

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791456

研究課題名(和文) IFN と放射線治療効果増強に向けた BID 分子標的療法の検討

研究課題名(英文) Assessment of immune-activated BID gene-radiation combined modality therapy

研究代表者

津野 隆哉 (TSUNO, Takaya)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：60598259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍に対する新たな治療法として、我々は IFN- α による細胞質内 BID を介するミトコンドリアアポトーシスに着目し、*in vitro* にてその有用性を示した (Tsuno T, et al, 2012)。本研究では、IFN- α /放射線治療抵抗性ヒト肺癌細胞株皮下接種マウスを用いて、IFN- α 賦活化 BID 遺伝子/放射線集学的療法を *in vivo* で評価した。その結果、同集学的治療群にて腫瘍体積の増大抑制を認めた。また同群では、免疫組織染色法にて BID 蛋白の核内局在率の減少を認め、更に電子顕微鏡所見としてミトコンドリアアポトーシスを認めた。このように *in vivo* でも同集学的療法の有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：To overcome difficulties in cancer therapy, we have reported an *in vitro* study that interferon (IFN)- α induces mitochondrial apoptosis mediated by BH3-interacting domain death agonist (BID) in A549 human lung epithelial carcinoma cells resistant to both IFN- α and irradiation (Tsuno T, et al, 2012). Here, we further assessed *in vivo* antitumor effects of IFN- α -activated BID gene therapy combined with radiation therapy. In BID gene transfected A549 xenografts inoculated subcutaneously into nude mice, IFN- α injection followed by irradiation remarkably inhibited tumor growth. Immunohistochemistry revealed that the combined therapy led to dramatic reduction in BID protein in the nuclei of tumor cells. Electron micrographs disclosed mitochondrial apoptosis induced by the combined therapy. Thus, the combined modality therapy exhibited notable antitumor effects, suggesting that it may be promising to treat malignant tumors even resistant to both IFN- α and irradiation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：BID アポトーシス 分子標的療法 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

- (1) 悪性腫瘍に対する伝統的治療法としては、外科的療法、化学療法、放射線療法が主要なものである。しかし、国内は勿論、国外においても満足される治療予後は得られていない。この現状を打破する新たなストラテジーの確立が急務であり、その一つとして分子標的療法または遺伝子治療が挙げられる。その標的として我々は、生体内で腫瘍化した細胞がアポトーシスによるプログラム死により排除されることに注目した。
- (2) 現在、抗腫瘍効果を示し、悪性黒色腫や慢性骨髄性白血病に対して臨床応用されている薬剤の一つとして、インターフェロン (IFN)- α がある。IFN- α は抗ウイルス作用がよく知られているが、アポトーシスも誘導する。だが、その鍵分子については明確には同定されていない。これを同定することで、IFN- α の抗腫瘍効果が増強され得るだけでなく、臨床投与量減量による副作用軽減の可能性も期待できる。また、IFN- α だけでなく、アポトーシスを誘導する他の薬剤の抗腫瘍効果をも増強し得る可能性が示唆される。そこで我々は、ヒト腫瘍細胞株を用いて先ず *in vitro* study を行った結果、IFN- α によるアポトーシス誘導には cell death receptor pathways の下流の一つであるミトコンドリア経路に介入する BH3 interacting domain death agonist (BID) が鍵分子であることを提案した (Tsuno, et al. 2012)。更に、BID を分子標的とし、その過剰発現による IFN- α の抗腫瘍効果増強誘導については明確には報告されておらず、我々は IFN- α 及び放射線治療抵抗性を示す A549 ヒト肺癌細胞株を用いて、BID 遺伝子治療による IFN- α の抗腫瘍効果増強誘導についても報告した (Tsuno, et al. 2012)。また、薬剤によるアポトーシス誘導の他に、放射線治療によるアポトーシス誘導もミトコンドリア経路を介する可能性が示唆されているが、BID 過剰発現が関与する放射線感受性増強誘導についても明らかにされていない。

2. 研究の目的

上述の *in vitro* study 成果を踏まえ、本研究は、ヒト腫瘍細胞を移植したマウスに対してヒト BID 遺伝子 vector 投与により BID 蛋白を過剰発現後、IFN- α と放射線治療による腫瘍細胞死の誘導及び増強効果を評価し、BID の分子標的療法/遺伝子治療としての有用性を検討す

ることを主目的とした。

- (1) Vector は、virus vector より安全性の高い plasmid vector を用いた。
- (2) しかし plasmid vector は遺伝子導入効率が低いとされている。更にそれを生体内に静脈内投与することでも安定性は低くなるとされている。しかし本研究では、臨床的に簡便且つ汎用性の高い静脈内投与を選択し、それにより plasmid vector 遺伝子を導入した結果としての抗腫瘍効果を評価した。
- (3) IFN- α については、通常の静脈内投与型 IFN- α より作用時間が長く、低用量且つ 1 回/週の低頻度皮下投与法に於いて、現在 C 型肝炎治療のみに認可されている pegylated (PEG)-IFN- α を使用した。その理由として、PEG-IFN- α の drug remodeling (本研究の場合、悪性腫瘍治療への応用)としての評価と、簡便且つ副作用軽減、並びに高コンプライアンスが期待できるからである。

3. 研究の方法

IFN- α 及び放射線治療抵抗性 A549 ヒト肺癌細胞株皮下接種ヌードマウスを用いて、IFN- α 賦活化 BID 遺伝子/放射線集学的療法について、*in vivo* study で評価した。

- (1) ICR ヌードマウス皮下に A549 細胞株を移植した。
- (2) Mock (empty pIRES vector)+PBS 群、mock+IFN- α 群、pIRES-hBID+PBS 群、pIRES-hBID+IFN- α 群、pIRES-hBID+IFN- α +放射線治療群に分類 (n=6/群) し、Day 0/7/14/21 に必要な群に上記 vectors を静脈注射、及び PEG-IFN- α を皮下注射し、Day 1/8/15/22 に放射線治療 (3Gy x4) を施行した。
- (3) 体重、腫瘍体積を測定し、腫瘍体積に関しては統計学的手法に基づき評価した。Day 56 にマウスを sacrifice し、皮下腫瘍、脳、心臓、肺、肝、脾、腎を摘出した。皮下腫瘍組織標本を作成し、抗ヒト BID 抗体を用いた免疫組織染色法にて BID 蛋白の核内局在率を評価した。また、電子顕微鏡下でのアポトーシス評価を行った。このように、IFN- α 及び放射線治療による腫瘍細胞死の増強効果や、BID の分子標的療法/遺伝子治療としての有用性を検討した。

4. 研究成果

- (1) 上記各群において、マウス個体に明らかに異常な体重減少を指摘できな

かった。また、摘出した上記臓器に、上記治療に起因すると考えられる明らかな肉眼的異常所見を指摘できなかった。

- (2) 腫瘍体積において、pIRES-hBID(BID)+IFN- α (IFN)+放射線治療(Rad)群で著明な増殖抑制効果を認めた(図 1-1, 1-2)。

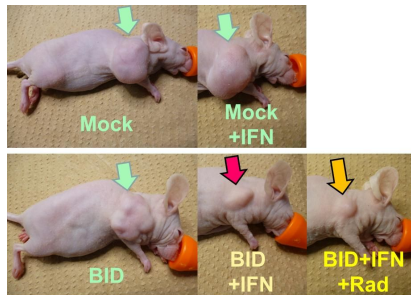


図 1-1. 皮下腫瘍イメージ (Day 56)

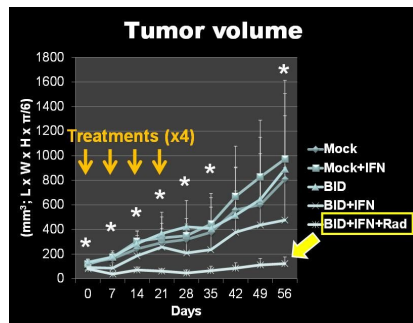


図 1-2. 皮下腫瘍増殖グラフ (*Statistically significant at Analysis Of Variance of <0.05)

- (3) 抗ヒト BID 抗体を用いた免疫組織染色法による皮下腫瘍組織内細胞カウントにて、BID 遺伝子導入後の IFN- α 療法または IFN- α /放射線併用療法により、BID 蛋白の核内局在率の顕著な減少が認められた(図 2)。この結果より、上記治療による BID 蛋白の核内からの移動をもって、それらの治療効果が発現されている可能性が示唆された。

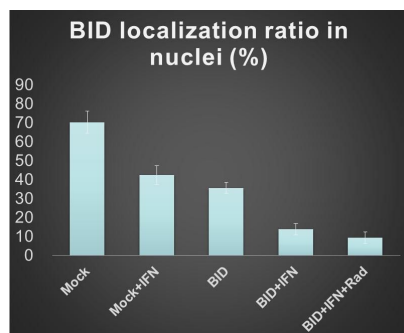


図 2. BID 蛋白の核内局在率グラフ (Day 56)

- (4) 電子顕微鏡所見にて、BID 遺伝子導入後の IFN- α 療法または IFN- α /放射線併用療法により、ミトコンドリアの小胞性変化や膨化を認め、顕著なミトコンドリア経路アポトーシスの誘導が示唆された(図 3)。

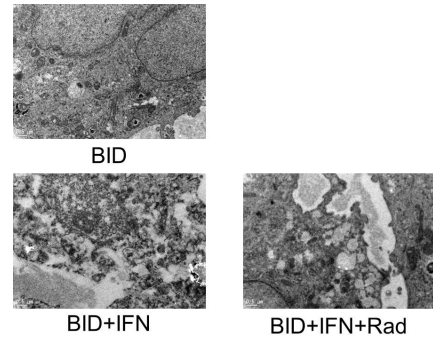


図 3. 電子顕微鏡イメージ (皮下腫瘍、Day 56、10,000 倍拡大)

- (5) 以上のように我々は、IFN- α 及び放射線治療抵抗性ヒト肺癌細胞株を用いて、BID が IFN- α におけるミトコンドリア経路アポトーシス誘導の重要分子であることを、in vivo study でも証明した。更に、その抗腫瘍効果が放射線併用療法により増強され得ることを示した。これらの結果から、IFN- α 賦活化 BID 遺伝子/放射線集学的療法の in vivo に於ける有用性が示唆された。
- (6) また、plasmid vector による静脈内 BID 遺伝子導入、並びに低用量且つ低頻度の PEG-IFN- α 皮下投与で上記結果を得られたことは、PEG-IFN- α の drug remodeling (悪性腫瘍治療への応用)としての可能性が示唆された。更に、臨床応用を考える上で、安全且つ簡便な投与方法であることに加え、その結果として高コンプライアンスをもたらす可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文](計 2 件)

- (1) BID is a critical factor controlling cell viability regulated by IFN- α . Tsuno T, Mejido J, Zhao T, Phillips T, Myers TG, Bekisz J, Zoon KC. J Immunother, 査読有, 35, 23-31, 2012. doi: 10.1097/CJI.0b013e3182372dcf.
- (2) A novel role for IFN-stimulated gene factor 3II in IFN- γ signaling and induction of antiviral activity in human cells. Morrow AN, Schmeisser H, Tsuno T, Zoon KC. J Immunol, 査読

有, 186, 1685-1693, 2011. doi:
10.4049/jimmunol.1001359.

(3) 連携研究者
該当なし

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) 津野 隆哉、BH3 INTERACTING DOMAIN DEATH AGONIST GENE THERAPY ENHANCES ANTITUMOR EFFECT OF INTERFERON-ALPHA. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 5 日、神戸ポートピアアイランド(神戸市)
- (2) Takaya Tsuno, BH3 INTERACTING DOMAIN DEATH AGONIST GENE THERAPY ENHANCES ANTITUMOR EFFECT OF INTERFERON-ALPHA. Cytokines 2013, 2013 年 10 月 2 日、Hyatt Regency San Francisco (San Francisco, CA, USA)
- (3) 津野 隆哉、What is a critical factor controlling cell viability regulated by IFN- α ? 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、パシフィコ横浜(横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津野 隆哉 (TSUNO, Takaya)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：60598259

(2) 研究分担者

該当なし