

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成22年 5月 19日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2009
課題番号：19592342
研究課題名（和文）
血管新生抑制を標的としたおとり遺伝子導入による癌遺伝子治療法の開発
研究課題名（英文）
Newly Strategy by Anti-angiogenic Gene Therapy using Decoy System
研究代表者
葦原 慎一（KURAHARA SHIN-ICHI）
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号：20304818

研究成果の概要（和文）：血管新生抑制を標的としたおとり遺伝子導入による癌遺伝子治療法の開発

研究成果の概要（英文）：Newly Strategy by Anti-angiogenic Gene Therapy using Decoy System

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成21年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

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 α （TNF α ）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時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

(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9件)

- 1) Matsuura M, Onimaru M, Yonemitsu Y, Suzuki H, Nakano T, Ishibashi H, Shirasuna K, Sueishi K :Autocrine loop between vascular endothelial growth factor(VEGF) -C and VEGF Receptor-3 positively regulates tumor-associated lymphangiogenesis in oral squamous cancer cells. Am J Pathology 175(4):1709-21, 2009.
- 2) Kondo S, Ishibashi H, Nariai Y, Kato T, Enomoto Y, Karino M, Yoshino A, Sekine J : Management of tongue squamous cell carcinoma in expectant patients: Report of two Cases. Asian J Oral Maxillofac Surg 21(2) :142-148, 2009.
- 3) 蔵原慎一, 鬼丸満穂, 中村誠司, 石橋浩晃, 白砂兼光 : 1 歳児の下顎骨に生じた小円形細胞腫瘍の 1 例. 日本口腔外科学会雑誌 55(6), 305-309, 2009.
- 4) 角町鎮男, 蔵原慎一, 佐々木匡理, 他 6 名 : 非接触型三次元計測装置を用いた下顎後方移動術による顔面軟組織の三次元的形状変化の解析. 日本口腔科学会雑誌 58(1), 11-18, 2009.
- 5) Karino M, Ishibashi H, Nariai Y, Kondo S, Sekine J : Study on feasibility of cervical lymph node metastases in squamous cell carcinoma of the tongue evaluated by morphometric analyses. PROCEEDINGS 12th International Congress

on Oral Cancer in conjunction with 24th

International College for Maxillo-Facial-Surgery, 89-90, 2008.

- 6) Nariai Y, Nakamura M, Maruyama R, Ishibashi H, Sekine J: Symposium 1: Surgical conference Case 1; A case of huge ameloblastoma manifested in the mandible, Oral Medicine & Pathology, 13(1): Proceeding of the 19th Annual Meeting of the Japanese Society for Oral Pathology: 29, 2008.
- 7) Karino M, Ishibashi H, Fujihara S, Watanabe M, Ichiba Y, Nariai Y, Kondo S, Sekine J : Feasible technique for the prediction of lymph node involvement in squamous cell carcinoma of the tongue by nuclear morphometric analysis. International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery, proceedings of the 19th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, 38(5): 426, 2009.
- 8) Karino M, Ishibashi H, Fujiwara S, Watanabe M, Ichiba Y, Watanabe M, Ichiba Y, Nariai Y, Kondo S, Sekine J : Feasible technique for the prediction of lymph node involvement in squamous cell carcinoma of the tongue by nuclear morphometric analysis. The International College of Surgeons, The 55th Annual Congress of the Japan Section, Proceedings: 36, 2009.
- 8) Nariai Y, Kondo S, Ishibashi H, Tsunematsu K, Asahina I, Sano K, Sekine J : Feasibility of implant supported fixed prostheses in oral tumor patients,

68th Annual Meeting of the Japanese
Cancer Association, Proceedings: 351,
2009

〔学会発表〕（計 1 件）

中川久子, 石橋浩晃, : 口腔癌の低酸素に依
存する血管新生抑制療法の研究
第 52 回日本口腔外科学会総会, 神戸, 2007

〔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：

[http://www.hosp.kyushu-u.ac.jp/shinrvo/
dent/08/index.html](http://www.hosp.kyushu-u.ac.jp/shinrvo/dent/08/index.html)

[http://www.med.shimane-u.ac.jp/oral/ind
ex.html](http://www.med.shimane-u.ac.jp/oral/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蔵原 慎一（九州大学・歯学研究院・助教）
研究者番号：20304818

(2) 研究分担者

石橋 浩晃（島根大学・医学部・准教授）
研究者番号：90254630

(3) 研究分担者

鬼丸 満穂（九州大学・医学研究院・助教）
研究者番号：00380626

(1) 研究分担者

竹之下 康治（九州大学・歯学研究院・准
教授）

研究者番号：50117157