

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791448

研究課題名(和文) 臨床応用を目指した膵臓癌に対する遺伝子治療に関する検討

研究課題名(英文) Translational research of the gene therapy for pancreatic cancer

研究代表者

古川 賢英 (Furukawa, Kenei)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：80624973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円、(間接経費) 600,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓癌は予後不良な消化器癌の一つで、外科的切除が唯一の根治的治療であるが、発見時既に進行していることが多く、手術不可能な例も少なくない。この場合抗癌剤による治療が行われるが、その効果は十分とは言えないのが現状である。

我々は膵臓癌に対しアデノウイルスを用いて腫瘍壊死因子 (TNF- α) 遺伝子を膵臓癌に組み込み癌の成長を抑えられるか実験した。アデノウイルスによりTNF- α 遺伝子は膵臓癌に発現し、膵臓癌細胞を用いたシャーレ上の実験及び、マウスを用いた実験にて腫瘍の成長を抑止することが分かった。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is one of a most fatal digestive cancer. Though the only curative treatment of pancreatic cancer is the surgical resection, most patients are not amenable to resection because they are already advanced when diagnosed.

We examined that whether the tumor necrosis factor-alpha gene delivery could induce the progression of pancreatic cancer. We demonstrate that TNF-alpha gene delivery using adenovirus vector suppressed cancer growth in vivo and vitro.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・膵臓外科学

キーワード：FUT-175 NF- κ B Gemcitabine TNF- α アデノウイルスベクター 膵臓癌

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は、外科的切除が唯一の根治的治療となりうるが、再発・進行膵臓癌は集学的治療を行っても予後は依然として不良であり、膵臓癌に対する新しい治療法の開発が望まれる。我々は、本邦で膵炎、DICの治療に頻用されているプロテアーゼインヒビターであるメシル酸ナファモスタット(FUT-175)が膵臓癌の転写因子 Nuclear Factor- κ B (NF- κ B)を抑制し、apoptosisを誘導する作用があることを *in vitro*、*in vivo* において報告した。また、種々の抗癌剤は NF- κ B を活性化することで抗癌剤耐性を示すとされている。我々は、膵臓癌に対する標準化学療法である塩酸ゲムシタピン(GEM)と FUT-175 の併用化学療法が有効であることを基礎実験にて証明し、切除不能膵癌に対する FUT-175 併用 GEM の臨床試験を開始した。第 1 相試験では、FUT-175 併用による有害事象を認めず、現在第 2 相試験を進行中である。近年、新規膵臓癌治療としてアデノウイルスベクターを用いた Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)腫瘍内導入による遺伝子治療の有用性が報告され、米国で臨床試験が進行中である。しかしながら、TNF- α の apoptosis 誘導効果は同時に活性化される NF- κ B によって制限されることは周知の事実であり、我々は FUT-175 併用により NF- κ B を阻害することで TNF- α による遺伝子治療の抗腫瘍効果を増強できることを証明した。そこで今回、GEM、TNF- α 両者により活性化される NF- κ B を FUT-175 にて阻害することで膵臓癌に対する GEM 化学療法併用 TNF- α 遺伝子治療の抗腫瘍効果の増強を期待し、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究は、Nuclear Factor- κ B(NF- κ B)阻害剤が膵臓癌に対する塩酸ゲムシタピン化学療法併用アデノウイルスベクターを用いた Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)遺伝子治療の抗腫瘍効果を著明に増強することを証明し、膵臓癌の新しい治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト膵臓癌細胞株に対する FUT-175 併用による GEM、TNF- α の NF- κ B 活性化抑制の検討

ELISA

ヒト膵臓癌細胞株 (AsPC-1、MIAPaCa-2、Panc-1) に対して FUT-175、GEM、TNF- α を投与し、活性化された核内の NF- κ B を ELISA 法により定量し、NF- κ B 活性を評価する。

Western blotting

ヒト膵臓癌細胞株 (AsPC-1、MIAPaCa-2、Panc-1) に対して FUT-175、GEM、TNF- α を投与し、I κ B、p-I κ B を Western blotting 法により評価し、FUT-175 による NF- κ B 抑制

効果のメカニズムの検討を行う。

(2) ヒト膵臓癌細胞株に対する FUT-175 併用による GEM、TNF- α の抗腫瘍効果増強の検討

MTT assay

ヒト膵臓癌細胞株 (AsPC-1、MIAPaCa-2、Panc-1) に対して FUT-175、GEM、TNF- α を投与し、cell viability を MTT assay により評価する。

FACS

ヒト膵臓癌細胞株 (AsPC-1、MIAPaCa-2、Panc-1) に対して FUT-175、GEM、TNF- α を投与し、FACS による cell cycle analysis にて apoptosis の誘導効果を評価する。

Western blotting

ヒト膵臓癌細胞株 (AsPC-1、MIAPaCa-2、Panc-1) に対して FUT-175、GEM、TNF- α を投与し、caspase-3、8、PARP、cIAP1、2 を Western blotting 法により評価し、apoptosis の誘導効果を評価する。

(3) 膵臓癌皮下腫瘍モデルマウスによる FUT-175 併用 GEM、TNF- α 腫瘍内遺伝子導入の抗腫瘍効果の検討

ヌードマウスにヒト膵臓癌細胞株 (AsPC-1、MIAPaCa-2) を皮下注射し膵臓癌皮下腫瘍モデルマウスを作製する。腫瘍径が 8mm に達した時点で下記の治療を開始する。

1. Control 群: AxCALacZ 腫瘍内投与 + 蒸留水腹腔内投与

2. GEM、TNF- α 併用群: GEM 腹腔内投与 + AxCAhTNF- α 腫瘍内投与

3. FUT-175、GEM、TNF- α 併用群: FUT-175 腹腔内投与 + GEM 腹腔内投与 + AxCAhTNF- α 腫瘍内投与

経時的腫瘍系の測定

腫瘍径の経時的変化を治療開始から 4 週間行い各群比較して評価を行う。4 週間の治療後に全採血し犠牲死させ、腫瘍を摘出、摘出した腫瘍の重量・体積を測定する。

腫瘍から核内タンパク、全タンパクを抽出し、ELISA により NF- κ B、Western blotting 法により I κ B、p-I κ B、caspase-3、8、PARP、cIAP1、2 を評価する。

腫瘍をホルマリン固定し、免疫染色により、NF- κ B、apoptosis、血管新生の評価を行う。

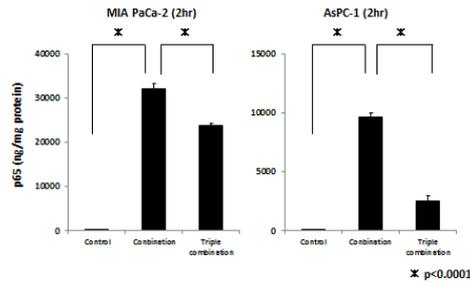
副作用の評価として、体重の経時的変化、血清より電解質異常、肝機能障害などの生化学的評価をする。

4. 研究成果

(1) ヒト膵臓癌細胞株に対する FUT-175 併用による GEM、TNF- α の NF- κ B 活性化抑制 ELISA および、Western blotting にて、ヒト膵臓癌細胞株において、GEM+TNF- α 投与により

NF- B 活性が増強し、かつ FUT-175 の併用投与で活性が抑えられることを示した (図 1)。

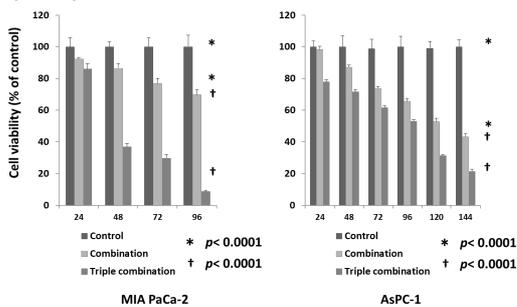
(図 1) FUT-175 による NF- B 抑制効果



MIA PaCa-2, AsPC-1: 膵癌細胞株
 Combination: GEM+TNF-
 Triple combination: combination+FUT-175

(2) ヒト膵臓癌細胞株に対する FUT-175 併用による GEM、TNF- の抗腫瘍効果
 MTT assay および FACS、Western blotting にて、GEM+TNF- 投与が apoptosis タンパクの発現を誘導し、腫瘍増殖抑制効果をもたらすことを示した。
 更には、上記 2 剤に加え FUT-175 を併用投与することで抗腫瘍効果が増強することを示した (図 2)。
 これらの結果は TNF- の膵癌に対する抗腫瘍効果を改めて証明すると共に、TNF- 、FUT-175 併用投与の新たな治療戦略としての可能性を示唆するものであった。

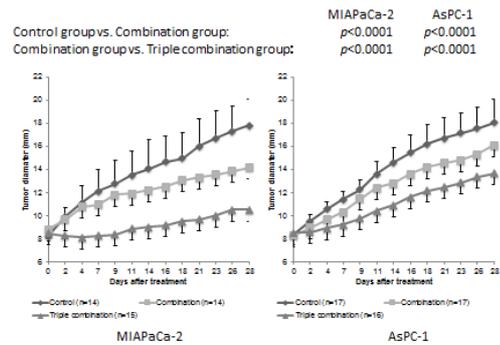
(図 2) FUT-175 併用による細胞増殖抑制効果



(3) 膵臓癌皮下腫瘍モデルマウスによる FUT-175 併用 GEM、TNF- 腫瘍内遺伝子導入の抗腫瘍効果
 膵臓癌皮下腫瘍モデルマウスに於いて、GEM+TNF- 遺伝子導入群 (combination 群) では control 群に比して有意に腫瘍の増大を抑える事ができた。また、FUT-175 を併用投与した Triple combination 群では最も腫瘍の増殖を抑えた (図 3)。また、摘出した腫瘍径および腫瘍体積は Triple combination 群で最も低値を示した。また、治療を受けたモデルマウスはいずれも体重減少などの有害事象を認めず、犠牲死させた時の採血データでも明らかな異常所見は

