

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20390478

研究課題名（和文） おとり遺伝子を用いた腫瘍血管新生抑制による純国産型遺伝子治療法の開発

研究課題名（英文） THE ESTABLISHMENT OF JAPAN-ORIGINAL GENE THERAPY BY ANTI-TUMOR ANGIOGENESIS USING DECOY GENE.

研究代表者

石橋 浩晃 (ISHIBASHI HIROAKI)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：90254630

研究成果の概要（和文）：血管新生抑制を介した癌の増殖制御を目的とし、おとり遺伝子治療法の効果についての基礎的研究を行った。強力な血管新生因子である VEGF は TNF α により転写因子 Sp1 を介して発現が誘導される。そこで TNF α で活性化する Sp1 をおとり遺伝子治療法の標的とし以下の検討を行った。【おとり遺伝子の合成】おとり遺伝子、すなわち Sp1 が認識する塩基配列（7 塩基）と、その上下流のダミー配列 8-10 塩基により設計した二本鎖合成オリゴヌクレオチドを調製した。【HVJ-リポソームによる導入法の確立】おとり遺伝子導入には HVJ-リポソーム法を用いた。すなわち、リン脂質とコレステロールによりおとり遺伝子を封入した陰イオン帯電リポソームを調製し HVJ と融合させ、おとり遺伝子含有 HVJ-リポソームの調製法を確立した。さらに、培養癌細胞への様々な導入条件を検討し、常時 90% 以上の導入効率を示す導入条件を決定した。【おとり遺伝子導入の効果】おとり遺伝子を HVJ-リポソームにより培養癌細胞に導入すると、TNF α による VEGF の mRNA および蛋白発現とも約 40%-50% まで抑制した。さらに、TGF β や Tissue factor などの血管新生に関与する因子も同様に抑制された。また、おとり遺伝子の導入はこれらの血管新生因子の発現のみでなく、培養癌細胞の浸潤能や増殖能の抑制効果も認められた。以上の結果より Sp1 を標的とした、おとり遺伝子治療法は複数の血管新生因子発現を同時に抑制するのみでなく、癌細胞の浸潤・増殖も制御することが証明され、新規の癌遺伝子治療法として応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The conditioned media (CM) harvested from human pulmonary squamous cell carcinoma (QG56), pulmonary small cell carcinoma (QG90) and gastric adenocarcinoma (MKN28) cultivated under hypoxic conditions (3%O₂), enhanced the angiogenic activity in vitro more than those obtained under normoxic cultivation (20% O₂). The total length of the tube structures formed by bovine capillary endothelial cells (BCEs) in the CM cultured at 3%O₂ was about 1.5 (QG56 and MKN28) or 1.9 (QG90) times longer than that at 20% O₂. Tube formation was diminished by the preincubation of CM with anti-basic fibroblast growth factor (bFGF) IgG. After performing the fractionations of the CM and the crude extracts of cell lysates cultured using a heparin-Sepharose column, the mitogenic activity in the CM from all cancer cells at 3%O₂ was about 2 times higher than that in the CM at 20%O₂, while it decreased in the cell lysates at 3% O₂ to about 40% of those at 20%O₂. This mitogenic activity of BCEs in the CM from all cancer cells was almost totally suppressed by anti-basic fibroblast growth factor (bFGF) IgG, but not with anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) IgG. These results suggest that the hypoxic condition is an important cause for tumor angiogenesis by bFGF or bFGF-like molecule(s) derived from tumor cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2011 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
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：歯学 ・ 病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：実験腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

腫瘍の増殖に必須とされる血管新生は腫瘍細胞から産生される血管新生因子が周囲組織の血管を活性化することで開始され、多段階の血管新生過程により達成される。近年、腫瘍細胞の血管新生因子発現の誘導にサイトカインや微小環境の変化が関与しているという報告が蓄積され、申請者も腫瘍壊死因子 α (TNF α) や癌細胞の低酸素環境が強く関与していることを報告してきた。これらの報告から血管新生を制御すると、癌の増殖を抑制できるという知見が集積され、血管新生因子の抑制は新しい癌治療の標的として注目、応用され始めている。しかし現在、臨床応用にむけて開発中の血管新生因子抑制法はアンチセンスの導入、可溶性受容体の強制発現あるいは中和抗体の投与などが主流であり、これらの方法は臨床応用にむけて安全性が確立されないまま欧米諸国が研究を先導しているのが現状である。そこで、本研究において、極めて安全な純国産型ウイルスベクターを用いて、癌細胞におとり遺伝子を導入し、複数の血管新生因子群を同時に抑制するという全く新しい概念に基づく、本邦独自の純国産型といえる新規癌遺伝子治療法の開発が必要とされていた。

