

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11273

研究課題名(和文) Del1による遺伝子治療の作用機序の解明

研究課題名(英文) Clarification of mechanism of gene therapy with a Del1

研究代表者

北野 尚孝 (KITANO, Hisataka)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：50424726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：平成27年度の研究において、ヌードマウス移植腫瘍のE3C1による腫瘍縮小は腫瘍血管の変化によるものであることが明らかとなった。平成28年度の研究では、血管周囲に存在するペリサイトやTip cellに影響を及ぼしていることが明らかとなった。平成29年度の研究では、腫瘍血管のペリサイトが破綻し血管腔として機能しなくなることが明らかとなった。これらのことよりマウス移植腫瘍に対するE3C1遺伝子による遺伝子治療を行うと腫瘍血管のペリサイトが破綻し、血管内皮細胞が血管腔を維持できなくなり血管内部より浸出液が漏出することが考えられた。

研究成果の概要(英文)：It was revealed that the cytoreduction of mouse explanted tumors were affected by cancer gene therapy with E3C1. Additionally, its effect of cytoreduction was histological change of tumor vessel in 2015. It was revealed that the gene therapy with E3C1 effected on pericyte and Tip cell of perivascular cells in 2016. It was revealed that tumor vessel fail to function. Because, the pericyte of tumor perivascular cells were effected by the gene therapy with E3C1 2017.

As above, the gene therapy with E3C1 effected the pericyte of tumor perivascular cells. Accordingly, vascular endothelial cells can not maintain for vascular lumen. Therefore, it was suggested that the effusion emigrated of intravascular.

研究分野：がん遺伝子治療

キーワード：癌 遺伝子治療 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

世界中で行われている癌遺伝子治療に最も用いられるベクターは、遺伝子導入効率の良いウイルスベクターである。しかし、安全性と経済性に問題点があるということは現在も同様であり、優れた非ウイルスベクターの使用が見直されている。非ウイルスベクターの実用化のため、欠点である低い遺伝子導入効率と治療効果の改善が強く望まれている。

非ウイルスベクターの場合、遺伝子導入は細胞のエンドサイトーシスにより行われる。導入された遺伝子からのタンパクは、細胞内で働いて細胞死を起こす場合と、細胞外に分泌されて働く場合がある。細胞内で働くタンパクの場合は遺伝子を取り込んだ細胞が死に至るが、細胞外から働くタンパクでは周囲の細胞も巻き添えにできる可能性がある。

細胞外から働くタンパクは、他の薬物と同様に、高濃度で長時間働くことにより効果が上がると推察される。また、ウイルスベクターに比べて安全・安価な非ウイルスベクターは、複数回の使用により効果を上げられる可能性がある。このようなアイデアを実用化する方法として、我々はDel1の利用を考案した。Del1はN末端側の3つのEGFモチーフ(E1, E2, E3)とC末端側の二つのディスコイジンドメイン(C1, C2)から構成される細胞外基質タンパクである。In vitroの実験では、三番目のEGFモチーフ(E3)はエンドサイトーシス亢進作用(Kitano, et al. Mol Biotechnol., 2008, 39: 179-185)とアポトーシス誘導作用を示した(Kitano, et al. BBRC., 2010, 393:757-761)。また、一番目のディスコイジンドメイン(C1)には細胞外基質沈着作用を有し、高濃度に組織に蓄積する性質がある(Hidai et al., Cell Tissue Res, 2007, 330, 83-95)。この二つのドメイン(以下E3C1)の遺伝子を遺伝子治療に用いれば、細胞外に分泌されたE3C1タンパクは細胞外基質に沈着して高濃度かつ長時間組織に存在し、アポトーシスを誘導能する可能性がある。さらに、二回目以降の遺伝子導入率の向上も期待できる。

平成20年度より科学研究費補助金の交付を受けて行ったin vitroでの実験において、E3C1タンパクの使用は良好な結果をもたらした。E3C1タンパクは細胞外基質に濃縮され、高いアポトーシス誘導能を示し、二回目の遺伝子導入効率を改善した(Kitano, et al. Targets in Gene Therapy, 2011, pp147-158)。次に22年度よりin vivoの実験系においてマウスにSCCKN細胞(口腔内扁平上皮癌由来細胞株)の移植腫瘍を作り、mock、E3C1間で治療効果を比較した。遺伝子導入には市販の非ウイルスベクター(in vivo-jetPEI、Polyplus transfection社)を使用し、一週間毎に腫瘍への局所注射を繰り返した。そして腫瘍サイズやマウスの生命予後に及ぼす効果を検討した結果、E3C1治療は腫瘍縮小効果を示し、生存日数はコントロール群が43

から57日で死亡したのに対して、E3C1治療群では67から197日と延長した。

平成24年度の研究までは、口腔扁平上皮癌細胞(SCCKN)でヌードマウスに移植腫瘍を作成して研究を行い、良好な結果を得てきた。実際には、E3C1による遺伝子治療でも最終的には大きな腫瘍を形成した。DNA溶液は腫瘍あたり上限100 $\mu$ lであり、腫瘍のサイズに比して少ない印象であったが、腫瘍増大の速度は変わらなかった。この結果から、E3C1による治療は注射部位よりも広い範囲に効いているのではないかと推察した。

