

2002年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－ 中国人研究者・医療技術者招聘助成－

2003年2月18日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

招聘責任者氏名 田川 雅 敏 印
 所属機関名 千葉県がんセンター 病理研究部
 職 名 部長
 所 在 地 〒260-8717 千葉県中央区仁戸名町66-1
 電話 043-264-5431 内線 5101

1. 招聘研究者氏名 单 保 恩
 所属機関 河北医科大学第四医院 科研中心 職名 教授

2. 研究テーマ サトカイ遺伝子, 自殺遺伝子を用いた癌に対する遺伝子治療

3. 日本滞在日程

2002年6月21日 来日

2002年6月22日より8月9日まで 千葉県がんセンター病理研究部にて研究

2002年8月10日 中国免疫学会が河北医大第四医院の主催で開催するため、
その準備に一時帰国

(2002年12月5日より9日まで、中国免疫学会第四回学術大会が開催)

2003年1月7日 再来日

2003年1月8日より2月15日まで 千葉県がんセンター病理研究部にて研究

2003年2月16日 帰国

4. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」の体裁に倣い、指定の用紙で作成し添付して下さい。

研究発表中または研究中の被招聘者のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表した場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※研究成果発表に当たっては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

サイトカイン遺伝子、自殺遺伝子を用いた癌に対する遺伝子治療

研究者氏名	単保恩
中国所属機関	河北医科大学第四医院科研中心
日本研究機関	千葉県がんセンター病理研究部
指導責任者	部長 田川雅敏
共同研究者	鵜飼伸一、余玲、永川博康

要旨

難治性腫瘍に対して現在有効な治療手段が少なく、その治療成績の向上は大きな課題の一つである。そこで本研究では、直接的な殺細胞効果を狙う治療戦略の一つとして、腫瘍融解性のアデノウイルスを用いて、腫瘍特異的な遺伝子発現に基づく新規遺伝子治療の基礎的開発と、新規サイトカイン interleukin(IL)-21 を用いて生体の防御反応を利用した抗腫瘍効果について検討した。細胞融解能を有するウイルスのうち、野性型のアデノウイルス（5型）は強力な融解能を保持しているため、このウイルスの初期応答遺伝子の一つである E1A 遺伝子を腫瘍においてのみ発現させれば、腫瘍特異的に細胞融解をおこす可能性のあるウイルスとなることが想定される。この腫瘍特異的発現のために、本研究では、正常組織においてはほとんど発現がなく、多くの消化器がん等で高発現をみるミッドカイン遺伝子のプロモーターを利用した。同プロモーターを E1A 遺伝子の直前に挿入した組換えアデノウイルスを作成し、その殺細胞効果をインビトロで検討した。その結果、このウイルスの正常細胞における殺細胞効果は比較的低かったが、ヒト肝がん細胞における効果は極めて高いものであった。また、本アデノウイルスの増殖も正常細胞より腫瘍細胞の方が亢進し、腫瘍を特異的に融解しうると考えられた。また、マウス由来の IL-21 遺伝子を単離し、レトロウイルスベクターを利用してマウス結腸がん細胞に IL-21 遺伝子を導入した。この遺伝子導入細胞を同系マウスの皮下に接種し、腫瘍増殖を検討したところ、遺伝子導入細胞は一度生着するものの、その後腫瘍は完全に消失することが判明した。以上の結果は、消化器がんを中心とする固形腫瘍に対して、腫瘍融解性アデノウイルスおよび IL-21 の腫瘍内遺伝子発現は、遺伝子治療として有用であることを示唆している。

