survival benefit in a transplant tumor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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

1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝子治療の動きが活発になってきている。現在、頭頸部扁平上皮癌における遺伝子治療が p53 や FasL 遺伝子を中心に検討されている。また、遺伝子治療において治療効果を左右するのが遺伝子導入技術である。ウイルスベクターの使用は、ウイルスが持つ自然の力を利用し遺伝子導入する方法である。代表的なものとして、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、AAVベクター等がある。ウイルスベクターは一般に高い遺伝子導入効率を示すが、発がん性の問題があり、ベクターを大量作製する手間もかかる。一方、非ウイルスベクターの導入法としては、poliplex法や lipofection法がよく利用されている。安全性は高く簡便であるが遺伝子導入効率と遺伝子発現持続時間の点でウイルスベクターには及ばないのが現状である。このような背景から非ウイルスベクターの遺伝子導入効率を改善することが今後の遺伝子治療が進歩する上で重要な鍵を握っていると考えられる。

我々は、非ウイルスベクターの導入率改善に、細胞外基質タンパクである Del1 が利用できることを考えた。申請者らは細胞外基質中の EGF3 ペプチドが *in vitro* で遺伝子導入効率を向上させることを確認している。また、Del1 の過剰発現マウスは正常に成長・増殖することが報告されており、生体に対する障害性は低いと考えられる。これらの事実から、EGF3 ペプチドは *in vivo* での遺伝子導入効果を改善する補助薬として有望と考えられた。

2. 研究の目的

in vitro の実験で発見された Del-1 ペプチドの遺伝子導入効率改善効果を *in vivo* に応用し、遺伝子治療補助薬として開発するための研究を行う。マウスに対して静脈、皮下、腹腔内投

与によるマーカー遺伝子の導入を行い、Del1 ペプチドの生体内投与によってもたらされる効果や副作用について検討する。そして、その効果を、マウス移植癌の FasL による遺伝子治療に適用し、Del1 ペプチドの使用による遺伝子導入率の向上と治療効果の改善を目指す。

3. 研究の方法

2010年度：

市販の遺伝子導入試薬を用いて、マーカー遺伝子をマウスに導入する実験系において、EGF3ペプチドの効果と副作用について分析する。

方法：

- マーカー遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いる。ルシフェラーゼ遺伝子を含む発現ベクター (pcDNA3/GL) をICRマウスに投与する。遺伝子導入試薬は市販の *in vivo* jetPEI (Polyplus transfection社) を用いる。遺伝子導入後24時間で、深麻酔によりマウスを解剖し、採血、各臓器を摘出する。臓器より lysate を作成し、マイクロプレート用ルミノメータ装置を用いて、ルシフェラーゼ活性を定量する。大腸菌を使ってEGF3ペプチドを作成し、EGF3ペプチドの使用の有無により生じるルシフェラーゼ発現量の変化について検討する。
- 遺伝子導入を受ける組織の詳細な観察のため、GFP蛍光タンパクの発現ベクター (pcDNA6.2) を用いて上記の実験を行う。マウスを解剖後、凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡で観察する。導入される細胞の種類、分布、数について観察する。
- DNAおよびEGF3ペプチドの投与経路として、静脈注射 (尾静脈)、皮下注射、腹腔内投与等が考えられる。
- EGF3ペプチドを生体に投与した報告は過去にないため、投与方法の工夫は本研究の重要な部分である。我々が行った *in vitro* での実験では、EGF3

ペプチドはDNAの投与前でも、同時投与でも有効であった。EGF3ペプチドがエンドサイトーシスを活性化するならば、DNAの投与後が好ましいかもしれない。また、投与量についても詳細に検討する必要がある。*in vitro*では最低1ng/mlから有効で、60ng/ml以上に増やしても効果は変わらなかった。このデータを参考に投与量を決めていく。

- 各臓器の凍結切片を染色して、臓器障害について検討する。特に *in vitro* の実験では、高濃度の EGF3 ペプチドはアポトーシスを誘導することが解っている(投稿中)ので、Tunel法を用いて組織でのアポトーシスの有無を調べる。

2011年度：

市販の遺伝子導入試薬を用いて、マウス移植腫瘍に遺伝子導入する実験系において、EGF3ペプチドの効果と副作用について分析する。

方法：

- がん細胞(口腔扁平上皮癌細胞：SCCKN)をヌードマウスの背部皮下に注射しマウスに移植腫瘍を作成する。RT-PCRで作製したFasLのcDNAをpcDNA3.1D/V5-His-TOPOに組み込んでpFasLを作製する。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を作製する。移植腫瘍に対してpFasLおよびpFasL/pE3D1を用いて遺伝子治療を行う。コントロールとしてpcDNA3.1Dを同様に遺伝子導入した。投与経路として、腫瘍に直接局所注射を行う。その後、経時的に腫瘍の大きさとマウスの状態を観察・測定続ける。
- DNAの投与経路として他に、静脈注射(尾静脈)、皮下注射、腹腔内投与等が考えられる。
- FasL遺伝子とDel-1の第三EGFドメインと細胞外基質への沈着作用を有する第一discoidinドメインを融合

した遺伝子を生体に投与した報告は過去にないため、投与法の工夫は本研究の重要な部分である。我々が行った *in vitro* での実験では、DNAの投与は有効であった。しかし、投与量については詳細に検討する必要がある。大きさにより投与量を変更しなくてはならないかもしれない。

- 腫瘍組織の凍結切片を Tunel 法を用いて染色して、組織でのアポトーシスの有無を調べる。

4. 研究成果

ヌードマウスの移植腫瘍に対し pFasL/pE3D1 を投与すると二段階の腫瘍減少効果があることが確認された。

ヌードマウスの移植腫瘍に対し pFasL/pE3D1 を投与すると腫瘍の増殖を抑制して延命効果があることが確認された。

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 件)

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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◇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

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：