

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19390344  
 研究課題名 (和文) 遺伝子操作で作成した血管新生抑制因子産生細胞の移植による抗血管新生療法の開発  
 研究課題名 (英文) Anti-angiogenesis therapy by transplantation of cells expressing anti-angiogenesis factor established by gene transductions  
 研究代表者  
 七戸俊明 (SHICHINOHE TOSHIAKI)  
 北海道大学・医学研究科・講師  
 研究者番号：70374353

## 研究成果の概要：

固形癌に対する新しい治療法として、血管新生阻害因子による遺伝子治療を細胞療法と組み合わせた治療法の可能性について模索した。

血管新生阻害因子である PEDF (Pigment Epithelium-derived Factor) 遺伝子を用い、PEDF 発現レンチウイルスベクターを構築して細胞株に導入し、PEDF タンパクの産生と分泌を調べたのち、*in vitro* でのヒト臍帯静脈内皮細胞の増殖抑制および遊走能の低下を確認し、マウスにおける移植腫瘍内の血管新生抑制効果および腫瘍に対する治療効果として腫瘍増大抑制効果を確認した。一方で、PEDF の作用機序の一つとして、骨髄由来の血管内皮前駆細胞 (EPC) の誘導を抑制することが判明した。

本治療の有用性が示唆された一方で、従来考えられてきた血管新生阻害療法の問題点も明らかになった。血管新生阻害療法では耐性癌細胞株の出現はないと考えられていたが、個々の細胞ではなく腫瘍全体でみた場合、治療に耐性を持つ細胞が出現することが判明した。この耐性株 2 株は、新生血管の阻害によって壊死は起こすために腫瘍内部には生細胞は減少するが、腫瘍辺縁の細胞は生存して、腫瘍全体の体積は増大し続ける性質を持っていた。耐性株 2 株の組織型はいずれも扁平上皮癌であり、臨床的にも内部壊死を伴う性質が扁平上皮癌にしばしば観察されることから考えると、今後の治療研究を模索する際の重要なヒントになることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：食道外科学、血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

癌は医学の進歩によって、早期発見と有効な治療法の開発が進んでいるにもかかわらず、先進国の死亡要因の第一位となっている。他の疾患は極めて有効な治療法が開発されているために、治療成績が格段に改善している一方で、癌については生存率の改善がわずかであることが、その要因のひとつと考えられている。

これまでに報告されてきた研究成果より、癌の中でも多数を占める固形癌については、多くの場合外科的な切除が臨床的にもっとも有効な治療手段であると考えられている。しかし、物理的に切除不可能な進行癌の多くは致死的であり、また、根治手術が施行された場合であっても、微細な転移巣が増大して再発した場合の多くは切除不可能となる。また、化学療法や放射線療法、遺伝子治療やがん免疫療法などでは、動物実験においても臨床的にも、既に増大した腫瘍が縮小して治癒するといった減少は極めてまれで、微細な腫瘍が増大することを抑制する効果を期待してこれらの治療を施行することがもっとも有用であると考えられる。

以上のことを踏まえると、根治を目的とした固形癌に対する治療は、手術による主病巣や周辺の局所制御と、補助療法による微細な残存病巣の増殖抑制によって成否が決定される。多くの腫瘍で有用性が認められている手術においては、術式の標準化が進み、最近では非侵襲的術式の開発に主眼がおかれているが、治療成績を向上させるためには、補助療法に相当する治療手段の選択肢を増やすことが必要であると考えられる。

固形癌に対する新たな治療法の開発には、発癌が遺伝子異常を原因としておこること

から、分子生物学的に癌の特徴を解析し、それに応じた治療法の開発が必要であると考えられてきた。新たに開発されている遺伝子治療などでは、癌の遺伝子異常を標的としてアポトーシスを誘導するなどの手法が試みられているが、遺伝子導入ベクターに問題がある場合や、腫瘍細胞に対する特異性が低いこと、あるいは腫瘍細胞が耐性を獲得するなどの障壁が多数存在している。

一方で、癌細胞が腫瘍を形成するためには、血管の新生が必須であることから、これを阻害することで、腫瘍の分子生物学的特徴に関わらずに治療効果が期待できると考えられるようになり、アバスチンなどをはじめとする抗血管新生療法が開発されるようになってきた。抗血管新生療法は、先に述べた腫瘍特異性や耐性などの問題がほとんどないことから、有用性が期待されており、すでに臨床応用されている抗血管新生療法では、抗癌剤との併用によって有意な生存期間の延長が認められている。

PEDF (Pigment Epithelium-derived Factor) はヒトの網膜や正常脾で発現する強力な血管新生阻害因子であることが示されており、当教室の研究から、脾癌症例の70%以上で発現が低下しており、さらにこの発現低下が見られる症例では、そうでない症例と比較して有意に生存率が不良となることが示されている。また、PEDFの発現が低下している腫瘍では、そうでない腫瘍と比較して有意に腫瘍内微細血管の数が増加していることが判明している。したがって、PEDFの発現が低下することが、腫瘍内に新たな新生血管を誘導して腫瘍を増大させ、癌の進行を促進させて生存率を低下させていることが考えられる。

以上より、癌細胞において PEDF の発現を回復させることで、腫瘍の増大を抑制できると考えられる。

一方、臨床応用されている抗血管新生療法は抗体を用いて新生血管を阻害する手法が採用されているが、これは遺伝子治療ベクターに問題があることに起因する。PEDF 遺伝子を導入する場合に、ベクターの遺伝子導入効率や感染の特異性などの問題から、遺伝子発現ベクター導入による遺伝子治療には障壁が多い。

そこで、現在、いくつかの分野では、採取した宿主の細胞を用いて体外で遺伝子導入を行い、培養増殖させた後に宿主に投与（移植）する手法（細胞療法）が研究され、癌免疫療法においては臨床試験が進められている。当教室においても癌患者の樹状細胞 (DC) を体外で培養、抗原刺激して投与する癌免疫療法の臨床試験を施行している。

以上の背景を総合して考えると、抗血管新生療法として有用であることが予想される PEDF 遺伝子治療を細胞療法に適応して、新しい治療法を開発することが有用であるという仮説が導かれる。

## 2. 研究の目的

進行癌患者に対して有効で安全と思われる術後補助療法の開発を行うことを目的とする。つまり、最終的には、癌患者自身から採取した正常細胞に治療遺伝子を導入し、これをもとの患者に移植する治療系を想定し、これによって抗腫瘍効果が認められるかどうかや安全性について検証する。まず PEDF の遺伝子を用いてマウス癌移植モデルにおける治療効果を評価し、この際に移植腫瘍に発生している変化を分子生物学的に解析する。

## 3. 研究の方法

以下の方法で PEDF を用いた細胞療法を構築する。PEDF 発現レンチウイルスベクターを用いる。ヒト正常組織からクローニングされた PEDF の cDNA を導入したシャトルプラスミドを用い、遺伝子相同組み換えを利用してレンチウイルスベクタープラスミドを作成する。作製したプラスミドを HEK293T 細胞に遺伝子

導入してレンチウイルスベクターを複製させて回収し、超遠心分離法で精製する。精製したベクターを用いて、正常組織である繊維芽細胞株に遺伝子導入し過剰発現株を樹立する。それぞれの遺伝子導入株で PEDF の発現を Western blot 法で確認すると同時に、ELISA 法で PEDF タンパクの分泌を確認する。これらの PEDF 過剰発現株を用い、*in vitro* でヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) と共培養した場合の HUVEC の増殖抑制効果や遊走能の変化などを検証する。

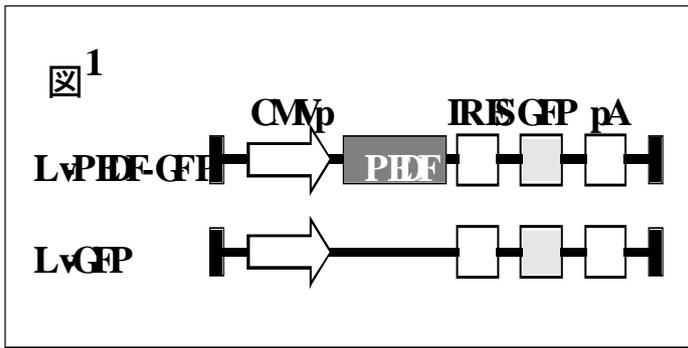
上記の効果を確認後、PEDF 過剰発現株をマウスに移植し、血清中の PEDF 濃度を ELISA 法で検出する。対照群（空ベクターを導入した繊維芽細胞を移植した群および未治療の群）と比較することで腫瘍増大抑制効果検討すると同時に、作用機序を解明するために末梢血単核球分画における骨髄由来の血管内皮前駆細胞 (EPC) を、FACS にて解析する。更にこの腫瘍を切除して二重免疫染色法で検討し、腫瘍内血管の由来を明らかにする。

上記研究を複数の癌細胞株で施行し、効果に差がみられた場合、差の原因となる因子の検索を行う。腫瘍細胞における DNA アレイと新生血管内皮細胞数の検討を施行することによって、血管新生因子発現と細胞治療による効果の予測が可能かどうかを検証する。

一方で、PEDF 受容体の探索を行う。PEDF タンパクを用いた免疫沈降を施行し、PEDF と特異的に結合する受容体タンパクを同定する。

## 4. 研究成果

レンチウイルスベクターに PEDF, GFP 遺伝子を導入し、PEDF と GFP 遺伝子の両方を発現するベクター (Lv-PEDF-GFP)、および GFP 遺伝子のみを発現するベクター (Lv-GFP : 対照ベクター) を構築した (図 1)。



これを用いて各種癌細胞株に遺伝子導入を行い、PEDF と GFP 遺伝子の両方を発現する細胞株と GFP 遺伝子のみを発現する複数種の細胞株（膵癌細胞株，食道癌細胞株）を樹立した。

これらの細胞株において、PEDF 発現株の培養上清に暴露した HUVEC の増殖および遊走が、対照株と比較して有意に抑制され、マウスに移植した PEDF 発現株で有意に腫瘍増大が抑制され、かつ腫瘍内血管内皮細胞数が減少することが確認された。さらに、PEDF 発現株移植マウスにおいては骨髄由来の血管内皮前駆細胞（EPC）数が減少していることを確認した。このことから、分泌された PEDF が骨髄に作用を及ぼしている可能性が考えられた（図表は論文投稿中につき著作権未取得）。

Lv-PEDF-GFP 投与マウスにおいて、有害事象は認められなかった。

本治療の有用性が示唆された一方で、従来考えられてきた血管新生阻害療法の問題点も明らかになった。血管新生阻害療法では耐性癌細胞株の出現はないと考えられていたが、個々の細胞ではなく腫瘍全体でみた場合、治療に耐性を持つ細胞が出現することが判明した。癌細胞に直接 PEDF 遺伝子を導入して過剰発現株を樹立し、マウスに移植した場合、腫瘍内の血管新生が抑制されているにもかかわらず、腫瘍の増大が抑制されない耐性株が出現することが確認された。この細胞株は、野生型細胞株と比較した場合、腫瘍内部が壊死を起こしたまま、腫瘍辺縁部の細胞のみが生存して増殖する形質を有していることが判明した。つまり、細胞自体は血管新生

阻害によって壊死を起こすが、腫瘍としては増大を続けることになるため、結果的に治療効果としての腫瘍増殖抑制は認められなくなる。耐性株 2 株の組織型はいずれも扁平上皮癌であり、臨床的にも内部壊死を伴う性質が扁平上皮癌にしばしば観察されることから考えると、今後の治療研究を模索する際の重要なヒントにな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）

〔学会発表〕（計 1 件）

第 18 回日本消化器癌発生学会 2007 年 11 月 8, 9 日 札幌

宮本正樹、長谷龍之介、角谷昌俊、上原浩文、七戸俊明、樋田泰浩、平野聡、近藤哲  
血管新生阻害因子 PEDF による遺伝子治療。  
シンポジウム〔消化器癌治療の新展開〕

#### 〔その他〕 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

七戸 俊明 (SHICHINOHE TOSHIKI)  
北海道大学・医学研究科・講師  
研究者番号：70374353

##### (2) 研究分担者

近藤 哲 (KONDO SATOSHI)  
北海道大学・医学研究科・教授  
研究者番号：30215454

平野 聡 (HIRANO SATOSHI)  
北海道大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：50322813

宮本 正樹 (MIYAMOTO MASAKI)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号：40333611

##### (3) 連携研究者

なし