Key Words 遺伝子治療、アデノウイルス、サイトカイン、IL-21

緒言：

肝がん、食道がんなどの消化器固形腫瘍は本邦ならびに中国においてその頻度が高く、その早期診断法、有効な治療法の確立にむけての努力は現在もなお必要である。近年のバイオサイエンスの進捗に基づく新規治療法の一つとしての遺伝子治療は、難治性腫瘍の治療成績の向上に大きく寄与する可能性があると考えられ、いくつかの治療法について米国を中心に臨床試験研究が現在実施されている。そこで本研究では、直接的な殺細胞効果を狙う将来の治療戦略の一つとして、腫瘍融解性アデノウイルス（1）を用いて、腫瘍特異的な遺伝子発現に基づく新規遺伝子治療の基礎的な抗腫瘍効果について検討することにした。野性型のアデノウイルス（5型）は強力な細胞融解能があり、感染細胞よりウイルスを放出させ最終的にこの細胞を死滅させることが可能である。このウイルスの初期応答遺伝子産物の一つである E1A 蛋白は、感染細胞における細胞周期の S 期への移行等をはじめ、感染性ウイルス産生過程の最初で直接的なスイッチを入れる働きをしている。従って、腫瘍においてのみ E1A 蛋白が発現させることができれば、腫瘍特異的な融解性アデノウイルスとなることが期待される。この腫瘍特異的発現のために、本研究では 604-bp のミッドカイン遺伝子のプロモーターを利用した（2、3）。ミッドカインは胎生期の中枢神経系等で発現を認める分泌蛋白で、その生物学的機能は未だ明確ではない。し

かし、この遺伝子は多くの消化器がん（大腸がん、肝がん、食道がん）等で高頻度かつ高発現が認められる特徴を有している（4、5）。一方、大人の正常組織では小脳歯状核、肺に弱く発現を認めるのみで、その発現様式の腫瘍特異性は極めて高い。またそのプロモーターの転写活性化能も SV40 のプロモーターや、既存の c-erbB-2 やアルファフェトプロテインのプロモーターよりもはるかに強力であることが明らかになっている。そこで、ミッドカインプロモーターを用いて E1A 遺伝子の発現を制御する組換えアデノウイルスを作成し、その抗腫瘍効果を検討することにした。

また難治性腫瘍のコントロールには、生体の免疫応答を利用した治療も重要である。この抗腫瘍効果の主体をなすのは、腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞である。最近一部の消化器腫瘍で腫瘍抗原ペプチドが同定され、免疫応答を利用したがん治療の可能性が示唆されている。しかし、腫瘍抗原ペプチドの同定には細胞傷害性 T 細胞株の樹立をはじめとする多くの手技が伴い、また主要組織適合抗原（MHC）拘束性によって、同定されたペプチドもその応用範囲が限定されることが想定される。一方抗腫瘍効果を担う細胞性免疫応答にはガンマインターフェロン、インターロイキン-2（IL-2）を分泌する Th1 タイプのヘルパー T 細胞の活性化が必須である（6）。また主にクラス I 抗原陰性の腫瘍等に対して傷害活性を有し広範な生体防御作用を司るナチュラルキラー細胞も、その重要性が再認識されている。そこで本研究では末梢の活性化ヘルパー T 細胞より分泌される新規サイトカイン遺伝子 IL-21 に着目し、その抗腫瘍活性を検討しようとした。IL-21 受容体は T、B 細胞およびナチュラルキラー細胞に限定され、末梢の活性化 T 細胞、さらにナチュラルキラー細胞の増殖に関与し、ナチュラルキラー細胞の殺細胞効果を増強することがインビトロの実験によって示されている（7）。そこでこの IL-21 遺伝子を腫瘍細胞に発現させ、腫瘍局所より分泌される IL-21 が、腫瘍周囲に集積する細胞傷害性 T 細胞やナチュラルキラー細胞を活性化し、最終的に生体の免疫応答を活性化しうかどうかを検討した。