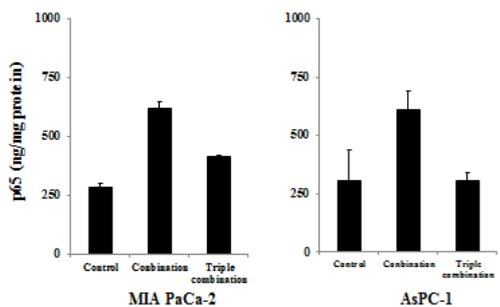
見られなかった。本実験は TNF- の腫瘍内遺伝子導入と FUT-175 を併用投与した初めての動物実験であり、有意に治療効果を確認するため臨床応用するうえでも重要な足掛かりになったといえる。

(図 3) 治療中の腫瘍径の推移



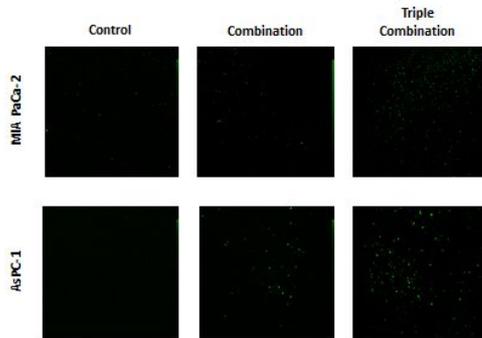
摘出腫瘍の NF- B 活性も、vitro の実験同様 Combination 群にて最も上昇し、FUT-175 併用の Triple combination 群で有意に活性を下げた (図 4)。また、Western blotting では、apoptosis タンパクの発現が control 群に比して combination 群で有意に強く、combination 群に比して Triple combination 群で有意に強かった。In vivo に於いても vitro と同様、FUT-175 の投与によって GEM+TNF- による NF- B の活性化を抑制し、apoptosis タンパクの発現を増強させることが分かった。

(図 4) 摘出腫瘍の NF- B 活性



摘出した腫瘍切片の TUNEL assay でも、Triple combination 群では有意に多数の apoptosis 細胞を認めた (図 5)。

(図5) 腫瘍切片の TUNEL assay



以上の結果から、FUT-175 が NF- κ B 阻害作用により膵臓癌に対する塩酸ゲムシタピン化学療法併用アデノウイルスベクターを用いた TNF- α 腫瘍内導入による遺伝子治療の抗腫瘍効果を増強することを証明した。いくつかの臨床応用可能な NF- κ B 阻害剤に関する報告がなされているが、FUT-175 はすでに臨床の場で頻用されている薬剤であり、しかも我々が FUT-175 を NF- κ B 阻害剤として用いた臨床試験では有害事象を認めておらず、FUT-175 は安全な NF- κ B 阻害剤といえる。本研究の結果から Gemcitabine、TNF- α および FUT-175 を用いた治療法が膵臓癌に対する新規治療戦略となり得ることが示唆された。この治療法は世界的にも新しく、臨床応用にも弊害が少ない治療法と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Fujiwara Y, Shiba H, Iwase R, Haruki K, Furukawa K, Uwagawa T, Misawa T, Ohashi T, Yanaga K.
J Am Coll Surg. 2013;216(2):320-32.
doi:10.1016/j.jamcollsurg.2012.09.016.

〔学会発表〕(計2件)

98 th American college of surgeons annual clinical congress, Chicago, USA, 2012, September. Fujiwara Y, Shiba H, Iwase R, Haruki K, Furukawa K, Uwagawa T, Misawa T, Ohashi T, Yanaga K. Inhibition of NF- κ B enhances the anti-tumor effect of combination treatment with tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene therapy and gemcitabine for pancreatic cancer in mice.

第112回日本外科学会定期学術集会. 千葉. 2012年4月. 藤原佑樹, 矢永勝彦, 岩瀬亮太, 春木孝一郎, 古川賢英, 飯田智憲, 柴浩明, 宇和川匡, 三澤健之, 大橋十也, 大木隆生. 膵臓癌におけるメシル酸ナファモスタット併用 TNF- α 遺伝子導入および塩酸ジェムシタピン療法の抗腫瘍効果の検討.

〔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〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 賢英 (FURUKAWA, Kenei)
東京慈恵会医科大学外科・助教
研究者番号: 80624973

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし