

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7日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791994

研究課題名（和文）

おとり遺伝子を用いた血管新生抑制による新規の遺伝子治療法の開発と応用

研究課題名（英文）

Novel gene therapy by antiangiogenesis using decoy system.

研究代表者

辰巳 香澄（TATSUMI KASUMI）

島根大学・医学部・歯科医員

研究者番号：00536534

研究成果の概要（和文）：強力な血管新生因子である VEGF は $\text{TNF}\alpha$ により転写因子 Sp1 を介して発現が誘導される。この Sp1 を標的とした、おとり遺伝子導入により、培養癌細胞および実験的腫瘍において血管新生の抑制のみならず、腫瘍の増殖や浸潤も抑制されることが証明された。また、遺伝子導入による強い副作用もなく、安全な新規の遺伝子治療として応用できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Expression of VEGF which is a strong vascularization factor, is derived through transcription factor Sp1 by $\text{TNF}\alpha$. In cultured cancer cells and experimental tumor, not only angiogenesis but also proliferation and invasion of the tumor were inhibited by the decoy system that assumed Sp1 a target. It leads to the suggestion that the decoy system is applicable to safe and novel gene therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
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：口腔癌・血管新生・遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

腫瘍が増殖を維持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顕官新生因子が周囲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 ($\text{TNF}\alpha$) や癌細胞の対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、臨床応用に向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、可溶型受容体の強制発現あるいは中和抗体の投与が主流であり、これらの方法は臨床応用に向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する。

3. 研究の方法

- (1) おとり遺伝子の調整
- (2) おとり遺伝子導入法の確立
- (3) おとり遺伝子導入の効果の検討
- (4) 動物モデルによる実験的腫瘍の形成
- (5) おとり遺伝子導入条件の確立
- (6) 遺伝子導入による副作用の観察
- (7) 血管新生因子産生におけるおとり遺伝子導入効果の *in vivo* 解析
- (8) おとり遺伝子戦略とアンチセンス導入による抗腫瘍効果の比較検討
- (9) 実験的腫瘍において活性化している転写因子の検索と、おとり遺伝子導入による標的転写因子の抑制効果の検討
- (10) 実験的腫瘍におけるおとり遺伝子療法の標的転写因子の選択

4. 研究成果

- (1) Sp1 が認識する塩基配列と、上下流にダミー配列を含む合成二本鎖オリゴヌクレ

オチドを調整し、おとり遺伝子とした。

(2) おとり遺伝子導入には HVJ-リボソーム法を用いた。おとり遺伝子を含む HVJ-リボソームの調整法を確立するために、培養癌細胞への様々な導入条件を検討し、90%以上の効率を示す条件を決定した。

(3) おとり遺伝子を培養癌細胞に導入すると、VEGF の mRNA およびタンパク質発現を 40%-50% まで抑制した。また、TGF- α や組織因子などの血管新生に関与する因子も同時に抑制された。

(4) ノードマウスの背部皮下に培養口腔扁平上皮癌細胞を注射し、再現性を持つ実験的腫瘍の形成条件を確立した。

(5) ノードマウスに形成した実験的腫瘍に、HVJ-リボソームを用いてルシフェラーゼ発現プラスミドを導入した。腫瘍組織を摘出し、ルシフェラーゼ活性を測定し、遺伝子導入の間隔、部位および量について検索し、至適導入条件を確立した。

(6) HVJ-リボソームによる遺伝子導入法に用いる HVJ は、現在までヒトに対する病原性は全く報告されていない。実験的腫瘍に対して HVJ-リボソームにより遺伝子導入したノードマウスを用いて、肉眼的所見、解剖学的および組織学的所見により、強い副作用を認めなかった。

(7) 基底膜構成成分である Matrigel にて培養癌細胞浮遊液を調整し、ノードマウスに注射した。体温によりゲル化した Matrigel 内に侵入してきた血管を新生血管数として定量化した。

(8) VEGF の開始コドンを含むアンチセンスを導入した腫瘍と、おとり遺伝子を導入した腫瘍における増殖能を検討した。腫瘍の大きさ、体積、重量の評価では抗腫瘍効果を認めた。おとり遺伝子を導入した実験的腫瘍を摘出し、HE 染色および CD34 などの免疫染色を行った。血管密度を測定し、VEGF の抑制による血管新生の抑制効果を認めた。

(9) サイトカイン刺激や低酸素環境下において、Sp1, AP1, HIF-1 が活性化することをバンドシフトアッセイにより確認した。また、Sp1 を標的としたおとり遺伝子を HVJ-リポソーム法により導入したところ、TNF- α で促進される VEGF, TGF β , TF の発現亢進を同時に抑制することを認めた。

(10) 動物モデルにおける実験的腫瘍においても Sp1 を標的としたおとり遺伝子導入により、腫瘍の増殖が抑制されることを確認した。

以上より、Sp1 を標的とした、おとり遺伝子治療は、血管新生の抑制のみならず、腫瘍の増殖や浸潤も抑制する新規の遺伝子治療として応用できることが示唆された。

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 4 件)