対象と方法：

1) 組換えアデノウイルスの作成

ミッドカインプロモーターを Rodriguez の方法（8）にしたがって、アデノウイルスの塩基配列 522 番目の位置に挿入した。すなわち Microbix Biosystems 社の pXC.1 を用いて、522 番目に制限酵素部位 Age I を作成し、この部位に 604-bp のミッドカインプロモーター領域を組み入れた後、293 細胞に pBHGE3（Microbix Biosystems 社）と共に遺伝子導入した。生じたプラークよりアデノウイルスを回収し、293 細胞を用いてウイルスを増幅させた。

2) 細胞傷害性試験

96 穴プレートを用いて培養したヒト正常繊維芽細胞（HFF）とヒト肝がん細胞（HuH-7）に一定量のアデノウイルスを加えて、さらに 5 日間培養した。その後 WST 試薬（和光純薬）を加えて、2-3 時間培養し、450nm における吸光度を測定し、ウイルス非添加群を 100% とて算出した。

3) ノザンプロット解析

アデノウイルスを multiplicity of infection (moi)=20 の条件下で細胞に感染させ、48 時間後に感染細胞より RNA を Trizol を用いて抽出した。この RNA (20 µg) をフォルムアルデヒドを含むアガロースゲルにて電気泳動後、ナイロンフィルターに転写し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ で標識した E1A 遺伝子でハイブリダイズさせた。この時 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) プロンプを RNA の対照として使用した。またマウス大腸がん細胞 Colon 26、およびこの細胞に IL-21 遺伝子を導入した細胞等より RNA を抽出し、 ^{32}P で標識した IL-21 遺伝子でハイブリダイズさせた。この時 elongation factor 1- α (EF-1 α) プロンプを RNA の対照として使用した。

4) IL-21 遺伝子の単離とレトロウイルス発現ベクターの作成

マウス脾臓細胞由来の cDNA より逆転写酵素を利用した polymerase chain reaction 法にて IL-21 遺伝子を単離した。このときプライマーとして、5'-ATTAAAGCTTCTGGTGGCATGGAGAGGAC-3'

(5'primer) と 5'-TAGGATCCTGTGTTCTAGGAGAGATGCTG-3' (3'primer) を利用した。IL-21cDNA をレトロウイルスベクター LXSIN に連結させ、これをパッケージング細胞 Psi-2 (エコトロピック) さらに PA317 細胞 (アンフォトロピック) に遺伝子導入をおこない、培養上清中にレトロウイルスが分泌されていることをスロットブロット解析で確認した。

5) 遺伝子導入細胞の作成

PA317 細胞培養上清中に含まれるレトロウイルスをポリブレン (Aldrich 社) の存在下で Colon 26 細胞に感染させたのち、G418 (800 µg/ml, Gibco 社) 添加培養液で培養した。G418 薬剤耐性となった細胞をクローニングし、これを IL-21 遺伝子導入細胞として使用した。

6) 抗腫瘍効果の測定

細胞 (1×10^6 個) を BALB/c マウスの皮下に接種して腫瘍を形成させ、計時的に腫瘍体積を (腫瘍長径) $\times$ (腫瘍短径) $\div 2$ という式を用いて算出した。

結果：

1) 腫瘍融解性アデノウイルスの細胞傷害効果

ミッドカインプロモーターを挿入したアデノウイルス (Ad/MK) を用いて、ヒト正常繊維芽細胞

(HFF) とヒト肝がん細胞 (HuH-7) に対する細胞傷害活性を検討した (図 1)。その結果、Ad/MK を感染させた正常繊維芽細胞は高濃度のウイルスであっても比較的よく生存したのに対して、Ad/MK を感染させた肝がん細胞は低濃度のウイルスでも死滅する割合が高かった。この場合両者の IC_{50} の比較を行うと、Ad/MK は正常細胞に比較して、肝がん細胞に対しては約 1000 倍もの殺細胞効果があると考えられた。また他のヒト肝がん細胞を用いても Ad/MK に対する感受性は、HuH-7 細胞と同様に高かった。

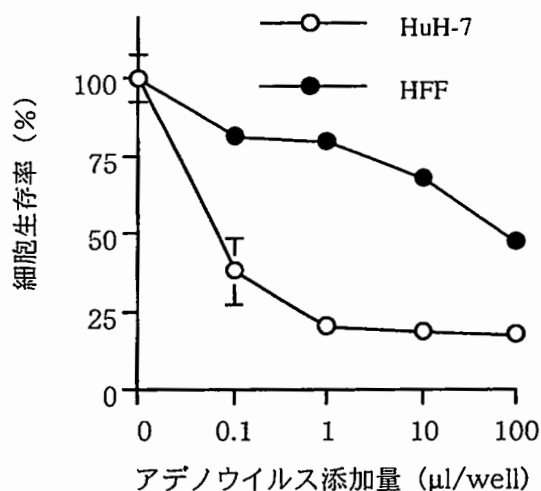


図 1：細胞傷害活性

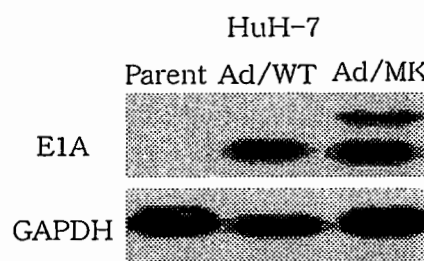


図 2：アデノウイルス感染細胞における遺伝子発現

2) 腫瘍融解性アデノウイルスの腫瘍細胞における増殖

野生型のアデノウイルス (Ad/WT) および Ad/MK を一定の moi で HuH-7 細胞の感染させた後、これらの細胞における E1A 遺伝子の発現を検討した (図 2)。その結果、E1A 発現は Ad/WT、Ad/MK 感染細胞とも大差がなく、非感染の親株 (Parent) では発現を認めなかった。同様に正常繊維芽細胞 HFF に Ad/MK を感染させた場合、E1A 遺伝子の発現はほとんど検出されなかった (data not shown)。Ad/MK を感染させた細胞の RNA では Ad/WT を感染させた場合に比較して、分子量の大きな E1A mRNA が検出されたが、mRNA サイズより判断するにこの転写産物は本来の E1A 転写開始点から始まり MK のゲノム領域を含むものと考えられた。

3) IL-21 遺伝子導入細胞における遺伝子発現

マウス大腸がん細胞 Colon 26 にレトロウイルスで IL-21 遺伝子を導入した細胞 (Colon 26/IL-21) を薬剤耐性マーカーを用いて作成した。この遺伝子導入細胞をクローニングし IL-21mRNA の発現が高い2つのクローンを単離した (IL-21#1 および IL-21#2) (図3、レトロウイルスベクターのみを導入した細胞を Vector として表記した)。

これらの IL-21 遺伝子導入細胞のインビトロにおける増殖は親株のそれと変わらず、また主要組織適合抗原 (H-2K および H-2D) の発現は親株と比較して大差がなかった (data not shown)。

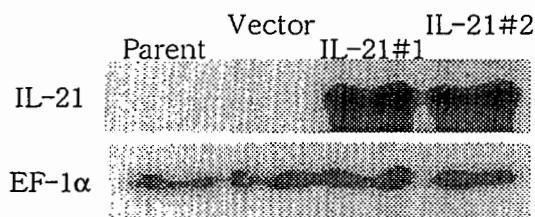


図3：遺伝子導入マウス大腸がん細胞におけるIL-21遺伝子の発現

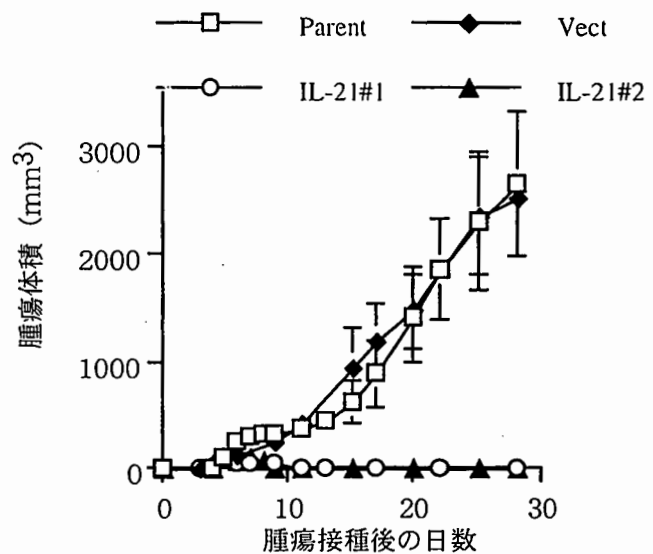


図4：IL-21遺伝子導入マウス大腸がん細胞の抗腫瘍効果

4) IL-21 遺伝子導入による抗腫瘍効果

親株、レトロウイルスベクター導入細胞、Colon 26/IL-21 細胞を同系マウスである BALB/c マウスの皮下に接種し、その腫瘍体積を計時的に測定した (図4)。その結果、ベクター導入細胞は腫瘍を形成し、その増殖は親株腫瘍の増殖と同じであった。しかし、Colon 26/IL-21 細胞は一旦腫瘍を形成するも、しだいに退縮を始め、その後2つのクローン由来の腫瘍とも完全に消失した。

考察：

腫瘍特異的発現に関与する転写調節領域をアデノウイルスの遺伝子発現に利用し、腫瘍融解性を持たせた例としては、本研究以外に前立腺がん特異的な PSA プロモーター (8)、肝がん特異的な alpha-fetoprotein プロモーター (9)、乳がん等で高い発現をみる MUC1 (10) の転写調節領域を用いたものがあり、いずれも目的の腫瘍を効率的に融解することが報告されている。ミッドカインが比較的広汎な腫瘍に高い発現を示すことから、同遺伝子のプロモーター領域を組み込んだアデノウイルスは多くの腫瘍で殺細胞効果を示すことが期待され、この点は今後ともさらなる解析が必要である。また、COX-2 (cyclooxygenase-2)、テロメラーゼ (telomerase) あるいはサバイビン (survivin) 遺伝子などの腫瘍特異性の高い遺伝子の転写領域を用いて、E1A 遺伝子の制御に加えて、第二の初期応答遺伝子である E1B 遺伝子の発現を制御する改変型腫瘍融解性アデノウイルスの抗腫瘍効果も、今後検討すべき課題である。従来より遺伝子導入用とした使用されてきたアデノウイルスは E3 領域の欠損株であった。今回、腫瘍融解性の観点から E3 領域の有無と抗腫瘍効果を検討したところ、多くの細胞株の場合、E3 領域を含み野生型に近いアデノウイルスの方が、強い抗腫瘍効果を示した (data not shown)。

この実験結果は Yu らの報告と一致している（11）。本治療法の安全性であるが、投与されたアデノウイルスは、最終的に生体の免疫応答によって排除されるため、持続的なウイルス血症を起すことはないことが知られている。したがって局所投与においては、比較的安全に使用可能で、かつ有効な抗腫瘍効果が惹起されると考えられる。本研究とほぼ同様な構築によるアデノウイルスによる臨床試験は、米国の Calydon 社（現 Cell Genesys 社）が前立腺癌に対して、PSA プロモーターを使用して実施しており、これまでのところ該当ウイルスは安全性が高いことを報告している（12）。アデノウイルスは凍結等で保存が容易であり、化学療法や放射線療法との併用も可能で、内視鏡下、エコーガイド下投与という臨床応用への道が開かれる可能性を秘めていると考えられる。

