

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791786

研究課題名(和文) PTEN 遺伝子導入による膀胱癌の浸潤転移予防についての同所性モデルを用いた検討

研究課題名(英文) Liposomal PTEN Gene Therapy in an Orthotopic Bladder Cancer Model and Prevention of Tumor Invasion and Metastasis

研究代表者

松本 一宏 (MATSUMOTO KAZUHIRO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：80366153

研究成果の概要(和文): まず *In vitro* にてマウス膀胱癌細胞株 MBT-2variant 細胞にリポソーム法にて LacZ プラズミド導入を行い、X-gal 染色にてプラズミドの効率的な導入を確認した。また同様に PTEN プラズミド導入も行い、Western blot 法にて MBT-2variant 細胞内での PTEN 蛋白の発現の持続、Akt 活性の低下が確認された。次に C3H/HeN マウスの膀胱内へ MBT-2variant 細胞 (5×10^5 乗 cells) を注入することにより、マウス膀胱癌同所性モデルを作成する手技を確立し、このモデルでは 30 日目頃にマウスは癌死することがわかった。*In situ* での膀胱内への LacZ プラズミド導入では、特に腫瘍巣に強い X-gal 染色を認め、効率的な遺伝子導入が *in situ* でも行われていることが確認された。よって本手法は、筋層非浸潤性膀胱癌に対する膀胱内注入治療確立の布石となる可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文): Efficient gene transfection of LacZ reporter plasmid to MBT2 variant cells using a reagent GenePORTER3000 was confirmed with X-gal staining. In the same way, we transfected PTEN plasmid to MBT2 variant cells, and observed high expression of PTEN protein and also restriction of Akt activity by Western blot method. Next, we established the orthotopic bladder cancer model by injecting MBT-2 variant cells (5×10^5) into the bladder through the urethra. We found that the tumor gradually grew as an apparent visible mass, which caused the death around day 30. Our results *in situ* showed that, using liposome-mediated LacZ gene transfer via simple intravesical instillation, there was a strong X-gal staining on the tumor sites, indicating the efficient tumor-specific transfection. In conclusion, the present data indicate that our procedure of PTEN gene therapy may be helpful for the establishment of new therapy for non-muscle invasive bladder cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：PTEN、遺伝子治療、免疫治療、筋層非浸潤性膀胱癌

1. 研究開始当初の背景

筋層非浸潤性膀胱癌に対しては通常 TUR-BT（経尿的膀胱腫瘍切除術）を施行するが、3年以内に約 70% のケースが再発し生涯

再発を繰り返すことも多い。また再発を繰り返す内に、徐々に筋層浸潤や遠隔転移を伴う進行癌に進展するものも少なくない。筋層非浸潤性膀胱癌の再発予防のための adjuvant 治療として、BCG 膀胱内注入療法がスタンダ

ードな治療法として広く施行されている。しかし現状の BCG 膀胱内注入療法はあくまで再発予防効果しかなく、進展予防効果は明らかとされていない。筋層非浸潤性膀胱癌の進展率を減少させるため、新たな治療が求められているのが現状である。

