

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591771
 研究課題名（和文） マウス前立腺癌に対する IL-12 遺伝子治療と放射線併用療法における抗腫瘍効果検討
 研究課題名（英文） Combined effects of interleukin 12 gene therapy with radiotherapy for mouse model of prostate cancer
 研究代表者
 藤田 哲夫（FUJITA TETSUO）
 北里大学・医学部・講師
 研究者番号：00306599

研究成果の概要：マウス前立腺癌モデルに対する IL-12 遺伝子治療と放射線治療との併用療法における抗腫瘍効果の検討を行った。 *In vitro* 実験系において、併用療法群における細胞数の減少、IL-12 産出量の増加、アポトーシスの増加を認めた。 *In vivo* 実験系において、併用療法群における腫瘍増殖抑制効果を認めた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺癌，遺伝子治療，放射線治療

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は、罹患率・死亡率共に増加の一途を辿っている。限局性前立腺癌に関しては、手術治療や放射線治療による根治率が高いが、進行性や再発性の前立腺癌に関しては、内分泌療法がある一定期間は有効ではあるものの、内分泌療法抵抗性となることが多く、ひとたび内分泌療法抵抗性となると有効な治療法が確立されていないのが現状である。そこで、新しい治療法の開発が望まれた。

2. 研究の目的

サイトカインの一種であるインターロイキン

12 (IL-12) は、米国を中心として経静脈投与による固形腫瘍の治療が行われたが、その重篤な副作用による死亡例も報告され、投与経路の再検討を余儀なくされた。そこで開発された新しい IL-12 の投与経路が、アデノウイルスをベクターとした遺伝子治療であり、IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療の第 I 相臨床試験が、放射線治療後の再発前立腺癌に対して 2004 年より米国で開始された。但し、IL-12 は用量依存的な毒性も報告されており、IL-12 の投与量を減らしつつ、かつ最大の抗腫瘍効果を得られる併用療法の開発が望まれた。近年 IL-12 と放射線治療

との相乗効果も報告されてきており、本研究ではこの点に着目し、マウス前立腺癌モデルに対するIL-12遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療と放射線治療との併用療法における抗腫瘍効果の検討を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *In vitro* 実験系

マウス転移性前立腺癌細胞株である178-2 BMAを用いて、IL-12遺伝子発現アデノウイルスベクター及び放射線照射による細胞毒性の評価とアポトーシスの評価、及びIL-12産出量の定量を行った。

(2) *In vivo* 実験系

マウス転移性前立腺癌細胞株である178-2 BMAを用いたマウス皮下腫瘍モデルを作成し、IL-12遺伝子発現アデノウイルスベクターと放射線照射との併用療法における抗腫瘍効果を腫瘍増殖曲線を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) *In vitro* 実験系

178-2 BMA を 10-cm プレートにて培養し、70%の細胞密度になった時点でマウス IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びマウス IL-12 蛋白を感染させた。感染濃度はアデノウイルスベクターで 0, 25, 50, 100 MOI とし、マウス IL-12 蛋白で 5ng/ml とした。感染 24 時間後に、各々の感染濃度の細胞に対し 0, 5, 10, 15 Gy の照射量による放射線照射を行った。放射線照射後 24 時間・48 時間の時点にて細胞数計測を行い、細胞毒性を評価した。細胞数は、高い感染濃度及び高い放射線照射量で減少する結果となった。放射線照射後 48 時間の時点においては、全てのベクター濃度及び放射線照射量の細胞より培養上清を回収し、ELISA 法を用いてマウス IL-12 産出量の定量を行った。また、同じく放射線照射後 48 時間の時点において、細胞を DAPI によって染色し、蛍光顕微鏡を用いたアポトーシスの計測を行った。放射線照射量の増加に伴い、アポトーシスの誘導が認められた。

(2) *In vivo* 実験系

マウス皮下腫瘍モデルを作成し、IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターと放射線照射との併用療法を行った。単独治療群に比べ、併用療法群において高い腫瘍増殖抑制効果を認めた。

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 20 件)

- (1) Tetsuo Fujita, Masatsugu Iwamura, Nobuyuki Yanagisawa, Masatoshi Muramoto, Isao Okayasu, Shiro Baba, Reclassification of the current tumor, mode, metastasis staging in pT3 renal cell carcinoma, International Journal of Urology, 15, 582-586, 2008 (査読あり)
- (2) Guang Yang, Terry L. Timme, Koji Naruishi, Tetsuo Fujita, El Moataz Abdel Fattah, Guangwen Cao, Kartik Rajocoplan, Luan D. Troung, Timothy C. Thompson, Mice with *cav-1* gene disruption have benign stromal lesions and compromised epithelial differentiation, Experimental and Molecular Pathology, 84, 131-140, 2008 (査読あり)
- (3) 津村秀康, 佐藤威文, 黒坂眞二, 藤田哲夫, 松本和将, 馬場志郎, Purple urine bag syndrome の臨床像に関する検討, 泌尿器科紀要, 54, 185-188, 2008 (査読あり)
- (4) 土橋正人, 宋 成浩, 池田勝臣, 藤田哲夫, 松本和将, 佐藤威文, 岩村正嗣, 馬場志郎, 治療中, 腰椎転移をきたした胚細胞腫瘍の 3 症例, 泌尿器科紀要, 54, 803-807, 2008 (査読あり)
- (5) 平山貴博, 松本和将, 坪井俊樹, 藤田哲夫, 佐藤威文, 岩村正嗣, 青 輝昭, 馬場志郎, BCG 膀胱内注入療法後にアナフィラクトイド紫斑を認めた 1 例, 泌尿器科紀要, 54, 127-129, 2008 (査読あり)
- (6) Toshiki Tsuboi, Tetsuo Fujita, Norio Maru, Kazumasa Matsumoto, Masatsugu Iwamura, Shiro Baba, Transurethral ureterolithotripsy and extracorporeal shock wave lithotripsy in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura, Hinyokika Kyo, 54, 17-22, 2008 (査読あり)
- (7) 土橋正人, 宋 成浩, 池田勝臣, 土田蘭美, 藤田哲夫, 松本和将, 佐藤威文, 岩村正嗣, 吉田一成, 馬場志郎, 難治性胚細胞腫瘍の集学的治療法—腰椎に骨転移をきたした胚細胞腫瘍の 3 症例—, 北里医学, 37, 149-153, 2007 (査読あり)

- (8) Hongyu Wang, Guang Yang, Terry L. Timme, Tetsuo Fujita, Koji Naruishi, Anna Frolov, Malcolm K. Brenner, Dov Kadmon, Timothy C. Thompson, IL-12 gene-modified bone marrow cell therapy suppresses the development of experimental metastatic prostate cancer, *Cancer Gene Therapy*, 14, 819-827, 2007 (査読あり)
- (9) Tetsuo Fujita, Masatsugu Iwamura, Nobuyuki Yanagisawa, Masatoshi Muramoto, Takahiro Hirayama, Isao Okayasu, Shiro Baba, Prognostic impact of perirenal fat or adrenal gland involvement in patients with pT3b renal cell carcinoma, *Urology*, 69, 839-842, 2007 (査読あり)
- (10) 南田 諭, 岩村正嗣, 宋 成浩, 笹本治子, 石川 弥, 黒坂眞二, 藤田哲夫, 馬場志郎, 腹腔鏡下腎盂形成術後に腎盂内に迷入した金属クリップに結石形成を来した一例, *日本泌尿器科学会雑誌*, 98, 835-838, 2007 (査読あり)
- (11) 木村将貴, 吉田一成, 藤田哲夫, 石井大輔, 大草 洋, 須藤利雄, 西 盛宏, 平山貴博, 土田繭美, 南田 諭, 池田勝臣, 羽村素子, 竹内康雄, 兵藤 透, 鎌田貢壽, 馬場志郎, 腎移植後の透析再導入例にイコデキストリン腹膜透析液を使用し移植残腎機能温存と QOL 改善を認めた 1 症例, *日本透析医学会雑誌*, 40, 195-201, 2007 (査読あり)
- (12) 北野雅史, 勝又伴栄, 佐藤威文, 藤田哲夫, 小谷承子, 石山博條, 新部 譲, 瀧川政和, 大森智子, 馬場志郎, 早川和重, 前立腺癌の高線量率密封小線源治療後の直腸炎について 内科的治療とその効果, *臨床放射線*, 51, 1202-1208, 2006 (査読あり)
- (13) 大草 洋, 佐藤威文, 北野雅史, 石山博條, 藤田哲夫, 小谷承子, 上前峰子, 木村将貴, 津村秀康, 田畑健一, 松本和将, 颯川 晋, 早川和重, 馬場志郎, 前立腺癌に対する HDR (high-dose rate) brachytherapy と external beam radiation therapy 併用における治療効果の検討, *泌尿器外科*, 19, 943-945, 2006 (査読あり)
- (14) 佐藤威文, 早川和重, 石山博條, 津村秀康, 北野雅史, 藤田哲夫, 土橋正人, 大草 洋, 松本和将, 岩村正嗣, 小谷承子, 大田幸利, 上前峰子, 馬場志郎, 前立腺癌放射線治療における health-related QOL—LDR, HDR, および 3D-CRT の前向き比較検討—, *北里医学*, 36, 31-34, 2006 (査読あり)
- (15) 田畑健一, 佐藤威文, 松本和将, 藤田哲夫, 入江 啓, 岩村正嗣, 柳澤信之, 松田大介, 村本将俊, 門脇和臣, 須山一穂, 庄司清志, 黄 英茂, 川上達央, 岡安 勲, 颯川 晋, 馬場志郎, ハイリスク前立腺癌に対する術前 8 ヶ月ネオアジュバント内分泌療法の有用性に関する検討, *日本泌尿器科学会雑誌*, 97, 712-718, 2006 (査読あり)
- (16) Koji Naruishi, Terry L. Timme, Nobuyuki Kusaka, Tetsuo Fujita, Guang Yang, Alexei Goltsov, Takefumi Satoh, Xiaorong Ji, Wei-Hua Tian, Elmoataz Abdelfattah, Taoyan Men, Masami Watanabe, Ken-ichi Tabata, Timothy C. Thompson, Adenoviral vector-mediated RTVP-1 gene modified tumor cell-based vaccine suppresses the development of experimental prostate cancer, *Cancer Gene Therapy*, 13, 658-663, 2006 (査読あり)
- (17) Tetsuo Fujita, Bin S. Teh, Terry L. Timme, Wei-Yuan Mai, Takefumi Satoh, Nobuyuki Kusaka, Koji Naruishi, Elmoataz Abdel Fattah, Estuardo Aguilar-Cordova, E. Brian Butler, Timothy C. Thompson, Sustained long-term immune responses after *in situ* gene therapy combined with radiotherapy and hormonal therapy in prostate cancer patients, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 65, 84-90, 2006 (査読あり)
- (18) Hiromichi Ishiyama, Masashi Kitano, Takefumi Satoh, Yuzuru Niibe, Mineko Uemae, Tetsuo Fujita, Shiro Baba, Kazushige Hayakawa, Difference in rectal dosimetry between pre-plan and post-implant analysis in transperineal interstitial brachytherapy for prostate cancer, *Radiotherapy and Oncology*, 78, 194-198, 2006 (査読あり)
- (19) 平山貴博, 吉田一成, 土田繭美, 藤田哲夫, 馬場志郎, 中村信也, 遠藤忠雄, 両側多発性嚢胞腎摘除の 2 年後に, 献腎

移植を行った小児例, 腎移植・血管外科, 18, 15-19, 2006 (査読あり)

- (20) 木村将貴, 佐藤威文, 藤田哲夫, 松本和将, 西 盛宏, 岩村正嗣, 北野雅史, 石山博條, 早川和重, 馬場志郎, 前立腺癌の頭蓋底転移により脳神経症状を呈した 2 例, 日本泌尿器科学会雑誌, 97, 748-751, 2006 (査読あり)

[学会発表] (計 28 件)

- (1) Tetsuo Fujita, Toshiya Shitara, Seiichi Kubo, Masatsugu Iwamura, Shiro Baba, A novel technique for mechanical morcellation in holmium laser enucleation of the prostate, 26th World Congress of Endourology & SWL, 2008/12/1, Shanghai
- (2) 藤田哲夫, 岩村正嗣, 平山貴博, 松田大介, 津村秀康, 吉田一成, 馬場志郎, 腹腔鏡下根治的腎摘除術における BMI の影響, 第 22 回日本 Endourology・ESWL 学会総会, 2008/11/13, 大阪
- (3) 藤田哲夫, 岩村正嗣, 徳山佳子, 池田勝臣, 平山貴博, 村本将俊, 馬場志郎, 腎細胞癌術後長期再発転移症例の臨床病理学的検討, 第 73 回日本泌尿器科学会東部総会, 2008/9/19, 東京
- (4) 佐藤威文, 石山博條, 津村秀康, 田畑健一, 北野雅史, 大草 洋, 小谷承子, 藤田哲夫, 松本和将, 岩村正嗣, 早川和重, 馬場志郎, 前立腺癌に対するヨウ素 125 永久挿入密封小線源療法: 初期 100 例の治療成績, 第 73 回日本泌尿器科学会東部総会, 2008/9/19, 東京
- (5) 藤田哲夫, 岩村正嗣, 柳澤信之, 松下一仁, 津村秀康, 村本将俊, 岡安 勲, 馬場志郎, pT3 腎細胞癌に対する TNM 再分類の検討, 第 96 回日本泌尿器科学会総会, 2008/4/27, 横浜
- (6) 津村秀康, 岩村正嗣, 土田繭美, 西 盛宏, 松田大介, 黒坂眞二, 田畑健一, 藤田哲夫, 吉田一成, 馬場志郎, 単一術者による腹腔鏡下根治的腎摘除術 60 例の経験, 第 96 回日本泌尿器科学会総会, 2008/4/25, 横浜
- (7) 佐藤威文, 津村秀康, 大草 洋, 田畑健一, 藤田哲夫, 石山博條, 小谷承子, 北野雅史, 早川和重, 馬場志郎, ハイリスク症例に対する密封小線源療法の可能性: LDR vs HDR, 第 96 回日本泌尿器科学会総会, 2008/4/25, 横浜

- (8) 松下一仁, 岩村正嗣, 笹本治子, 須山一穂, 藤田哲夫, 馬場志郎, 体腔鏡下根治的腎摘除術におけるポート創再発および腹腔内播種例の検討, 第 21 回日本 Endourology・ESWL 学会総会, 2007/11/27, 東京
- (9) Kazuhito Matsushita, Kazumasa Matsumoto, Shigehiro Soh, Tetsuo Fujita, Takefumi Satoh, Erina Satoh, Masatsugu Iwamura, Toshiharu Ishii, Shiro Baba, Lymphatic vessel architecture in normal tissue and carcinoma of the urinary bladder, 29th Congress of the Societe Internationale d'Urologie, 2007/9/4, Paris
- (10) 田畑健一, 佐藤威文, 藤田哲夫, 山下英之, 石井淳一郎, 柳澤信之, 松本和将, Thomas M. Wheeler, Dov Kadmon, Timothy C. Thompson, 岡安 勲, 馬場志郎, 前立腺癌に対する HSV-tk 遺伝子治療併用における根治術病理所見の検討, 第 72 回日本泌尿器科学会東部総会, 2007/8/31, 札幌
- (11) 佐藤威文, 藤田哲夫, 松本和将, 馬場志郎, 岡安 勲, 田畑健一, 山下英之, Dov Kadmon, Timothy C. Thompson, 石井淳一郎, 柳澤信之, Thomas M. Wheeler, 前立腺癌に対する HSV-tk 遺伝子治療併用における根治術病理所見の検討, 第 24 回神奈川県前立腺腫瘍研究会, 2007/7/7, 横浜
- (12) 津村秀康, 佐藤威文, 石山博條, 藤田哲夫, 土橋正人, 木村将貴, 大草 洋, 池田勝臣, 土田繭美, 松下一仁, 松本和将, 早川和重, 馬場志郎, 前立腺癌ヨウ素 125 永久挿入密封小線源療法における implant quality : intraoperative preplanning と interactive planning の比較検討, 第 95 回日本泌尿器科学会総会, 2007/4/17, 神戸
- (13) 松下一仁, 佐藤威文, 岩村正嗣, 藤田哲夫, 松本和将, 田畑健一, 石山博條, 北野雅史, 早川和重, 石坂秀門, 間瀬行雄, 馬場志郎, 前立腺癌根治療法別における医療収支: 平成 18 年度診療報酬改定の検討, 第 95 回日本泌尿器科学会総会, 2007/4/16, 神戸
- (14) 村本将俊, 須山一穂, 岩村正嗣, マッキンケネス, 藤田哲夫, 藤城貴教, 平山貴博, 馬場志郎, Rough neural network を用いた腎細胞癌再発予測モデルの改良

- 化, 第 95 回日本泌尿器科学会総会, 2007/4/14, 神戸
- (15) 藤田哲夫, 岩村正嗣, 柳澤信之, 村本将俊, 平山貴博, 岡安 勲, 馬場志郎, pT3b 腎細胞癌における pT3a 成分の有無に関する検討, 第 95 回日本泌尿器科学会総会, 2007/4/14, 神戸
- (16) Tetsuo Fujita, Bin S. Teh, Wei-Yuan Mai, Takefumi Satoh, Ken-ichi Tabata, Estuardo Aguilar-Cordova, Brian J. Miles, Dov Kadmon, E. Brian Butler, Timothy C. Thompson, Long-term T cell activation following combined *in situ* gene therapy and intensity-modulated radiotherapy compared to gene therapy as mono-therapy in prostate cancer patients, 48th Annual Meeting of the American Society for Therapeutic Radiology and Oncology, 2006/11/5, Philadelphia
- (17) 佐藤威文, 坪井俊樹, 北野雅史, 石山博條, 津村秀康, 大草 洋, 藤田哲夫, 松本和将, 入江 啓, 穎川 晋, 早川和重, 馬場志郎, 放射線治療後局所再発前立腺癌に対する salvage HDR brachytherapy の検討, 第 71 回日本泌尿器科学会東部総会, 2006/10/21, 東京
- (18) 藤田哲夫, 岩村正嗣, 柳澤信之, 村本将俊, 平山貴博, 岡安 勲, 馬場志郎, pT3b 腎細胞癌における pT3a 成分の有無が予後に与える影響についての検討, 第 71 回日本泌尿器科学会東部総会, 2006/10/20, 東京
- (19) 津村秀康, 佐藤威文, 藤田哲夫, 大草 洋, 松本和将, 石山博條, 北野雅史, 早川和重, 馬場志郎, ヨウ素 125 前立腺癌永久挿入密封小線源療法における治療線源数の事前予測: Anderson nomogram の検討, 第 20 回日本 Endourology・ESWL 学会総会, 2006/10/6, 大阪
- (20) 藤田哲夫, 岩村正嗣, 津村秀康, 松本和将, 佐藤威文, 村本将俊, 宋 成浩, 吉田一成, 馬場志郎, 腎細胞癌に対する腹腔鏡下手術の臨床的検討, 第 20 回日本 Endourology・ESWL 学会総会, 2006/10/5, 大阪
- (21) 藤田哲夫, 岩村正嗣, 柳澤信之, 村本将俊, 松本和将, 岡安 勲, 馬場志郎, pT3b 腎細胞癌における pT3a 成分の有無が予後に与える影響についての検討, 第 65 回日本癌学会学術総会, 2006/9/29, 横浜
- (22) Tetsuo Fujita, Masatsugu Iwamura, Haruko Sasamoto, Shiro Baba, Clinical features of laparoscopic radical nephrectomy: experience of 100 cases, 3rd Annual Meeting of the East Asian Society of Endourology, 2006/9/15, Taipei
- (23) 佐藤威文, 藤田哲夫, 松本和将, 田畑健一, 山下英之, Brian J. Miles, Dov Kadmon, Terry L. Timme, Thomas M. Wheeler, Timothy C. Thompson, 馬場志郎, 放射線治療後局所再発前立腺癌に対する HSV-tk+GCV 遺伝子治療および IL-12 遺伝子治療の検討, 第 23 回神奈川県前立腺腫瘍研究会, 2006/7/1, 横浜
- (24) Tetsuo Fujita, Bin S. Teh, Terry L. Timme, Gustavo Ayala, Wei-Yuan Mai, Takefumi Satoh, Nobuyuki Kusaka, Koji Naruishi, Ken-ichi Tabata, Estuardo Aguilar-Cordova, Thomas Wheeler, E. Brian Butler, Timothy C. Thompson, Combining *in situ* gene therapy with radiotherapy and hormonal therapy in the treatment of Stage D1 prostate cancer, 9th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2006/6/3, Baltimore
- (25) Tetsuo Fujita, Bin S. Teh, Terry L. Timme, Wei-Yuan Mai, Takefumi Satoh, Nobuyuki Kusaka, Koji Naruishi, Elmoataz Abdelfattah, Estuardo Aguilar-Cordova, Brian J. Miles, E. Brian Butler, Timothy C. Thompson, Long-term T cell activation following combined *in situ* gene therapy and intensity-modulated radiotherapy compared to gene therapy as mono-therapy in prostate cancer patients, 9th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2006/6/1, Baltimore
- (26) 津村秀康, 岩村正嗣, 池田勝臣, 西盛宏, 黒坂真二, 藤田哲夫, 村本将俊, 馬場志郎, 腎癌に対する腹腔鏡下手術 81 例の臨床的検討, 第 94 回日本泌尿器科学会総会, 2006/4/15, 福岡
- (27) 佐藤威文, 藤田哲夫, 松本和将, 田畑健一, 大草 洋, 岩村正嗣, 石山博條, 北野雅史, 新部 讓, 早川和重, 石坂秀門, 間瀬行雄, 馬場志郎, 前立腺癌根治

療法別における医療収支の検討, 第 94 回
日本泌尿器科学会総会, 2006/4/15, 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 哲夫 (FUJITA TETSUO)

北里大学・医学部・講師

研究者番号: 00306599

(2) 研究分担者

岩村 正嗣 (IWAMURA MASATSUGU)

北里大学・医学部・講師

研究者番号: 20176564

田畑 健一 (TABATA KENICHI)

北里大学・医学部・助教

研究者番号: 20327414

佐藤 威文 (SATOH TAKEFUMI)

北里大学・医学部・講師

研究者番号: 50286332

村本 将俊 (MURAMOTO MASATOSHI)

北里大学・医学部・助教

研究者番号: 50265633

松下 一仁 (MATSUSHITA KAZUHIITO)

北里大学・医学部・助教

研究者番号: 30365142

津村 秀康 (TSUMURA HIDEYASU)

北里大学・医学部・助教

研究者番号: 20348569