2. 研究の目的

申請者は研究開始時期までに強力な血管新生因子である血管内皮増殖因子 (VEGF) などが、TNF α により癌細胞内で転写因子Sp1を介して産生されることを報告してきた。すなわち、TNF α により活性化したSp1は癌細胞核内に移行し、これらの血管新生因子群のDNAプロモーター領域に存在するSp1の認識部位に結合しDNAの翻訳が開始される。そこで、本研究は新規の概念に基づいて、おとり遺伝子の導入により、Sp1のプロモーター領域への結合を阻害し、複数の血管新生因子群を同時に抑制する可能性を追求することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 確立した実験的腫瘍に対する、HVJ-リポソーム法を用いたおとり遺伝子導入条件を応用し、その抗腫瘍効果を検索した。抗腫瘍効果の検証はヌードマウスの舌に移植して作成した腫瘍組織におとり遺伝子を導入し検索した。
 (2) 実験的腫瘍において活性化している転写因子の検索と、おとり遺伝子導入による標的転写因子の抑制効果の検討。申請者は培養口腔扁平上皮癌細胞の血管新生機構を制御している転写因子として、Sp1やHIF-1の重要性を報告してきた。すなわち、SAS細胞やTF細胞をNFで刺激すると、刺激直後よりSp1の活性化を認め、検索した30分間は継続した。この癌細

胞におけるSp1活性がVEGFやTGF β 1, PDGF, 組織因子(TF)などの血管新生因子群の発現誘導に関与している可能性が高いと思われた。

さらに, Sp1はuPAなどの基質破壊酵素の発現にも関与しているとされており, Sp1抑制は血管新生抑制だけでなく, 基質破壊も制御し癌の浸潤を抑制できる可能性があると思われた。そこで, 当該年度は動物モデルにおける実験的腫瘍においても, Sp1の活性化がみられるか検証するとともに, Sp1を標的としたおとり遺伝子を遺伝子導入し, Sp1の転写活性の抑制効果についてバンドシフトアッセイにより検証した。

(3) 動物モデルに作成した実験的腫瘍において, おとり遺伝子導入により抑制される血管新生因子群の検索。申請者らの当初の研究成果により, Sp1を標的としたおとり遺伝子は培養癌細胞においてVEGF, TGF- β 1, PDGF, TFなどの強力な血管新生因子群を同時にかつ効果的に抑制できることが示した。さらに, Sp1に対するおとり遺伝子導入は, これらの血管新生因子群のみでなく, uPAなどの癌の浸潤に関わる基質破壊酵素を同時に抑制できることを検証した。そこで, これらの培養系におけるおとり遺伝子の導入効果が, そのまま動物モデルにおける実験的腫瘍に対する効果としても反映できるのかを検索した。

(4) 培養口腔癌細胞を用いて, Sp1以外の転写因子群 (AP-1, NF-kB, Ets-1, HIF-1) について検討した。その結果, 培養癌細胞においても多彩な転写因子が活性化しており, その中でも転写因子AP-1はEGF共存下や低酸素環境により, VEGFやuPA, uPARの発現誘導に関与していた。そこで, 動物モデルにおける実験的腫瘍においてもSp1を標的としたおとり遺伝子導入がやはり有効なのか, あるいはAP-1など, 他の転写因子に対するおとり遺伝子の抑制効果も期待できるのかを検討した。さらに標的転

写因子を単一にして検証してきたが, 例えばSp1とAP-1に対するおとり遺伝子のカクテル導入の抑制効果についての比較検討を行った。(5)HVJ-リボソーム法によるおとり遺伝子治療戦略の臨床応用にむけて, 副作用や臓器障害などの観察, およびその対策に関する知見を集積し, 臨床応用への最終準備段階とした。本戦略による遺伝子治療に関する副作用の観察は, 副作用発現の有無, 重篤度, 対策法に関する検討を行った。

(6)HVJ-リボソーム法に関する副作用の観察。HVJ-リボソーム法による遺伝子導入法に用いるHVJ (センダイウイルス) は, 生物界においてウシにおいての赤血球の凝集作用のみを示すとされている。従って, 現在までの報告ではヒトに対する病理作用や病原性はないと思われる。しかも, HVJ-リボソーム法に应用するHVJはその調整段階で紫外線を照射してゲノムRNAを断片化させて失活させ, ウイルスとしての遺伝子活性を消滅させて使用する。右図に示すように, UV照射前紫外線を照射する前のHVJと, 照射後のHVJの電子顕微鏡所見を比較すると, 照射前のHVJはウイルス外套蛋白内に正常なゲノムRNAを観察することができるが, 紫外線照射するとRNAが断片化されて変性し, ウイルスの生理活性を失っていることが示唆された。しかも, HVJ-リボソーム法ではHVJの外套蛋白が示す膜融合能により, 高い遺伝子導入効率を示す方法であり, 電子顕微鏡所見により紫外線照射によってもウイルス外套蛋白が明らかな形態的変性を示しておらず, 極めて良好に保存されていることが観察され, 外套蛋白の融合能が十分に保存, 維持されていると思われた。

(7) 臨床応用に際して予想しえない有害事象を含めた副作用が皆無であるという検証は, 新規治療法の開発に関して至上命題とされる。そこで, 以下の実験により副作用発現の有無,

あるいは有害事象が発生や、その重篤度、対策について検証した。すなわち実験的腫瘍に対してHVJ-リポソーム法により遺伝子導入したマウスを使用して、肉眼的変化、解剖学的所見および組織学的所見にて、副作用有無について解明した。さらに、おとり遺伝子を封入しない、すなわちempty HVJ-リポソームを投与したマウスについて同様の手法により、その変化を観察した。臨床応用に際して最も重要な命題でもあるこれらの副作用発現の有無について、ヌードマウスやSCIDマウス、あるいはさらに大型の動物におとり遺伝子を導入して、成長発育の異変、全身諸臓器の変化について詳細に観察する。また、副作用と思われる変化が出現すれば、既存の薬剤や副作用対策の効果を検索する。本研究はおとり遺伝子治療を臨床応用に展開するための最終準備過程となった。

4. 研究成果

(1) 動物モデルによる実験的腫瘍の作成と遺伝子導入法の確立. ヌードマウスに実験的腫瘍を形成し、遺伝子導入の検索に使用したルシフェラーゼ発現プラスミドあるいは FITC 標識した合成オリゴヌクレオチドを HVJ-リポソーム法により遺伝子導入した。その後、腫瘍組織を摘出しルシフェラーゼ活性や組織学的検索により、以下に記載する事項を中心に、最良の導入効率となる至適遺伝子導入条件を確立した。

①導入間隔：活性が最大となる遺伝子導入間隔を決定した。

②導入部位：実験的腫瘍のどの部位に遺伝子導入するのか確定した。

③導入量（力価）：，培養細胞への遺伝子導入条件を基礎的資料として、動物モデルへの遺伝子導入に関わる至適力価を確立した。

(2) おとり遺伝子戦略アンチセンス導入による抗腫瘍効果の比較検討. 癌の血管新生抑制

の標的として最も期待されているのが VEGF であるが HVJ-リポソーム法により VEGF の開始コドンを含むアンチセンスを導入した腫瘍と、おとり遺伝子を導入した腫瘍における増殖能を抑制することを検証した。

(3) 実験的腫瘍において活性化している転写因子の検索と、おとり遺伝子導入による標的転写因子の抑制効果の検討：動物モデルにおける実験的腫瘍において、Sp1 が強く活性化していることを解明した。

(4) Sp1を標的としたおとり遺伝子は、培養口腔扁平上皮癌細胞においてVEGF, TGF- β 1, PDGF, TFなどの強力な血管新生因子群を、同時にかつ効果的に抑制した。また、Sp1に対するおとり遺伝子の導入は、実験的腫瘍の増殖を40%まで抑制し、腫瘍組織VEGF, TGF- β 1, PDGF, TFなどの血管新生因子群の発現が強く阻害されていることを解明した。腫瘍組織への遺伝子導入、すなわちin vivoでの至適導入条件を確立することが必須である。そこで、ヌードマウスに実験的腫瘍を作成すると同時に、腫瘍組織にける至適導入条件を確立した。

(5) 副作用の観察. HVJ-リポソームを用いた遺伝子導入ではHVJ（センダイウイルス）をベクターとした。HVJ は、ヒトに対する病原性は全く報告されていない。さらに、本法では遺伝子導入前にHVJに紫外線を照射しゲノムRNAを断片化させ、ウイルスとしての生理活性を完全に消滅させて用いる。従って、既知の知見ではHVJ-リポソーム法は極めて安全なウイルスベクターによる遺伝子導入といえる。しかし、臨床応用にむけて副作用が皆無であることや予想しえない副作用について動物実験により検討した。

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)

- 1) Kanno T, Ishibashi H, Sukegawa S, Tsunematsu K, Nakamura S, Mano S, Sekine J, Furuki Y. A pediatric case of unicystic ameloblastoma treated with conservative surgery leading to eruption of the impacted permanent teeth. Hospital Dentistry and Oral-Maxillofacial Surgery. 23(2):129-132, 2011.
- 2) Matsuura M, Onimaru M, Yonemitsu Y, Suzuki H, Nakano T, Ishibashi H, Shirasuna K, Sueishi K: Autocrine loop between vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF receptor-3 positively regulates tumor-associated lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma cells. Am J Pathology 174:361-368, 2009.
- 3) Kondo S, Ishibashi H, Nariai Y, Kato T, Enomoto Y, Karino M, Sekine J: Management of tongue squamous cell carcinoma in pregnant women: Report of two Patients. Asian J Oral Maxillofac Surg 21:129-132, 2009

[学会発表] (計1件)

- 1) Ishibashi H, Koike H, Hideshima K, Karino M, Tunematsu K, Sekine J. 「Novel gene therapy」 Newly regulation strategy against tumor angiogenesis and chemosensitivity using decoy system. 4th Internatinal Conference of Advanced Digital Technology in Head and Neck reconstruction, Freiburg, 2011. 5. 5

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.shimane-u.ac.jp/oral/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 浩晃 (ISHIBASHI HIROAKI)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号: 90254630

(2) 研究分担者

関根 浄治 (SEKINE JOJI)

島根大学・医学部・教授

研究者番号: 20236095

成相 義樹 (NARIAI YOSHIKI)

島根大学・医学部・講師

研究者番号: 60333465

近藤 誠二 (KONNDOU SEIJI)

島根大学・医学部・講師

研究者番号: 10432634

(2008~2010)

(3) 連携研究者

なし