

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05513

研究課題名(和文) おとり遺伝子による多分子同時阻害を標的とした純国産型癌遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) Japan Original Cancer Gene Therapy by Inhibition of Multiple Molecules Using Decoy Strategy

研究代表者

石橋 浩晃 (ISHIBASHI, HIROAKI)

朝日大学・歯学部・准教授

研究者番号：90254630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：今回極めて安全なウイルスベクターであるHemagglutinating virus of Japan (HVJ)を用いたHVJ-リポソーム法により、Decoy 戦略による遺伝子治療法の有効性について検討した。VEGF DNAのプロモーター領域に存在するHIF-1の結合部位を癌細胞核内に大量に導入して血管新生を制御することを可能とした。さらに、口腔顎顔面の広範囲な疾患に本法を応用して、多彩な遺伝子治療法として展開できるように発展的研究を行い、基礎的資料を収集した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍血管新生は腫瘍細胞から産生される多彩な血管新生因子が周囲組織の血管を活性化することで開始される。近年、血管新生を抑制すると腫瘍の増殖を制御できるという知見が集積され、血管新生抑制は新しい癌治療法として注目されている。しかし、既存の血管新生抑制療法は微小分子、血管新生因子に対する抗体やアンチセンス導入などで、いまだ安全性が確立されていない。そこで、本研究は独自に開発した純国産型の遺伝子導入法(HVJ-リポソーム法)を用いて、血管新生を制御している転写因子に対するおとり遺伝子を導入して腫瘍増殖を制御するという本邦独自の新規癌遺伝子治療法の確立を社会に発信できた。

研究成果の概要(英文)：Novel molecular target-based therapies have been increasingly used as salvage treatments for intractable cancers. Some of these therapies have already been established as the standard protocol to treat advanced cancer of several organs. However, no molecular target-based therapy or gene therapy has been established as a reliable treatment option for cancers of the teeth, oral cavity, and maxillofacial region. We have proposed two strategies of novel gene therapy to treat oral and maxillofacial cancers: the decoy strategy, which involves inhibition of the expression of a targeted gene, and the HVJ-liposome method, which involves transfection of a conduct gene. This research summarizes the results of recent cancer treatment using a novel gene therapy, the decoy strategy, with gene transfection using the HVJ-liposome method. The author's data support use of this novel therapy for other diseases of the teeth, oral cavity, and maxillofacial region including dental luxation.

研究分野：口腔病態学

キーワード：口腔腫瘍 転写因子 遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍が増殖を持続するためには血管新生が必須である。この腫瘍血管新生は腫瘍細胞から産生される多彩な血管新生因子が周囲組織の血管を活性化することで開始され、多段階の血管新生過程が展開されて達成される。近年、腫瘍細胞の血管新生因子発現の誘導に癌組織中のサイトカインや癌細胞の微小環境の変化が関与しているという報告が蓄積され、申請者らも腫瘍壊死因子（TNF）や癌細胞の低酸素環境が強く関与していることを報告してきた。これらの報告から腫瘍血管新生の責任分子が解明されており、それらを抑制することで血管新生を制御すると、癌の増殖を抑制できるという知見が集積され、血管新生因子の抑制は新しい癌治療の標的として注目、応用され始めている。しかし現在、臨床応用にむけて開発中の血管新生因子抑制法はアンチセンスの導入、可溶性受容体の強制発現あるいは中和抗体の投与などが主流であり、これらの方法は臨床応用にむけて安全性が確立していないのと同様にいずれも欧米諸国が研究を先導しているのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究では極めて安全な純国産型ウイルスベクターを用いて、癌細胞におとり遺伝子を導入し、複数の血管新生因子群を同時に抑制するという全く新しい概念に基づく、本邦独自の新規癌遺伝子治療法の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 癌の血管新生に関する責任分子の選択

：本研究を展開するに際し、口腔癌における血管新生機序に関わる責任因子、すなわち標的となりうる血管新生因子を明らかにして、本戦略における標的分子として選択しなければならない。そのためには、扁平上皮癌細胞を中心に培養口腔癌細胞に広範に発現している血管新生因子を検索した。また、それらの誘導を制御するサイトカインや増殖因子などの液性因子、あるいは低酸素、低栄養などの微小環境を同定して、標的血管新生因子の発現誘導を確認するとともに、関連転写因子の動態を解析し、おとり遺伝子により標的因子として、その活性を抑制すべき転写因子を解明した。

(2) HVJ-リポソーム法による遺伝子導入法の確立：受精鶏卵を用いた HVJ の大量培養法と HVJ-リポソーム調整法を確立した。また、おとり遺伝子への核移行蛋白の付加により、導入したおとり遺伝子は導入後 3 時間で、癌細胞の核内に移行していることを観察していた。また、本研究課題の最重要目的である動物モデルによるおとり遺伝子導入の抗腫瘍効果の検証のために、培養細胞への遺伝子導入条件を参考に、動物モデルを用いた実験的腫瘍における、至適遺伝子導入法を確立した。

(3) HVJ-リポソーム法を用いたおとり遺伝子導入による、血管新生因子発現の抑制効果の解析：培養口腔癌細胞に HVJ-リポソーム法を用いておとり遺伝子を導入し、サイトカイ

ンや増殖因子による刺激，あるいは低酸素や低栄養で培養し，血管新生因子群の発現に関する抑制効果を検索する．また，本遺伝子治療法の効果を動物モデルによる実験的腫瘍に与える抗腫瘍効果で検証し，臨床応用に際しての基礎的資料を蓄積した．

(4) 副作用の検証と対策の確立：動物モデルに作成した実験的腫瘍を用いて，HVJ-リポソーム法を用いたおとり遺伝子導入の腫瘍増殖に関する抑制効果を検討した後，同様の実験系により，実験動物に与える副作用，有害事象を観察した．

#### 4．研究成果

HVJ-リポソーム法によるおとり遺伝子導入は，極めて多彩な利点を持ち，最も臨床応用に近い遺伝子治療法であることが示唆された．さらにHVJの安定した培養法や大量調整法は申請者および，国内の数機関においてのみ可能である点から，本法はその戦略と遺伝子導入法がまさに我が国独自の癌遺伝子治療と定義することができ，本邦の遺伝子治療における欧米からの立ち遅れを挽回する純国産型遺伝子治療法となることが予想できる．

また，本戦略は癌の血管新生抑制法のみでなく，癌の浸潤や転移，増殖に関わる分子の抑制，あるいは他の疾患の遺伝子治療にも簡便に応用できるので，医学，歯学全般はもちろん，広く生物学，生命科学における多彩な分野の研究での汎用が可能である．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Guo,X., Noguchi,H., Ishii,N., Homma,T.,Hiraki,T., Zhang,J., Matsuo,K., Yokoyama,S.,Ishibashi,H., Fukushige,T., Kanekura,T.,Fujii,J., Uramoto,H., Tanimoto,A.,	4. 巻 30(10)
2. 論文標題 The association of peroxiredoxin 4 with the initiation and progression of hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Antioxid Redox Signal	6. 最初と最後の頁 1271-1284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ars.2017.7426	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugimoto N, Ishibashi H, Nakamura H, Yachie A, Ohno-Shosaku Takako.	4. 巻 38(6)
2. 論文標題 Hypoxia-induced inhibition of the endocannabinoid system in glioblastoma dell.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncology Report	6. 最初と最後の頁 3702-3708
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2017.6048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 H. Ishibashi	4. 巻 12
2. 論文標題 A Novel Gene Therapy to Treat Lesions of the Teeth, Oral Cavity, and Maxillofacial Region.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Association of Dental Trauma.	6. 最初と最後の頁 19-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中山 英二  (NAKAYAMA EIJI)  (60172467)	北海道医療大学・歯学部・教授     (30110)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉本 直俊 (SUGIMOTO NAOTOSHI) (80272954)	金沢大学・医学系・准教授  (13301)	
研究分担者	山田 壮亮 (YAMADA SOUSUKE) (90525453)	金沢医科大学・医学部・教授  (33303)	
研究分担者	鬼丸 満穂 (ONIMARU MITSUHO) (00380626)	九州大学・医学研究院・助教  (17102)	