- ① 渡邊正章, 石橋浩晃, 狩野正明, 服部政義, 菊地萌, 東泰輔, 山崎聡子, 野上恭太郎, 矢野初実, 吉野慶太, 辰巳香澄, 辰巳博人, 吉村仁志, 成相義樹, 近藤誠二, 柳井智恵, 関根浄治, 初診時 NOMO でリンパ節好発転移をきたした口腔扁平上皮癌症

例の臨床病理学的検討, 島根歯科, 査読無, 643 巻, 2010, 30-32

- ② 恒松晃司, 吉川浩郎, 江川正義, 辰巳博人,

辰巳香澄, 成相義樹, 近藤誠二, 石橋浩晃, 関根浄治, 島根大学医学部附属病院における口腔ケアの現況, 島根歯科, 査読無, 2010, 643 巻, 16-18

- ③ 三浦典子, 成相義樹, 利弘陽子, 西尾健, 高村雄太郎, 辰巳博人, 辰巳香澄, 加藤誉之, 吉村仁志, 近藤誠二, 石橋浩晃, 関根浄治, 当院における休日・時間外の救急歯科診療の臨床的検討, 査読無, 2010, 643 巻, 5-7

- ④ 加藤誉之, 成相義樹, 三浦典子, 利弘陽子, 矢野初実, 野上恭太郎, 吉野綾, 辰巳博人, 辰巳香澄, 藤原崇平, 近藤誠二, 石橋浩晃, 関根浄治, 島根大学医学部附属病院歯科口腔外科における外来患者調査, 島根歯科, 査読無, 2010, 643 巻, 3-5

〔学会発表〕(計 7 件)

- ① 上野蘭美, 江川正義, 金田義彦, 吉野綾, 辰巳香澄, 吉川浩郎, 石橋浩晃, 関根浄治, 医学部附属病院におけるオーラルメディシンの役割, 島根歯科医学会, 2011 年 12 月 17 日, 島根県歯科医師会館 (松江市)
- ② 大内謙太郎, 市山友子, 河村和之, 利弘陽子, 上野蘭美, 江川正義, 辰巳香澄, 恒松晃司, 成相義樹, 石橋浩晃, 関根浄治, 医学部附属病院歯科口腔外科にて常勤歯科麻酔科医による全身管理を行った一症例,

第 56 回日本口腔外科学会総会・学術大会,
2011 年 10 月 21 日, 大阪国際会議場 (大阪
市)

- ③ Masaaki Watanabe, Hiroaki Ishibashi,
Masayoshi Egawa, Hiroto Tatsumi, Kasumi
Tatsumi, Aya Yoshino, Koji Tsunematsu,
Katsumi Hideshima, Joji Sekine, Oral
cancer detection by mass screening using
smear cytology in Shimane prefecture,
The 5th meeting of Asian Society of Oral
and Maxillofacial Pathology, 2011 年 8
月 23 日, 九州大学 (福岡市)

- ④ 渡邊正章, 石橋浩晃, 狩野正明, 服部政義,
菊地萌, 東泰輔, 山崎聡子, 野上恭太郎,
矢野初実, 吉野慶太, 辰巳香澄, 辰巳博人,
吉村仁志, 成相義樹, 近藤誠二, 柳井智恵,
関根浄治, 初診時 NOMO でリンパ節好発転
移をきたした口腔扁平上皮癌症例の臨床
病理学的検討, 島根歯科医学会,
2010 年 2 月 14 日, ホテル白鳥 (松江市)

- ⑤ 恒松晃司, 吉川浩郎, 江川正義, 辰巳博
人,
辰巳香澄, 成相義樹, 近藤誠二, 石橋浩晃,
関根浄治, 島根大学医学部附属病院におけ
る口腔ケアの現況, 島根歯科医学会, 2010
年 2 月 14 日, ホテル白鳥 (松江市)

- ⑥ 三浦典子, 成相義樹, 利弘陽子, 西尾健,
高村雄太郎, 辰巳博人, 辰巳香澄, 加藤誉
之, 吉村仁志, 近藤誠二, 石橋浩晃, 関根
浄治, 当院における休日・時間外の救急歯
科診療の臨床的検討, 島根歯科医学会,
2010 年 2 月 14 日, ホテル白鳥 (松江市)

- ⑦ 加藤誉之, 成相義樹, 三浦典子, 利弘陽子,

矢野初実, 野上恭太郎, 吉野綾, 辰巳博人,
辰巳香澄, 藤原崇平, 近藤誠二, 石橋浩晃,
関根浄治, 島根大学医学部附属病院歯科口
腔外科における外来患者調査, 島根歯科医
学会, 2010 年 2 月 14 日, ホテル白鳥 (松
江市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辰巳 香澄 (TATSUMI KASUMI)
島根大学・医学部・歯科医員
研究者番号 : 00536534

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :