

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390420

研究課題名(和文) おとり遺伝子による癌の血管新生抑制を標的とした純国産型遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) Simple Domestic Gene Therapy against Anti-cancer Angiogenesis with Decoy Oligonucleotides.

研究代表者

石橋 浩晃 (ISHIBASHI, Hiroaki)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90254630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍が増殖を継続するためには周囲組織からの血管の導入が必須である。腫瘍細胞が産生する多彩な血管新生因子のなかで、血管内皮増殖因子(VEGF)はもっとも重要であり、低酸素環境により転写因子HIF-1の活性を介して発現が誘導される。我々はHIF-1認識する塩基配列を含んだ合成2本鎖DNA(HIF-1 decoy ODNs)を、HVJ-リポソーム法を用いてSAS細胞に導入したところ、低酸素培養により亢進するVEGF発現はHIF-1 decoy ODNs導入により抑制された。従ってHIF-1 decoy ODNs導入はVEGF発現抑制による血管新生の制御に有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Among angiogenic factors produced by tumor cells, vascular endothelial growth factor (VEGF) seems to be the most potent and pathophysiologically important, and its synthesis has been shown to be modulated through the activation of some transcription factors including HIF-1 function under hypoxic condition. We transferred HIF-1 decoy ODNs, composed of synthetic double-stranded DNA including consensus sequence of binding site of the HIF-1, into cultured cancer cells (SAS cells) by the HVJ-liposome method. The overexpression of VEGF by cancer cells stimulated by hypoxia could be apparently suppressed by the transfection of HIF-1 decoy ODNs, but not by mt-HIF-1 decoy ODNs. These results suggested that the HIF-1 decoy strategy would be effective for regulating tumor growth by reducing angiogenic activity of cancer cells through HIF-1-mediated gene transactivations.

研究分野：実験腫瘍学

キーワード：悪性新生物 遺伝子治療 血管新生

## 1 研究開始当初の背景

血管新生とは、既存の血管から新しい毛細血管網が形成される組織反応であり、様々な病態の発生や進展に関与している。特に固形腫瘍が増殖を持続するためには血管新生が必須であり、近年、血管新生を抑制すると腫瘍増殖を制御できるという知見が集積され、血管新生の抑制は新しい癌の治療法として注目されている。

血管新生は血管新生因子と抑制因子の精密なバランスにより制御されている。腫瘍組織においては、腫瘍細胞から産生・放出される様々な血管新生因子により血管新生が亢進される結果となり、腫瘍血管新生が達成されると考えられている。そこで血管新生抑制の戦略として、腫瘍細胞が産生する血管新生因子の制御が注目されている。

腫瘍細胞が産生する血管新生因子のなかで、血管内皮増殖因子 (VEGF) はその作用が強力であることや、その受容体が血管内皮細胞や血小板など一部の細胞に限局して発現していることなどより、安全かつ確実な血管新生抑制療法の標的として注目されている。しかし、現在までの VEGF 抑制法は、中和抗体や可溶性受容体の投与、あるいは dominant negative 受容体の強制発現やアンチセンス導入を用いた方法などが報告されているものの、臨床応用における安全性は十分に確立されていないのが現状である。

## 2 研究の目的

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-リボソーム法により、Decoy 戦略による遺伝子治療の有効性について検討したので報告する。癌細胞が増殖して、癌細胞の中心部に位置する癌細胞が低酸素環境になると、癌細胞の VEGF の産生、放出が促進され、これが癌の血管新生を開始するス

イッチとなることが知られている。この低酸素による VEGF の発現亢進には、低酸素環境により安定化する転写因子 HIF-1 が重要とされている。そこで、VEGF DNA のプロモーター領域に存在する HIF-1 の結合部位、すなわち hypoxia responsive element (HRE) を含む合成二本鎖 DNA (HIF-1 decoy ODNs) を癌細胞核内に大量に導入することができれば、活性化して核内移行してきた HIF-1 が decoy ODNs と結合してしまい、その結果 VEGF DNA の転写が開始されず、血管新生を制御することが可能になる。我々は現在までにこの Decoy システムを用いて転写因子 Sp1 や AP-1 の活性化を抑制すると、癌の血管新生や浸潤・転移を制御できることを報告してきた。そこで今回、HIF-1 を新しい標的転写因子とし、癌の治療における HIF-1 Decoy 戦略による血管新生抑制の有効性について検討した。

## 3 研究の方法

### (1) 培養口腔扁平上皮癌細胞

培養口腔扁平上皮癌細胞株として SAS を用い、10%ウシ胎仔血清 (FBS)、ペニシリン (100 単位/ml)、ストレプトマイシン (100 µg/ml) を含有した RPMI 1640 (日水製薬、東京) にて、5%炭酸ガス存在下、37 °C にて培養した。細胞培養は O2/CO2 Multi-Gas incubator BL3200, (Astec Co., 福岡) にて通常酸素濃度 (20%O<sub>2</sub>) および低酸素濃度 (3%O<sub>2</sub>) により行った。

### (2) HIF-1 Decoy ODNs の設計

VEGF DNA のプロモーター領域の転写因子 HIF-1 が認識する塩基配列 (HRE) (下線) を含む合成オリゴヌクレオチド (ODNs) (5'-ATTACCTACGTGGGATTACCTAC-3') と、その相補鎖 (5'-GTAGGTAATCCCACGTAGGTA) を 95 °C、5 分間反応させて二本鎖 ODNs に調製し HIF-1 decoy ODNs とした。また HIF-1 認識部位のう

ち 2 塩基を変換させた ODNs (5-ATTACCTACcaGGGATTACCTAC-3) と、その相補鎖 (5-GTAGGTAATCCctgGTAGGTAAT-3) を同様に二本鎖 ODNs に結合させ、mt-HIF-1 decoy ODNs とした。Decoy ODNs を SAS 細胞の核内に移行させるために、HMG (High Mobility Group) -1,2 Mixture (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Osaka) と 20 , 30 分反応させ Decoy ODNs ,あるいは mt-HIF-1 decoy ODNs と HMG-1,2 を結合させた。また HIF-1 decoy ODNs および mt-HIF-1 decoy ODNs が他の転写因子の認識部位を含まないことを、Databases on Transcriptional Regulation にて確認した。

#### (3) HVJ-リポソームによる遺伝子導入法

本研究において HIF-1 decoy ODNs および mt-HIF-1 decoy ODNs の導入はすべて HVJ-リポソーム法にて行った。すなわち、ホスファチジルセリン (Na 塩)、ホスファチジルコリンおよびコレステロール (いずれも Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) を 3.9 ml のテトラヒドロフラン中で重量比 1:4.8:2 にて混合し、ロータリーエバポレーターにて回転させたガラスフラスコの内腔側壁に沈着させた。500ng の decoy ODNs を 300  $\mu$ l の BSS [140 nmol/liter NaCl, 5.4 nmol/liter KCl, 10 nmol/liter Tris-HCl (pH 7.6)] に溶解し、振盪させたガラスフラスコに填入し、各 ODNs を含有したリポソームを調製した。HVJ を 120 秒間 UV 照射 (11 J/m<sup>2</sup>/s) し、ゲノム RNA を断片化させ、30,000 HAU の HVJ 溶液をリポソーム溶液と混和し、4 , 10 分間反応させ、HVJ-リポソームを調製した。リポソームと融合しなかった HVJ はシヨ糖濃度勾配遠心分離法にて排除した。

HIF-1 decoy ODNs または mt-HIF-1 decoy ODNs を含有する HVJ-リポソーム (15,000 HAU/ml) を培養液中に 4ml 添加し、4 で 10 分間反応させて SAS の細胞膜と融合させ、

decoy ODNs を細胞内へ導入した。また、ODNs を封入していない HVJ-リポソーム (empty particles) を調整し、同様の温度処理により細胞膜と癒合させた SAS 細胞を対照として同様の検索を行った。

#### (4) 導入効率の検討

FITC 標識した HIF-1 Decoy ODNs あるいは mt-HIF-1 Decoy ODNs を HVJ-リポソーム法により SAS 細胞に導入した。導入 3 時間後にトリプシン-EDTA にて細胞を剥離し、FACScan II (Becton Dickinson, Mountain View, CA) にて FITC 励起を示す細胞を観察し、導入効率として観察した。

また、同様に FITC 標識した HIF-1 Decoy ODNs あるいは mt-HIF-1 Decoy ODNs を導入した SAS 細胞を、導入後 3 時間および 6 時間後に蛍光顕微鏡にて観察し、decoy ODNs の細胞内局在を検討した。

#### (5) 低酸素培養による HIF-1 活性の検討 (Gel shift assay)

SAS 細胞を FBS 非含有 RPMI 1640 で 12 時間培養後、培養ディッシュを O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> Multi-Gas incubator BL3200 にて、20%酸素濃度および 3%酸素濃度環境下に 0, 1, 3, 6, 12 時間培養し核蛋白を抽出した。HIF-1 decoy ODNs あるいは mt-HIF-1 decoy ODNs をプローブとして、[<sup>-32</sup>P] dATP と T4 polynucleotide kinase および binding buffer (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., Rockville, MD) と 37 , 30 分反応させ、末端標識した .10  $\mu$ g の核蛋白とプローブを反応させ、5%ポリアクリルアミドゲルに展開し、BAS2000 Bioimage analyzer (Fuji Photo Film Co., Tokyo) にて解析した。

#### (6) Northern Blot

VEGF16 の cDNA プローブを DNA Labeling Kit (Amersham, Pharmacia Biotech, UK Ltd, )

UV)を用いて,[<sup>-32P</sup>] dCTPにて標識した。

80%コンフルエントに達した SAS 細胞を、FBS 非添加 RPMI で 12 時間培養した後、20%あるいは3%酸素濃度環境下に0, 6, 12, 24時間培養した。培養終了後 SAS 細胞から AGCP (acid guanidinium thiocyanate - phenol - chloroform) 法にて抽出した total RNA を用いて Northern blot を行った。また、HIF-1 Decoy ODNs あるいは mt-HIF-1 Decoy ODNs を HVJ-リボソーム法にて SAS 細胞に導入し、通常酸素環境下 (20% O<sub>2</sub>) あるいは低酸素環境下 (3% O<sub>2</sub>) にて 12 時間培養した。SAS 細胞から抽出した 20 μg の total RNA を 1.2%アガロース/3%ホルムアルデヒドゲルに展開し、N-ナイロンメンブレンに転写した。その後、cDNA プローブとハイブリダイズし BAS 2000 にて VEGF の mRNA の産生量を定量化し、比較検討した。

#### (7) ELISA

Decoy ODNs 導入あるいは非導入 SAS 細胞を 24 時間培養し、通常あるいは低酸素環境にて 24 時間培養し、培養上清中の VEGF の濃度を human Quantikine Kit (R&D systems) にて測定した。解析はマイクロプレートリーダー (Immuno-mini, NJ-2300; Inter Med, , 東京) にて行った。

## 4. 研究成果

### (1) VEGF 発現における低酸素環境の影響

SAS 細胞を通常酸素環境 (20% O<sub>2</sub>) あるいは低酸素環境 (3% O<sub>2</sub>) で 0, 6, 12, 24 時間培養し、VEGF mRNA 発現を Northern blot にて解析した。通常酸素環境下では VEGF mRNA の産生量に変化はなかったが、低酸素環境による培養では 6 時間培養で VEGF mRNA の産生亢進がみられ、その後時間依存的に VEGF mRNA の産生量は増大し、12 時間培養でプラトーに達した。SAS 細胞は低酸素環境下で 24 時間培養

しても、細胞剥離や細胞死などの形態的变化を認めなかったが、VEGF mRNA 発現量は 12 時間でほぼプラトーになったので、以後は実験を 12 時間培養にて行った。

### (2) 低酸素培養による HIF-1 活性の検討

SAS 細胞を低酸素環境により 0, 3, 6, 12 時間培養した核分画を抽出した。その後、HIF-1 decoy ODNs をプローブとして Gel shift assay を行った。培養開始時には HIF-1 と ODNs の複合体のシグナルは認めなかったが、3 時間後には HIF-1 の核内移行が増大しており、この HIF-1 活性は検討した 12 時間まで継続した。同様に mt-HIF-1 decoy ODNs をプローブとして検索すると、ODNs と HIF-1 の複合体のシグナルは観察されなかった。

### (3) HVJ-リボソーム法による導入効率の検討

HVJ-リボソーム法を用いた遺伝子導入効率を検討するために、FITC 標識した HIF-1 Decoy ODNs を SAS 細胞に導入した。導入後 3 時間の SAS 細胞をフローサイトメトリーを用いて検討すると、FITC 励起を示すピークが右方に変位しており、100%の細胞に導入されていることが示唆された。mt-HIF-1 decoy ODNs を導入した SAS 細胞を用いて同じ検討をすると、同様に 100%の細胞に導入されていた。

また、導入後 3 時間および 6 時間後の SAS 細胞を蛍光顕微鏡にて観察すると、導入後 3 時間の SAS 細胞では decoy ODNs は SAS 細胞の細胞質に局在していたが、6 時間経過すると、Decoy ODNs は SAS 細胞の核内に移行していた。また観察した細胞の全ての細胞に decoy ODNs が導入されていることが観察された。

いずれの decoy ODNs あるいは empty particles による処理によっても、SAS 細胞に細胞剥離や膨化、細胞死などの細胞障害は観察されなかった。

(4) VEGF 発現に与える HIF-1 decoy ODNs 導入の効果

低酸素環境による培養で亢進する SAS 細胞の VEGF mRNA 発現は, mt-HIF-1 Decoy ODNs の導入あるいは ODNs を含有しない empty particles との融合により影響を受けなかったが, HIF-1 decoy ODNs の導入により, 非導入細胞に比較して 21%にまで抑制された.

さらに低酸素環境下に 24 時間培養した SAS 細胞の培養上清中の VEGF 量は HIF-1 decoy ODNs の導入により 32%まで低下していたが, mt-HIF-1 decoy ODNs 導入細胞あるいは empty particles 処理後の SAS 細胞において低下していなかった.

#### 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)

Nakagawa H, Ishibashi H, Onimaru M, Matsuura R, Sueishi K. Transfection with hypoxia-inducible factor-1 decoy oligonucleotides suppresses the hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor in human adenoid cystic carcinoma cells. Int J Vascular Med. 74:72-73,2015. 査読あり.

Ishibashi H, Onimaru M, Kawamura R, Shirasuna K. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) in oral cancer cells by transfection of HIF-1 decoy using HVJ-liposome method. J stomatol Sci 54(1)22-28,2014. 査読あり.

Ishibashi H, Nariai Y, Kanno T, Onimaru M, Sekine J. Effects of transforming growth factor  $\beta$  on the plasminogen activation system, collagen synthesis, and proliferation of rabbit mandibular condylar chondrocytes,

Int J Oral Maxillofac Surg.43:321-339,2014. 査読あり.

Ishibashi H, Onimaru M, Kawamura R, Shirasuna K. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) in oral cancer cells by transfection of HIF-1 decoy using HVJ-liposome method. Stomatol Sci 54(1)22-28,2014. 査読あり.

[学会発表](計1件)

石橋浩晃, 嚢胞性エナメル上皮腫へのデコイシステムの応用. 第27回日本小児口腔外科学会. 2015.11.7. 宮崎シーガイア(宮崎県宮崎市)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

石橋 浩晃 (ISHIBASHI, Hiroaki)  
金沢医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 902546309

(2)研究分担者

鬼丸 満穂 (ONIMARU, Mitsuho)  
九州大学・医学研究院・助教  
研究者番号: 00380626

中山 英二 (NAKAYAMA, Eiji)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号: 60172467

杉本 直俊 (SUGIMOTO, Naotoshi)  
金沢大学・医学系・准教授  
研究者番号: 80272954