当教室では BCG 膀胱内注入療法に代わる次世代の治療として各種インターロイキンによる遺伝子導入治療の研究をこれまで数多く行ってきた。癌に対する遺伝子導入治療はさまざまな癌種に対する治療法として期待されているが、臨床におけるその有効率はこれまでのところ一般的に低いとされている。生体内局所の癌細胞に効率良く目的の遺伝子を導入することが現実的に困難であることが、その原因のひとつと考えられている。しかし膀胱癌の場合、導尿という比較的簡単な手法で膀胱内に一定時間ベクターを注入し貯留させることができるため、高い遺伝子導入効率が期待できる。つまり、膀胱癌は解剖学的に遺伝子導入治療に非常に適していると言える。遺伝子導入にはウイルスを用いる遺伝子導入法と物理化学的に非ウイルスを導入する方法に大別できる。ウイルスベクターは導入効率の点で有利とされているものの、本邦においてはその安全性への確立が未だ明確ではない。一方、非ウイルスベクター遺伝子導入法の一つであるリポソーム法は安全性、簡便性、コストの面で非常に優れている。また *in vivo*での遺伝子導入は、米国を中心とした臨床治験においてその安全性が示されており、本邦においても悪性グリオーマに対し既に臨床研究されており現実的である(J. Yoshida *et al*, *Cancer Sci.*, 2004)。これまで当教室においてもリポソーム法を用い、IL-2 (Y. Horiguchi *et al*, *Gene Ther*, 2000)、IL-12 (M. Horinaga *et al*, *Urology*, 2005)、IL-15 (K. Matsumoto *et al*, *Hun gene therapy*) のサイトカインに関して、マウス膀胱癌同所性モデルを用いてその抗腫瘍効果を証明し報告してきた。またこれまでの研究により、リポソーム法を用いると正常膀胱粘膜 (GAG layer) が欠損している腫瘍細胞に特異的に遺伝子が導入される傾向が認められている。これまでに当教室にて培ってきたマウス同所性膀胱腫瘍モデルを用い、われわれは新たに癌抑制遺伝子をターゲットとした治療法を確立したいと考えた。

2. 研究の目的

PTEN (phosphatase and tensin homolog

deleted on chromosome)は種々の癌において高頻度に DNA 変異が認められ、癌抑制遺伝子の代表格に位置づけられる。PTEN/PI3K シグナル経路は細胞増殖、アポトーシス、細胞遊走、幹細胞の自己複製・維持、ゲノムの安定性を制御することにより、癌化制御に必須のシグナル経路であることが解明されている。膀胱癌においても筋層非浸潤性膀胱癌に比べ、進行癌において大幅に PTEN の発現が抑制されていることが既に知られている (H Tsuruta *et al*, *Cancer Res*, 2006)。つまり「生涯表在性の再発を繰り返す膀胱癌と、徐々に進展していく膀胱癌との違いは何であるのか」という膀胱癌研究における長年のテーマに PTEN 遺伝子が深く関与していることが予想される。これまでに膀胱癌モデルに対する PTEN 遺伝子治療の実験報告は検索しうる限り 1 件のみであるが (M Tanaka *et al*, *Gene Ther*, 2003)、ヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いたものであった。またその遺伝子導入法はウイルスベクターを用いた腫瘍内局注であり、臨床応用には程遠いものである。

膀胱腫瘍の治療研究を行う際、臨床応用を念頭に置くと当然 *in vitro*よりも *in vivo*での動物実験の検証が重要となる。さらに皮下腫瘍モデルではなく、同所性に膀胱腫瘍を確立し、膀胱内注入を行う研究は現在の実際の膀胱癌治療に則したモデル研究である。また皮下腫瘍モデルと異なりより臨床のヒト膀胱癌に近く、筋層非浸潤性癌で発生した腫瘍巣が徐々に筋層浸潤を来たず経過を辿っていく。さらにヌードマウスや SCID マウスを使用しないため、安定した動物実験を行うことが可能である。今回われわれは同所性膀胱腫瘍モデルを用い、当教室で系統的に行われてきた遺伝子研究手法を用いて、PTEN の遺伝子導入、膀胱癌への治療効果の応用を検討することを目的とした。今まで、同所性膀胱腫瘍モデルに PTEN プラズミドをリポソーム法にて膀胱内注入により導入し、膀胱腫瘍に対する膀胱内 PTEN 遺伝子注入療法の確立を行った報告は見当たらない。また本研究により、筋層浸潤や遠隔転移に関する PTEN 発現低下やそれに伴う分子機構の詳細が明らかにされることは、新規分子標的治療や診断マーカー開発への大きな布石となりうると考えられた。

3. 研究の方法

(1) *In vitro*での PTEN 遺伝子導入実験
種々の濃度のリポータープラズミド (LacZ)

とりポソームを混ぜりポプレックスを作成、RPMIに懸濁し、MBT-2 variant細胞培養dishに30分間加え遺伝子導入する。遺伝子導入効率をX-gal染色を用い測定し、最も導入効率のすぐれたりポソーム製剤およびプラスミドとりポソームの比率を同定する。また遺伝子導入に伴う細胞毒性をWSTアッセイにて確認し、至適濃度を決定する。次にその導入手法に基づき、PTENプラスミドを同様にMBT-2 variant細胞に導入する。PTEN遺伝子を導入されたMBT-2 variant細胞内でのPTEN蛋白発現およびAkt活性の経時的变化をWestern blot法で同定する。

(2)マウス膀胱癌同所性モデルの作成
MBT-2 variant細胞は、化学発癌物質FANFTを経口摂取させることにより膀胱癌を自然発生させたマウスより樹立されたMBT-2細胞の転移能を増強させた細胞である(M Horinaga, *et al*, Urology, 2005)。全身麻酔下にC3H/HeNマウスの膀胱内へMBT-2 variant細胞(5 × 10⁵ cells)を注入し2時間尿道を結紮することにより、マウス膀胱癌正所性モデルを作成する。その後、膀胱を摘出し膀胱腫瘍の形成時期を病理学的に確認する。また経時的に、マウス膀胱癌同所性モデルの生存期間を確認する。

(3) *In situ*での経尿道的遺伝子導入実験
LacZプラスミドとりポソームを上記実験で求めた至適比率、至適濃度で混ぜてりポプレックスを作成し、RPMIに懸濁し、計0.2mlとする。これを全身麻酔下のマウス膀胱癌正所性モデルの腫瘍形成後の膀胱内に注入する。その後膀胱を摘出し腫瘍細胞内に遺伝子が導入されていることをX-gal染色で確認する。

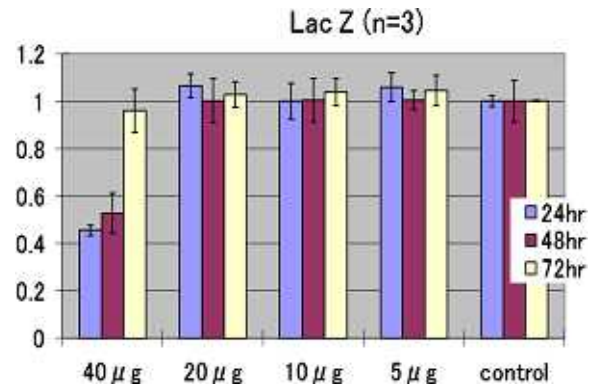
4. 研究成果

(1) *In vitro*での遺伝子導入
60-mm culture dish上の5 × 10⁵ MBT-2 variant細胞に対し5 μgまたは10 μgのLacZプラスミドをそれぞれ25 μgまたは50 μgの各種りポソームを用い遺伝子導入を行った。X-gal染色の結果、50 μgのGenePORTER3000を用いた際に最も高い導入効率を示した。

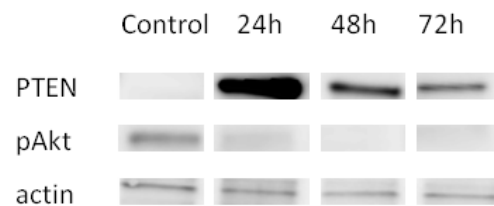
リポソーム	dose	導入効率
GenePORTER	25 μg	14.0%
GenePORTER	50 μg	11.4%
GenePORTER3000	25 μg	25.8%
GenePORTER3000	50 μg	30.4%