平成25年度はまず、マウスの両側の背部に独立した2個のSCCKN移植腫瘍を作成した。pE3C1およびコントロールを移植腫瘍の一方に注射を7日に1回の割合で行った。その後、経時的に両側の腫瘍の大きさを測定した。コントロール群は治療開始後も腫瘍サイズが増大し18日目より死亡し始め、36日目に生存率は0%となった。一方、pE3C1群は、治療開始後120日目から死亡し、163日目には生存率は0%となった。さらに、pE3C1群は両方の腫瘍の増大速度が抑制されていた。この結果より、直接pE3C1を腫瘍に注射しなくてもpE3C1による遺伝子治療が可能ではないかと考えられた。

この結果を得て、7日に1回の割合でヌードマウス移植腫瘍にpE3C1による遺伝子治療を皮下注射で行うことを考えた。さらに、他の扁平上皮癌細胞株(A431)においても良好な研究結果が得られるかを検討した。治療開始後は、経時的に腫瘍の大きさを測定した。コントロール群は治療開始後も腫瘍サイズが増大し29日目より死亡し始め、46日目に生存率は0%となった。一方、pE3C1群は、53日目まで全頭生存し、100日目でも6匹中1匹が生存し、その個体の腫瘍は消失していた。また、pE3C1群で死亡したマウスの腫瘍の増大速度は抑制されていた。この結果より、ヌードマウスの移植腫瘍に対しpE3C1の皮下注射により腫瘍を根治できる可能性が考えられた。また、根治できなくとも腫瘍の増大速度を抑制し延命効果があることが確認された。

また、pE3C1群の腫瘍は腫瘍組織で出血性壊死を起こしていることが確認された。その作用機序として腫瘍血管の異常が考えられた。平成26年度はその仮説のもとに、ヌードマウス移植腫瘍にmockまたはE3C1で遺伝子治療を行った後にインディアンインクを静脈内投与し腫瘍血管を描出し腫瘍血管に及ぼす影響について検討してみた。その結果、pE3C1群は腫瘍血管の分岐形態に変化を認めた。また、腫瘍表面の毛細血管の減少が認められ、血管新制や形態異常による影響ではないかと考えられた。

E3C1群の腫瘍は腫瘍組織で出血性壊死を起こしていたので、その作用機序として腫瘍血管の異常を考えた。Del1の過剰発現マウスでは新生血管の再構築が亢進することが報

告されている。通常血管新生は毛細血管が新生された後に集約され変化していく。そこにE3C1を加えると血管の再構築が過剰に進み、さらに毛細血管が集約され、毛細血管が減少するのではないかという仮説が考えられた。実際に予備実験を行い、ヌードマウス移植腫瘍に mock または E3C1 で遺伝子治療を行った後にインディアンインクを静脈内投与し腫瘍血管を描出すると、腫瘍血管の分岐形態に変化を認めた。このことより、E3C1 は細い血管を減少させることにより腫瘍の増殖を抑制しているのではないかと考えられた。本研究は悪性腫瘍の治療のみならず、血管腫や網膜症やモヤモヤ病など毛細血管の異常増殖が問題となる疾患の治療にも関連するのではないかと考えられる。また、VEGF を用いた動脈硬化性の血管閉塞疾患への治療では、毛細血管から成熟した血管への再構築が求められており、本研究の成果は広い分野で生きると期待される。

## 2. 研究の目的

既に我々のこれまでの研究において、週 1 回の腫瘍に対する局所注射法により行われた E3C1 および遺伝子療法の効果は明らかになっており、副作用の発現も確認されていない。そのことにより、本研究の目的は以下の 3 点である。

- (1) E3C1 による遺伝子治療が、腫瘍血管の再構築を進めることを確認し、その容量依存関係を明らかにする。
- (2) E3C1 による遺伝子治療が血管内皮細胞や壁細胞にどのような形態的、機能的変化をもたらすか明らかにする。
- (3) *in vitro* の実験系で血管新生および血管抑制のモデルを作成し、E3C1 の作用に関わる情報伝達系を解明する。

## 3. 研究の方法

本研究では、Del1由来のE3C1が、血管新生および血管抑制に対する影響を検討するために *in vivo* の実験を行う。まず、市販の遺伝子導入試薬を用いて、コントロール遺伝子とE3C1遺伝子をヌードマウス移植腫瘍に導入し、ヌードマウス移植腫瘍におけるE3C1の腫瘍血管に対する影響について分析する。次に、*in vitro* の実験系にてE3C1が細胞外基質タンパク中で培養した血管内皮細胞(HUVEC)に与える影響について検討し、*in vitro* での血管新生モデルを作成する。

