

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591851
 研究課題名（和文）
 前立腺癌を標的とした音響穿孔法による IL12 免疫遺伝子治療の開発研究
 研究課題名（英文） Novel approach with sonoporation in IL12 gene therapy for prostate cancer.

研究代表者
 雑賀 隆史（SAIKA TAKASHI）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：10314676

研究成果の概要（和文）：ウイルスベクターを用いない新規遺伝子導入法による遺伝子治療の開発として、高密度焦点超音波（HIFU）による遺伝子導入実験を、臨床像に即した癌モデルを利用し臨床前研究としておこなった。遺伝子導入設定の確立と、より高い部位選択性を明らかにする遺伝子導入効果モニタリングをおこない、副作用の少ない実用的臨床効果を期待できる新しい遺伝子導入法による国内外初の遺伝子治療の開発につながる成果をえた。

研究成果の概要（英文）：To examine the efficacy and to establish of high intensity focused ultrasound (HIFU)-mediated gene therapy in the treatment of prostate cancer, we performed Interferon-12 (IL-12) gene therapy combined with sonoporation, using preclinical model of orthotopic murine prostate cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、高密度焦点超音波、遺伝子導入、インターロイキン 12

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌に対するインターロイキン 12（IL-12）をもちいた免疫遺伝子療法は Natural Killer（NK）細胞や細胞障害性 T 細胞（CTL）を誘導することで全身性に抗腫瘍効果が得られ

ることがわれわれの基礎実験などから明らかになっており、すでに臨床試験段階に至っている。これら遺伝子治療は遺伝子導入効率が高いことからウイルスベクターを用いることで広く普及してきた。しかし一方で、ベクタ

ーウイルス自体による有害事象発生の可能性は否定できず、また、遺伝子治療の一般化の過程においてベクターの品質管理やコスト面での問題なども山積している。加えて、免疫応答をモニタリングするにあたってはベクターウイルスに起因する免疫応答との鑑別が困難である。このため、ウイルスベクターを用いない遺伝子導入法による遺伝子治療の開発は癌免疫遺伝子療法のさらなる発展に大きく貢献できると考えた。現在のウイルスベクターを用いない癌遺伝子療法としてはリポソームなどが試みられているが、十分な効率が得られていないのが現状である。このため、遺伝子導入を確認した基礎実験報告がなされた新規方法である、高密度焦点超音波（HIFU）による遺伝子導入に着目した。この方法に関して、従来のウイルスベクターとその治療効果まで直接比較検討したものはない。われわれは以前より、同所移植を用いた前立腺癌モデルにおけるIL-12免疫遺伝子療法の臨床前研究体制を確立しており、また、岡山大学医歯薬学総合研究科では科学振興調整費による“ナノバイオ標的医療の融合的創出拠点の形成”における“物理エネルギーの融合の研究”において小動物に対するHIFU照射を行う設定をすでに遂行中であり、この機器の取り扱いに習熟している。また、生体蛍光イメージングシステムIVISを用いることで、抗腫瘍効果を同一個体での腫瘍体積の変化、転移の有無として経時的にモニタリングすることができる。

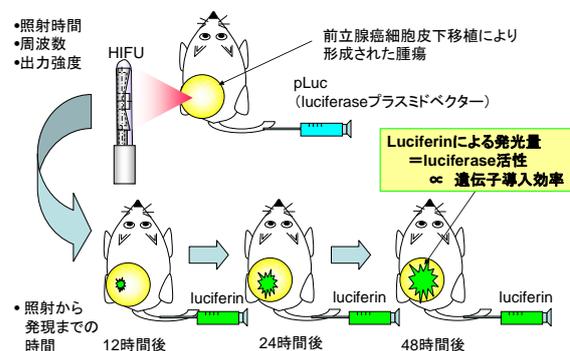
2. 研究の目的

臨床像に即した癌モデルを利用し、高密度焦点超音波（HIFU）による遺伝子導入を用いた前立腺癌に対するIL-12免疫遺伝子治療の臨床前研究をおこなうもので、より高い部位選択性、免疫効果モニタリングと副作用の少ない実用的臨床効果を期待できる新しい遺伝子

導入法による国内外初の遺伝子治療の開発を目的とした。

3. 研究の方法

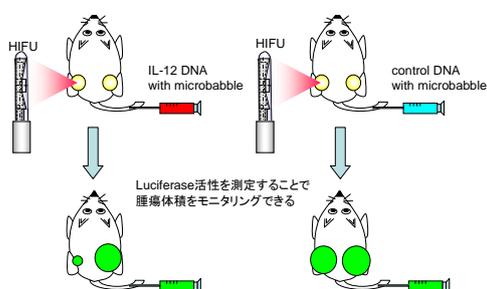
- (1) HIFU による遺伝子導入をおこなうために周波数、出力エネルギーの至適条件を確保できる機器設定し、実験動物を固定し照射可能な器具を作製する。
- (2) 前立腺癌皮下移植モデルにおける HIFU 照射設定の検討として、in vivo で HIFU を用いた naked IL-12 DNA のマウス前立腺癌皮下移植腫瘍内導入を行い、照射時間と導入効率の相関関係を検討し、至適照射時間を決定する。その際、この皮下腫瘍に対し、Luciferase 発現ベクター (plasmid DNA) を HIFU を用いて導入し、luciferase 活性を in vivo 蛍光イメージングシステム (IVIS) をもちいて同一個体で経時的に測定することで、至適照



射時間、plasmid DNA 投与からの遺伝子が発現するまでの至適時間を決定する。

- (3) ヒトおよびマウス前立腺癌皮下移植モデルにおける HIFU を用いた IL-12 遺伝子導入と組織障害性について、従来のアデノウイルスベクターを用いた導入との比較において、組織学的検討と血清中 IL-12 値の定量により明らかにする。
- (4) luciferase 導入前立腺癌細胞を皮下移植し、同一個体での HIFU もしくは、ウ

イルスベクターIL-12 遺伝子導入による抗腫瘍効果の比較をIVISによる経時的腫瘍増殖の観察、転移巣の検索などから腫瘍増殖抑制効果、転移抑制効果を明らかにする。



4. 研究成果

(1) 高密度焦点超音波 (HIFU) による遺伝子導入効率と組織障害について検討した。

① 実験動物を固定し照射可能な器具 (微動台) を作製した。マウス用のマウスピースを作成し、全工程を全身麻酔下でおこなった。

② 高密度焦点超音波 (HIFU) による遺伝子導入をおこなうために照射時間、照射間隔、出力エネルギーの至適条件を確保できる機器

(Sonablate-200) を設定した。まず、ヒト前立腺癌皮下移植モデルにおけるHIFU照射設定の検討として、Luciferase発現ベクター (naked plasmid DNA ; 以後plucと表記) をヒト前立腺癌によるヌードマウス皮下移植腫瘍内導入を行い、照射時間、出力エネルギーと導入効率の相関関係を検討した。その際、この皮下腫瘍に対しHIFU照射後、Luciferase発現ベクターを静脈注射または腫瘍内注射し、Luciferase活性をin vivo 蛍光イメージングシステム (IVIS) をもちいて同一個体で経時的に測定した。腫瘍内注射し

た群では、50 μ gのplucを投与することでluciferaseの発現がIVISにて確認され、HIFUを照射することにより一部増強された。また、照射時間を0.1秒、出力エネルギーを20Wにすることにより、組織障害を来たさず、最も効率よく導入することが可能であった。続いて、同様の設定にて400 μ gのplucを尾静脈より注射し、IVISで経時的に観察したところ72時間後にHIFUを照射した腫瘍のみでluciferaseの発現を認め、その発現は7日後まで観察しえた。

以上より、HIFUはプラスミドDNAのみで遺伝子導入を可能にし、また経静脈的投与でも選択的に遺伝導入しうる独創的なベクターフリー癌遺伝子療法の開発基盤となるうるものと考えられる。

(2) ヒトおよびマウス前立腺癌皮下移植モデルにおけるHIFUまたはアデノウイルスベクターを用いたIL-12遺伝子導入 (局所投与系) を比較検討した。

マウス前立腺にヒト前立腺癌細胞 (PC-3、LNCap) またはマウス前立腺癌細胞 (RM-9, 178-2BMA) を皮下移植したのち、naked IL-12 DNA, GFP標識DNAおよびコントロールを腫瘍内に直接投与し、先に設定した条件でHIFUを用いた遺伝子導入と、アデノウイルスベクターを用いたIL-12遺伝子導入をおこない遺伝子導入と組織障害性について、組織学的検討、蛍光顕微鏡下での観察とELISA法による血清中IL-12値の定量によるIL-12産生能の比較検討をおこなった。これにより、ベクターフリーのIL12遺伝子治療の基盤的背景が得られたと考えられる。

(3) HIFU施行後にプラスミドDNAを経静脈的投与することにより特定の遺伝子の

腫瘍内への導入が可能となったことを受けて、実際に新規遺伝子治療の候補である癌治療遺伝子REICを用いたHIFU併用治療実験を行うための準備を行った。具体的には、REIC遺伝子を高発現するpShuttleプラスミドベクターのコンストラクトに成功した。加えて、HIFU併用のREIC遺伝子治療の効果の陽性コントロールとするために、アデノウイルスベクター (Ad-REIC) 局所投与による、前立腺癌 (PC-3) 皮下移植モデルの治療実験系を確立させた。これにより、新規遺伝子治療をベクターフリーでおこなうための臨床前試験をおこなうことが出来る体制を確立できた。

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 11 件)

- ① Huang P, Kaku H, Chen J, Kashiwakura Y, Saika T, Nasu Y, Urata Y, Fujiwara T, Watanabe M, Kumon H. Potent antitumor effects of combined therapy with a telomerase-specific, replication-competent adenovirus (OBP-301) and IL-2 in a mouse model of renal cell carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 2010 Feb 19.
- ② Chen J, Huang P, Kaku H, Zhang K, Watanabe M, Saika T, Nasu Y, Kumon H. A comparison of proteomic profiles changes during 17beta-estradiol treatment in human prostate cancer PC-3 cell line. *Cancer Genomics Proteomics.* 2009 ; 6:331-5.
- ③ Kobuke M, Saika T, Nakanishi Y, Ebara S, Manabe D, Uesugi T, Nose H, Arata R, Tsushima T, Nasu Y, Kumon H. Prospective longitudinal comparative study of health-related quality of life in patients treated with radical prostatectomy or permanent brachytherapy for prostate cancer. *Acta Med Okayama.* 2009;63(3):129-35.
- ④ Saika T, Kobayashi Y, Watanabe T, Manabe D, Ebara S, Uehara S, Nasu Y, Kumon H. Initial report of hybrid radical prostatectomy for prostate cancer: reduced bleeding, clear vision, and secure surgical margins. *Acta Med Okayama.* 2008;62(6):379-84.
- ⑤ Ishida T, Obata Y, Ohara N, Matsushita H, Sato S, Uenaka A, Saika T, Miyamura T, Chayama K, Nakamura Y, Wada H, Yamashita T, Morishima T, Old LJ, Nakayama E. Identification of the HERV-K gag antigen in prostate cancer by SEREX using autologous patient serum and its immunogenicity. *Cancer Immun.* 2008 ;8:15.
- ⑥ Ebara S, Katayama N, Tanimoto R, Edamura K, Nose H, Manabe D, Kobayashi T, Kobayashi Y, Kobuke M, Takemoto M, Saika T, Nasu Y, Kanazawa S, Kumon H. Iodine-125 seed implantation (permanent brachytherapy) for clinically localized prostate cancer. *Acta Med Okayama.* 2008;62(1):9-13.
- ⑦ Huang P, Watanabe M, Kaku H, Kashiwakura Y, Chen J, Saika T, Nasu Y, Fujiwara T, Urata Y, Kumon H. Direct and distant antitumor effects of a telomerase-selective oncolytic adenoviral agent, OBP-301, in a mouse prostate cancer model. *Cancer Gene Ther.* 2008;15(5):315-22.
- ⑧ Edamura K, Nasu Y, Takaishi M, Kobayashi T, Abarzua F, Sakaguchi M,

Kashiwakura Y, Ebara S, Saika T,
Watanabe M, Huh NH, Kumon H.
Adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene
transfer inhibits tumor growth and
metastasis in an orthotopic prostate
cancer model. *Cancer Gene Ther.*
2007;14(9):765-72.

- ⑨ Abarzua F, Sakaguchi M, Tanimoto R,
Sonogawa H, Li DW, Edamura K, Kobayashi
T, Watanabe M, Kashiwakura Y, Kaku H,
Saika T, Nakamura K, Nasu Y, Kumon H, Huh
NH. Heat shock proteins play a crucial
role in tumor-specific apoptosis by
REIC/Dkk-3. *Int J Mol Med.*
2007;20(1):37-43.

- ⑩ Uenaka A, Wada H, Isobe M, Saika T,
Tsuji K, Sato E, Sato S, Noguchi Y,
Kawabata R, Yasuda T, Doki Y, Kumon H,
Iwatsuki K, Shiku H, Monden M, Jungbluth
AA, Ritter G, Murphy R, Hoffman E, Old
LJ, Nakayama E. T cell immunomonitoring
and tumor responses in patients
immunized with a complex of
cholesterol-bearing hydrophobized
pullulan (CHP) and NY-ESO-1 protein.
Cancer Immun. 2007;7:9.

- ⑪ Nasu Y, Saika T, Ebara S, Kusaka N, Kaku
H, Abarzua F, Manabe D, Thompson TC,
Kumon H. Suicide gene therapy with
adenoviral delivery of HSV-tK gene for
patients with local recurrence of
prostate cancer after hormonal therapy.
Mol Ther. 2007;15(4):834-40.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

雑賀 隆史 (SAIKA TAKASHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准
教授

研究者番号：10314676

(2) 研究分担者

那須 保友 (NASU YASUTOMO)
岡山大学・岡山大学病院・教授
研究者番号：20237572
小武家 誠 (KOBUKE MAKOTO)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：50452579
枝村 康平 (EDAMURA KOHEI)
岡山大学・岡山大学病院・医員
研究者番号：90535816

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

江原 伸 (EBARA SHIN)
岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：70379741