本研究の第二の目的は新規サイトカイン IL-21 の抗腫瘍効果であり、腫瘍細胞より分泌される IL-21 は、同系マウスにおいて完全に腫瘍を拒絶せしめることが可能であることを示した。この場合の抗腫瘍効果を担当する細胞であるが、成熟 T 細胞を欠くヌードマウスでは Colon 26/IL-21 腫瘍は生着したことから、T 細胞がまず必要であることがわかる。またヌードマウスでの Colon 26/IL-21 腫瘍増殖は親株腫瘍より低下していることから、ナチュラルキラー細胞も関与していると推定される。これらのインビボの抗腫瘍効果から得られる結果は、インビトロでの解析で判明している IL-21 の機能、すなわち末梢の活性化 T 細胞、ナチュラルキラー細胞の増殖とその殺細胞効果の増強、と一致している。このような細胞免疫応答を活性化するサイトカインの遺伝子を腫瘍に発現させる治療法は、個々の腫瘍抗原の特異性や患者個人の MHC を考慮する必要がなく、より広範な腫瘍を対象とすることが可能と思われる。

参考文献：

1. Heise C and Kirn DH: Replication-selective adenoviruses as oncolytic agents. *J Clin Invest* 105: 847-851, 2000.
2. Uehara K, Matsubara S, Kadomatsu K, Tsutsui J and Muramatsu T: Genomic structure of human midkine (MK), a retinoic acid-responsive growth/differentiation factor. *J Biochem* 111: 563-567, 1992.
3. Miyauchi M, Yoshida Y, Tada Y, Narita M, Maeda T, Bahar R, Kadomatsu K, Muramatsu T, Matsubara S, Nakagawara A, Sakiyama S and Tagawa M: Expression of herpes simplex virus-thymidine kinase gene controlled by a promoter region of the midkine gene confers selective cytotoxicity to ganciclovir in human carcinoma cells. *Int J Cancer* 91: 723-727, 2001.
4. Tsutsui J, Kadomatsu K, Matsubara S, Nakagawara A, Hamanoue M, Takao S, Shimazu H, Ohi Y and Muramatsu T: A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: Increased midkine expression in Wilms' tumor and other human carcinomas. *Cancer Res* 53: 1281-1285, 1993.
5. Aridome K, Tsutsui J, Takao S, Kadomatsu K, Ozawa M, Aikou T and Muramatsu T: Increased midkine gene expression in human gastrointestinal cancers. *Jpn J Cancer Res* 86: 655-661, 1995.
6. Abbas AK, Murphy KM and Sher A: Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 283: 787-793, 1996.
7. Parrish-Novok J, Dillon SR, Nelson A, et al.: Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408: 57-63, 2000.
8. Rodriguez R, Schuur ER, Lim HY, Henderson GA, Simons JW and Henderson DR: Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for

- prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res* 57: 2559-2563, 1997.
9. Alemany R, Lai S, Lou YC, Jan HY, Fang X and Zhang WW: Complementary adenoviral vectors for oncolysis. *Cancer Gene Ther* 6: 21-25, 1999.
 10. Kurihara T, Brough DE, Kovesdi I and Kufe DW: Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. *J Clin Invest* 106: 763-771, 2000.
 11. Yu DC, Chen Y, Seng M, Dilley J and Henderson DR: The addition of adenovirus type 5 region E3 enables calydon virus 787 to eliminate distant prostate tumor xenografts. *Cancer Res* 59: 4200-4203, 1999.
 12. DeWeese T, Drew R, Li S, Goemann M, Mikhak B, Rodriguez R, Hamper U, Dejong R, Detorie N and Simons J: Final results of a phase I study of CV706, a conditionally replication-competent cytolytic adenovirus, for the treatment of locally-recurrent prostate cancer. *Mol Ther* 3: S310-S311, 2001.

注：本研究の一部は 2002 年 12 月 7 日『中国免疫学会第四回学術大会』にて口演発表し、
『中国免疫学雑誌』に投稿中である。

作成日：2003 年 2 月 15 日