

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09800

研究課題名（和文）Del1による遺伝子治療と抗体薬の併用療法の効果

研究課題名（英文）Effect of combination therapy of gene therapy with a Del1 and antibody-drug

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：平成30年度の研究において、*in vitro*の実験系でDel1のE3C1は細胞膜の性状の変化に影響していることが明らかとなった。令和元年度の研究では、シスプラチン(CDDP)+E3C1による遺伝子治療が腫瘍を移植したヌードマウスの腫瘍増殖を抑制し、生命予後を改善した。令和2年度の研究では、CDDP+E3C1による治療効果は腫瘍血管の数や形態の変化によるものであ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CDDP+E3C1による遺伝子治療を行うと腫瘍血管の血管内皮細胞やがん細胞の細胞膜の性状に影響を与え、治療効果を発揮することが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、世界中でがん治療に対する多剤併用療法は数多く行われており著しい進歩を遂げている。さらに併用療法は、治療に対する耐性を抑制する効果も期待されており、今後化学療法の主流になっていくと予想される。そして、今回の研究でシスプラチン(CDDP)+E3C1による遺伝子治療が*in vivo*の実験系でマウスの生命予後を副作用の発現を伴わず改善できたことは、がん治療に新しい可能性を提案できるのではないかと考えている。さらには、今回の研究結果ががん遺伝子治療に留まらず、多種多様な遺伝子治療に貢献できればと考えている。

研究成果の概要（英文）：In a study of the 2018, E3C1 in Del1 was found to affect the change of cell membrane properties *in vitro*. In a 2019 study, treated by cisplatin (CDDP) + E3C1 inhibited tumor growth in explanted tumor in nude mice. Furthermore, treated by CDDP + E3C1 improved the life prognosis of mice. In a 2020 Study revealed that the therapeutic effect of CDDP+E3C1 is a change in the number and morphology of tumor blood vessels. These results suggest that gene therapy with CDDP+E3C1 for mouse transplanted tumors affects the properties of endothelial cells of tumor blood vessels and cell membranes of cancer cells. As a result, it was thought that the growth of mouse explanted tumors was inhibited. Furthermore, it was suggested that the prognosis of mice was prolonged.

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在のがん治療は手術、放射線、化学療法の主要な治療法があり、それらにはそれぞれの問題点がある。中でも近年急速に進歩している化学療法は更なる発展のために新薬の開発が必要であり、その一つとして分子標的薬が注目されている。また、主要な治療法を補完する治療法として、遺伝子治療や免疫療法がある。遺伝子治療の方法としてウイルスを使用する方法と非ウイルスベクターによる方法とがある。そして、それらにはそれぞれの長所や問題点が存在する。それらの問題点のいくつかを克服すると期待される方法として、抗 PS 抗体治療法や E3C1 遺伝子治療がある。

現在、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ディンドメイン(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. MolBiotechnol., 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ディンドメイン(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。それ故、E3C1 治療は有効であることが明らかとなった。

動物細胞の細胞膜は二重膜を形成しているが、外側と内側では同一ではない。リン脂質フォスファチジルセリン(PS)やフォスファチジルエタノールアミン(PE)は膜の内側にのみ存在

するのに対し、フォスファチジルコリン(PC)は比較的外膜に多い。この膜の非対称性は種々の局面で破綻する。例えば、細胞がアポトーシスに陥ると死細胞の表面にはPSが暴露され、これをマクロファージが“eat me”シグナルと認識し死細胞を貪食する。また、止血の際に発揮される血小板の機能として、血小板表面にPSを表出させ血液凝固を促進する作用である血小板凝固活性(platelet procoagulant activity)があることが知られている。この反転したPSには血液凝固第2因子(トロンピン)、血液凝固第7因子(F7)、血液凝固第9因子(F9)および血液凝固第10因子(F10)が結合する。これらの血液凝固因子はビタミンK依存性の凝固因子で構造上にGlaドメインが共通に存在する。さらにF7, F9, F10はGlaドメイン以外に構造上で共通のEGFモチーフ(CXDXXXXYXCXC)を持つことが知られている。我々はこれまでにin vitroの実験系において血液凝固第9因子のEGFモチーフ(CXDXXXXYXCXC)が扁平上皮癌細胞の細胞膜の性状に影響を及ぼしPSを反転させることを報告している(Hidai, et al. Cell Bio Int. 2017, 41(4):374-383)。そしてこれまでに、Del1はE3ドメインに(CXDXXXXYXCXC)の構造を持っていることが明らかとなっている。このことより、E3C1は血管内皮細胞やがん細胞の細胞膜の脂質二重膜の性状を変化させることによりPSを反転させ、細胞-細胞間接着や細胞-ECM間接着に影響を与えているのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

我々は、平成20年度より科学研究費補助金の交付を受けDel1タンパク由来のペプチド(E3C1)の持つ遺伝子導入効率改善効果、アポトーシス誘導効果および細胞外基質タンパクへの沈着効果を利用し、E3C1遺伝子によるマウス移植腫瘍に対する遺伝子治療で腫瘍縮小効果や生命予後の劇的な改善を得ることに成功した。さらに特記すべき副作用の発現を認めず、腫瘍増大の抑制が腫瘍血管の変化によるものであるという作用機序も明らかとなった。またE3C1にも存在するEGFモチーフ(CXDXXXXYXCXC)が細胞膜に影響を与え、フォスファチジルセリン(PS)を反転させることが明らかとなっている。本研究ではE3C1遺伝子が腫瘍血管の血管内皮細胞や腫瘍細胞の細胞膜へ与える影響や抗PS抗体薬との併用によりマウスの生命予後の改善や腫瘍縮小効果について明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、まず、Del1由来のE3C1が、細胞膜の性状に与える影響を検討する。その初めの段階として、in vitroの実験系でE3C1が血管内皮細胞やがん細胞の細胞膜の性状の変化を明らかにするため、抗PS抗体であるAnnexinVやP-SIVAで細胞を染色しPSの反転を検討する。

次に、ヌードマウス移植腫瘍に与える影響とマウスの生命予後に与える影響をE3C1による遺伝子治療+抗PS抗体薬とカルボプラチン+抗PS抗体薬で比較し検討する。さらに、in vivoの実験系で腫瘍血管の新生および抑制と腫瘍実質に与える影響をE3C1による遺伝子治療+抗PS抗体薬とカルボプラチン+抗PS抗体薬で組織学的に検討し腫瘍組織に与える変化を解明する。

4. 研究成果

平成30年度の研究でE3C1はリピッドラフトとの形成に関与していることが明らかになった。さらにそのリピッドラフトはカベオラと共存することも確認された。さらにE3C1で処理することにより細胞膜のコレステロールの性状に変化を与え、細胞膜でのPSの反転にも影響を与えていることが明らかとなった。

令和元年度は in vivo の実験系で腫瘍血管の新生および抑制と腫瘍実質に与える影響を E3C1 による遺伝子治療 + 抗 PS 抗体薬とカルボプラチン + 抗 PS 抗体薬で効果を検討しようとしたが、抗 PS 抗体薬の入手が不可能であった。そこで、ヌードマウス移植腫瘍に与える影響とマウスの生命予後に与える影響をシスプラチン (CDDP) と CDDP + E3C1 による遺伝子治療で比較し検討した。その結果、ヌードマウス移植腫瘍に CDDP 単独で治療を行うよりも CDDP+E3C1 の併用療法を行う方が腫瘍の増殖速度を減少させることや、マウスの生命予後を副作用の発現を伴わず改善することが確認された。

平成 30 年度、令和元年度の実績を踏まえて、令和 2 年度は CDDP と CDDP + E3C1 による遺伝子治療を行ったヌードマウス移植腫瘍の組織学的検討を行った。治療開始から 11 日目のマウスの腫瘍を H-E 染色した結果コントロール治療群の腫瘍は、ほとんど細胞死を起こしていなかった。これに対して、CDDP 治療群の腫瘍は、多くの細胞死が認められた。一方、CDDP+E3C1 治療群の腫瘍は細胞死を認める中にも腫瘍の実質および間質が多く残存していた。次に、治療開始から 11 日目のマウスにインディアンインクを静脈内投与し、腫瘍血管を描出し観察した。その結果、コントロール治療群の腫瘍血管は多数の枝を発達させており、細い血管が多数観察された。一方、CDDP 治療群の腫瘍血管は、血管の数および枝が減少しており、太い血管を認めなかった。また CDDP+E3C1 治療群の腫瘍血管は、太い血管を認めたが、細い血管やその枝の数は減少していた。さらに、治療開始から 11 日目のマウスにトマトレクチンを静脈内投与し、腫瘍血管を摘出した。そしてその腫瘍を抗アルファスモースマッスル (aSMA) 抗体または、抗 CD31 抗体 (PECAM) によって染色した。その結果、コントロール治療群は、腫瘍間質の全体に aSMA と PECAM の発現を認めた。また、トマトレクチンによって描出された血管の周囲に aSMA の発現を認めた。一方、CDDP 治療群のマウス腫瘍は、腫瘍間質に aSMA の発現をあまり認めなかったが、PECAM の発現が観察された。さらに、トマトレクチンによって描出された血管の周囲にもほとんど aSMA の発現を認めなかった。CDDP+E3C1 治療群のマウス腫瘍においては aSMA の発現が抑制されていたが、腫瘍間質に PECAM の発現が観察された。さらに、トマトレクチンによって描出された血管の周囲でも aSMA の発現は抑制されていた。

このことより、E3C1 は腫瘍血管の新生および抑制に影響を及ぼすことが明らかとなった。そして、腫瘍に対して CDDP+E3C1 の併用療法を行うことで、マウスの生命予後を副作用の発現を伴わず改善できることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hidai Chiaki, Kitano Hisataka	4. 巻 6
2. 論文標題 Nonviral Gene Therapy for Cancer: A Review	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diseases	6. 最初と最後の頁 57～57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diseases6030057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kitano Hisataka, Ishikawa Tomomi, Tamura Eri, Kokubun Shinichiro, Hidai Chiaki	4. 巻 7
2. 論文標題 Efficient cancer gene therapy with a Del1 fragment administered by hypodermic injection in a mouse explanted tumor model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Translational Cancer Research	6. 最初と最後の頁 686～694
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/tcr.2018.05.45	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kitano Hisataka, Mamiya Atsushi, Ishikawa Tomomi, Fujiwara Yusuke, Masaoka Yoh, Miki Toshio, Hidai Chiaki	4. 巻 73
2. 論文標題 An Epidermal Growth Factor Motif of Developmental Endothelial Locus 1 Protein Inhibits Efficient Angiogenesis in Explanted Squamous Cell Carcinoma In Vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Revista de investigacion Clinica	6. 最初と最後の頁 39-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24875/RIC.20000375	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 KITANO HISATAKA, MASAOKA YOH, MAMIYA ATSUSHI, FUJIWARA YUSUKE, MIKI TOSHIO, HIDAI CHIAKI	4. 巻 35
2. 論文標題 Combination Cancer Therapy of a Del1 Fragment and Cisplatin Enhanced Therapeutic Efficiency In Vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 779～791
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.12318	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hisataka Kitano
2. 発表標題 An EGF motif of Del1 inhibits efficient angiogenesis and suppresses tumor growth in vivo.
3. 学会等名 2019 The EUROPEAN SOCIETY FOR MEDICAL ONCOLOGY Asia Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 北野 尚孝	4. 発行年 2018年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 126
3. 書名 Precision Medicine	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------