### (1)平成27年度

平成24年度より行った *in vivo* におけるマウス移植腫瘍に対するE3C1遺伝子を用いた研究で、1週に1回、腫瘍の大きさに因らず  $10 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  の濃度の遺伝子溶液を用いて遺伝子治療することにより腫瘍縮小効果や延命効果を得た。その結果を踏まえ本研究では、E3C1遺伝子における遺伝子治療が腫瘍血管に及ぼす影響について分析する。(巨

視的観察)

- A431細胞(扁平上皮癌由来細胞株)の細胞浮遊液( $10 \times 10^7$ 個/ $100 \mu\text{l}$ )をヌードマウスの背部皮下に注射しマウスに移植腫瘍を作成する。
- 腫瘍サイズが $50 \text{mm}^3$ に達した移植腫瘍に対してpE3C1を用いて週に1回、腫瘍に直接注射することによる遺伝子治療を行う。その際、遺伝子治療に使用する遺伝子溶液の濃度 $10 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ とする。コントロールとしてmockベクターを同様に導入する。ヌードマウス移植腫瘍に対する遺伝子治療は一週間に一度、3週間に渡って行う。
- 3回目の遺伝子治療が終了した翌週に、マウスの尾静脈よりインディアンインクを静脈内投与し血管造影を行う。
- その後、頸椎脱臼法にて安楽死したマウスより腫瘍を一塊に摘出後し、腫瘍を透明化し標本とする。
- その後、巨視的にE3C1で遺伝子治療を行った群およびmockベクターで遺伝子治療を行った群の腫瘍血管の分岐形態を比較し検討する。

### (2)平成28年度以降

- 平成27年度に行った研究と同様に引き続き、マウス移植腫瘍に対するE3C1遺伝子による遺伝子治療を行い腫瘍血管の形態の変化を観察する。(微視的観察)
- 平成27年度と同様にマウスに移植腫瘍を作成する。
  - 腫瘍サイズが $50 \text{mm}^3$ に達した移植腫瘍に対してpE3C1を用いて1週に1回の遺伝子治療を3週間に渡って行う。
  - 3回目の遺伝子治療が終了した翌週に、マウスの尾静脈よりトマトレクチンを静脈内投与し10分間放置する。
  - その後、頸椎脱臼法にて安楽死したマウスより腫瘍を一塊に摘出し、凍結切片を作成する。
  - 作製された標本を抗vWF因子抗体や抗PECAM抗体などを用いて血管内皮細胞を免疫組織化学染色する。
  - この実験により内皮細胞が存在しながら、トマトレクチンにより示される血流が欠落する(再構築を受けている)血管の分布を評価する。

*in vitro*でE3C1が血管内皮細胞へ与える影響について検討し、*in vitro*での血管作成を試みる。( *in vitro*での検討)

- 血管内皮細胞(HUVEC)を細胞外基質タンパクのゲル中(フィブリノーゲン)で培養し、培養液中にE3C1を加え細胞の形態の変化を経時的に観察する。
- E3C1で処理したHUVEC細胞の遺伝子をジーンチップにより遺伝子解析する。

## 4. 研究成果

ヌードマウス移植腫瘍のE3C1による腫瘍縮小は腫瘍血管の変化によるものであることが明らかとなった。

E3C1による遺伝子治療で血管周囲に存在するペリサイトやTip cellに影響を及ぼしていることが明らかとなった。さらに、腫瘍血管のペリサイトが破綻し血管腔として機能しなくなることが明らかとなった。

#### 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 3件)

Chiaki Hidai, Yusuke Fujiwara, Shinichiro Kokubun, Hisataka Kitano. EGF domain of coagulation factor IX is conducive to exposure of phosphatidylserine. Cell Biol Int. 2017 Apr;41(4):374-383. doi: 10.1002/cbin.10733. Epub 2017 Feb 27. 査読有.

Hisataka Kitano, Atsushi Mamiya, Tomomi Ishikawa, Kayo Egoshi, Shinichiro Kokubun, Chiaki Hidai. Long-term gene therapy with Del1 fragment using nonviral vectors in mice with explanted tumors. Onco Targets and Therapy. 2016(9): 503-516, 2016. doi: 10.2147/OTT.S90801. 査読有.

Hisataka Kitano, Atsushi Mamiya, Tomomi Ishikawa, Shinichiro Kokubun, Chiaki Hidai. Coagulation factor IX regulates cell migration and adhesion in vitro. Cell Biol Int. 39(10): 1162-72, 2015. doi: 10.1002/cbin.10491. 査読有.

##### [学会発表](計 2件)

Hisataka Kitano. An EGF motif of Del1 suppresses Notch function and hampers angiogenesis in vivo: 5<sup>th</sup> International conference and Exhibition on Pathology: 2016年5月9日~2016年5月11日. Chicago (USA).

Hisataka Kitano. An EGF motif of Del1 suppresses Notch function and hampers angiogenesis in vivo: The American Society for Cell Biology Annual Meeting: 2015年12月12日~2015年12月16日. San Diego (USA).

##### [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 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

北野 尚孝(KITANO, Hisataka)  
日本大学・医学部・准教授  
研究者番号: 50424726

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号: