

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593012

研究課題名(和文) De11による遺伝子治療のプロトールの完成

研究課題名(英文) The completion of protocol for gene therapy by De11

研究代表者

北野 尚孝 (KITANO, Hisataka)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：50424726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヌードマウスにSCCKN細胞やA431細胞の移植腫瘍を作り、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。また、直接腫瘍に注射投与するのではなく皮下注射にて治療を行い、E3C1治療群での治療効果を確認した。今後は、E3C1群の腫瘍は腫瘍組織で出血性壊死を起こしていたので、その機序を解明する研究を行っていく。

研究成果の概要(英文)：A nude mouse was injected an oral squamous cell carcinoma cell line : SCCKN or a squamous cell carcinoma cell line : A431 at the subcutaneously back and made a transplant tumor. The transplant tumor was treated by the gene therapy of pE3C1 gene. The pE3C1 gene was injected every week. The all mice of control group were dead between 43th and 57th days. But, the survival days of mice with treated by pE3C1 were between 67th and 197th days. Additionally, effect of treated by pE3C1 was confirmed at subcutaneous injection. In the future, a mechanism of gene therapy by pE3C1 will be elucidated.

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

1. 研究開始当初の背景

現在行われている遺伝子治療の統計によれば、癌遺伝子治療に用いられるベクターの主流は、遺伝子導入効率の良いウイルスベクターである。しかし、安全性と経済性に優れた非ウイルスベクターの使用は見直されており増加傾向にある。そのため、その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。遺伝子導入率に難を抱える非ウイルスベクターの場合、細胞外から働く FasL のようなタンパクが向いていると思われる。

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 モチーフと C 末端側の二つのディスコイディンドメインから構成される細胞外基質タンパクである。二番目の EGF モチーフにはインテグリン結合ドメインの RGD 配列がある。In vitro の実験では、三番目の EGF モチーフはエンドサイトーシス亢進作用 (Kitano, et al. Mol Biotechnol., 2008, 39: 179-185) と弱い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 E3D1) と FasL の融合タンパクの遺伝子を治療に用いれば、融合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するばかりでなく、二回目以降の遺伝子導入率の向上も期待できる。さらにアポトーシス誘導能があがる可能性もある。

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、FasL と E3D1 の融合タンパク (FasL/E3D1) の使用は良好な結果をもたらした。FasL/E3D1 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、FasL、E3D1、FasL/E3D1 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。

治療開始一週間後の腫瘍サイズを比較すると、FasL/E3D1 群が最も小さくなっており、期待通りの腫瘍縮小効果を示した。次に長期予後について比較した。コントロールと FasL による治療を受けたマウスは 49 日目までに全て死亡した。その時点で、E3D1 群は 6 匹中 3 匹が、FasL/E3D1 群では 6 匹中 5 匹が生存していた。生き残ったマウスの内、E3D1 群の 2 匹と FasL/E3D1 群の 1 匹では腫瘍が完全に消失していた (未発表)。これは、Elojeimy 等が FasL 遺伝子をウイルスベクターに乗せて行ったマウス移植腫瘍の治療 (一回法) の成績を凌駕する結果である (Elojeimy S, et al. Mol Ther, 2007, 15, 1258-1263)。また、FasL から独立して、E3D1 が予後の改善に寄与していることを示している。

FasL と E3D1 は共に内因性のタンパクであり抗原性はないので、非ウイルスベクターの特徴を生かして繰り返し使用できる。強い細胞障害性を示すが、E3D1 の沈着作用のおかげで標的組織から漏れ出ることがなく、健常組織に移行しにくい。FasL と E3D1 を組み合わせた非ウイルスベクターによる遺伝子治療は実現性の高い方法と考えられる。

本研究では、E3D1 遺伝子がマウス移植腫瘍に対する遺伝子治療薬として安全かつ効果的に使用できることを示し、頭頸部扁平上皮癌に対する遺伝子治療のプロトコルを確立したい。

2. 研究の目的

Del1 タンパク由来のペプチド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、FasL 遺伝子による遺伝子治療の効果を劇的に改善することに成功した。本研究では、ヒトの癌に対する遺伝子治療への応用を目指し効果的なプロトコルを探り、副作用について検討する。

3. 研究の方法

(1)平成24年度:

平成22年度より行った in vivo におけるマウス移植腫瘍に対する E3D1 および FasL:E3D1 遺伝子を用いた研究で、7日に1回、腫瘍の大きさに因らず 10 µg/100 µl の濃度の遺伝子溶液を腫瘍に注射することにより良好な治療効果を得た。その結果を踏まえ本研究では、治療に最適な腫瘍体

積あたりのDNA量を決定する。またE3D1単独治療とFasL/E3D1による治療の優劣を決める。

- 1 がん細胞(口腔扁平上皮癌細胞:SCCKN、SCC-9、SCC-14a、B88、Nakata等)をヌードマウスの背部皮下に注射しマウスに移植腫瘍を作成する。
- 2 腫瘍サイズが50mm³に達した移植腫瘍に対してpE3D1およびpFasL/E3D1を用いて週に1回の遺伝子治療を行う。その際、遺伝子治療に使用する遺伝子溶液の濃度は腫瘍サイズが50mm³に対して10μg/100μl、50μg/500μlおよび100μg/mlとする。コントロールとしてmockベクターを同様に導入する。経時的に移植腫瘍の大きさを計測し、予後を評価する。pE3D1で遺伝子治療を行った群と、pFasL/E3D1で遺伝子治療を行った群およびmockベクターで遺伝子治療を行った群の腫瘍サイズにどのような違いがあるかを観察する。
- 3 肝障害、腎障害や骨髄抑制反応等を調べるために血液検査を行い検討する。
- 4 さらに、pE3D1で遺伝子治療を行った群、pFasL/E3D1で遺伝子治療を行った群、mockベクターで遺伝子治療を行った群の生存率をKaplan-Meierの生存曲線にて検討する。
- 5 この治療によって肉眼的に消失を認めめた場合は、それから4週間治療を継続し、その時点でも腫瘍を認めなければCRと判断し治療を中止する。
- 6 そして、マウスが死亡した際には脳、腎臓、肝臓、脾臓、肺および脊椎への遠隔臓器転移の有無をマウスの解剖やCT検査により検索する。
- 7 また、遺伝子治療中に副作用の発現の有無を常に観察し、副作用の発現率、発現内容や発現部位などを観察する。
- 8 本研究は平成22年度より行った研究の結果からもうかがえるように遺伝子治療による著しい延命効果を高い確率で認められる。そのため、平成24年度に計画している研究は平成25年度半ばぐらいまでずれ込む可能性が高いと思われる。

(2)平成25年度以降:

治療効果を上げるのに最適な治療回数について検討する。平成25年度以降は平成24年度に行った研究で最も適切であった遺伝子溶液の濃度で研究を行う。また、pE3D1かpFasL/E3D1のどちらか優れていた方を用いる。

- 1 平成24年度と同様にマウスに移植腫瘍を作成する。
- 2 腫瘍サイズが50mm³に達した移植腫瘍に対してpE3D1あるいはpFasL/E3D1を用いて14日に1回、7日に1回、4日に1回の遺伝子治療を行う。
- 3 以下、平成24年度と同様に検討する。

4. 研究成果

ヌードマウスの移植腫瘍に対してpE3C1の皮下注射により腫瘍を根治できる可能性が考えられた。

根治できなくとも腫瘍の増大速度を抑制し延命効果があることが確認された。

E3C1による遺伝子治療を行っても副作用を疑うような所見は何も得られなかった。

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 1件)

Hisataka Kitano, Atsushi Mamiya, Shinichiro Kokubun, Chiaki Hidai.; A Dcl1 fragment improves the efficiency of FasL gene therapy with a non-viral vector in a mouse explanted tumor model. Journal of Gene Medicine. 査読有, 14, 2012, 642-650. DOI: 10.1002/jgm.2682.

[学会発表](計 3件)

- 1 Hisataka Kitano. Clustering of lipid rafts is accelerated by active coagulation factor IX via exposure to phosphatidylserine at the adhesion complex. The American society for cell biology. 2014年12月6日~2014年12月10日. Philadelphia (USA).
- 2 北野尚孝. Coagulation factor IX regulates cell migration via cell membrane. 日本細胞生物学会. 2014年6月11日~2014年6月13日. 奈良県新公会堂(奈良県・奈良市).
- 3 Hisataka Kitano. Enrichment of

transgene products with a deposition domain from Del1 protein. SGCT 20th Anniversary Congress jointly organaised with the FSTCG. 2012年10月25日~2012年10月28日. Versailles (France).

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北野 尚孝 (KITANO, Hisataka)
日本大学・医学部・助教
研究者番号：50424726

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：