FuGENE	25 μg	18.3%
FuGENE	50 μg	22.5%

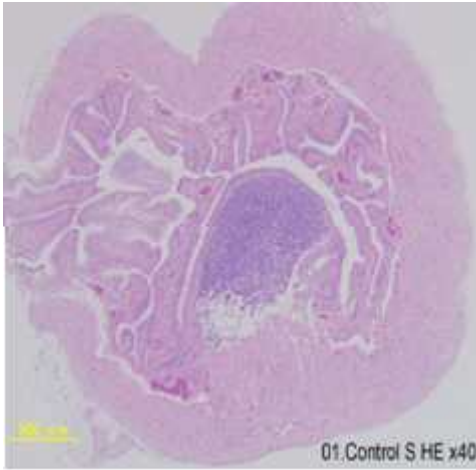
またLacZプラスミドを各dose(40, 20, 10, 5 μg)で遺伝子導入を行い(それぞれりポソームdose200, 100, 50, 25 μgに対応)細胞毒性をWSTアッセイにて確認したところ、りポソームdose100 μg以下では直接的な細胞毒性を認めなかった。



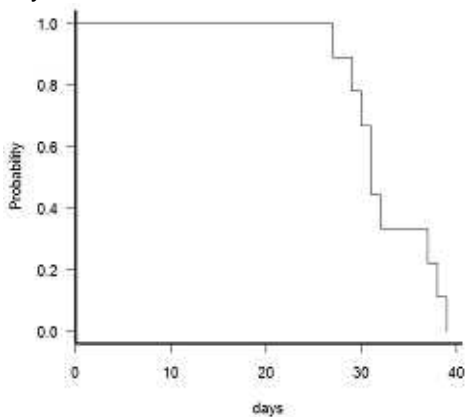
次に上記手法に従い、PTENプラスミド10 μgとりポソーム50 μgを用い5 × 10⁵ MBT-2 variant細胞に遺伝子導入を行った。導入前、導入後24時間、48時間、72時間の細胞を用いWestern blotを行い、有意なPTEN蛋白の発現およびAkt活性の低下を確認した。



(2)マウス膀胱癌同所性モデルの作成
全身麻酔下にC3H/HeNマウスの膀胱内へMBT-2 variant細胞(5 × 10⁵ cells)を注入し2時間尿道を結紮した。この手法により100%の腫瘍生着を確認できた。顕微鏡下にDay3には腫瘍巢の形成を認め、Day10には肉眼的にも腫瘍の確認が可能であった。



また 10 匹のマウス膀胱癌同所性モデルの生存期間を確認したところ、全てのマウスは Day30 頃に癌死を来した。



(3) *In situ*での経尿道的遺伝子導入実験
LacZプラスミド10 μ gとリポソーム50 μ gをRPMIに懸濁し、計0.2mlとし、上記モデルマウスDay5の膀胱内に注入し、2時間尿道を結紮した。翌日膀胱を摘出し、Xgal染色を行ったところ、腫瘍形成部分に特異的なLacZ遺伝子の導入を認めた。



現在、*in situ*での PTEN 遺伝子導入を行うことにより、腫瘍内での PTEN 発現および Akt 活性の低下を誘導できるかについて Western

blot を行い継続実験中である。また 23 日目に全マウスを安楽死させ、膀胱腫瘍を摘出し、その重量を測定し抗腫瘍効果の判定を行っている。

その上で今後 PTEN 遺伝子導入による浸潤抑制、転移抑制効果の有無について検討する予定である。

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] 0 件
- [学会発表] 0 件
- [図書] 0 件
- [産業財産権] 0 件
- [その他] ホームページ等特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 一宏 (MATSUMOTO KAZUHIRO)
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号：8 0 3 6 6 1 5 3

(2) 研究協力者

菊地 栄次 (KIKUCHI EIJI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：1 0 2 8 6 5 5 2

宮嶋 哲 (MIYAJIMA AKIRA)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：9 0 2 4 5 5 7 2

大家 基嗣 (OYA MOTOTSUGU)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：0 0 2 1 3 8 8 5