

Del1由来ペプチドによるがん遺伝子治療のメカニズム

北野尚孝¹⁾, 日臺智明²⁾, 國分眞一郎²⁾

The mechanism of cancer gene therapy with a Del1 fragment

Hisataka KITANO¹⁾, Chiaki HIDAI²⁾, Shinichiro KOKUBUN²⁾

要旨

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。これまでに、Del1の有する機能はエンドサイトーシス亢進作用とアポトーシス誘導作用と細胞外基質沈着作用がある事が明らかになっている。また、Del1を利用したがん遺伝子治療においてin vivoの実験系で腫瘍縮小効果やマウスの生命予後を改善する効果があることが報告されている。その効果の機序を検討するために今回我々はヌードマウス移植腫瘍にE3C1による遺伝子治療を行い、腫瘍血管に与える影響を検討した。

その結果、E3C1の遺伝子治療により腫瘍の毛細血管は減少していた。さらに、血流の無い血管新生が起きており、血管周囲細胞にも影響を与えていた。

このことより、E3C1による遺伝子治療では腫瘍血管の血管新生や血管周囲組織に影響することにより腫瘍増殖を抑制しているのではないかと示唆された。

1. 背景

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と弱いアポトーシス誘導作用を示した。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。

平成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およびE3C1間で遺伝子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、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。治療開始後の腫瘍サイズを比較すると、E3C1群はコントロール群よりも小さくなっており、期待通りの腫瘍縮小効果を示した¹⁾。次に長期予後について比較した。コントロール群のマウスは49日目までに全て死亡した。その時点で、E3C1群は6匹中3匹が生存していた。生き残ったマウスのうち、E3C1群の2匹は腫瘍が完全に消失していた。さらに、E3C1群の腫瘍は腫瘍組織で出血性壊死を起こしていた²⁾。このことやDel1が血管内皮のECMであることから、E3C1は血管を制御することで腫瘍の増殖を抑制しているのではないかと考えられた。通常、血管新生は毛細血管が集約され変化していく。今回我々は、血管新生時にE3C1を加えると、さらに血管が集約され、毛細血管が存在しなくなるのではないかとこの仮説の下に本研究を行った。

1) 日本大学医学部耳鼻咽喉頭頸部外科学系歯科口腔外科学分野

2) 日本大学医学部生体機能医学系生理学分野

北野尚孝: kitano.hisataka@nihon-u.ac.jp

2. 材料および方法

in vivoの実験系において、ヌードマウス (nu/nu balb/c) 背部皮下にA431細胞 (扁平上皮癌由来細胞株) の細胞浮遊液 (10×10^7 個/100 μ l) を局所注射し移植腫瘍を形成させた。形成された移植腫瘍に対して、mockおよびpE3C1により遺伝子治療を行うことで腫瘍内の血管の状態や血管形成を比較した。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) を使用した。

1) ヌードマウス移植腫瘍の巨視的観察

一週間に1回の割合で3週間、移植腫瘍へmockまたはpE3C1遺伝子を10 μ g/100 μ lの濃度で局所注

射した。3回目の遺伝子治療が終了した翌週に、マウスの尾静脈よりインディアンインクを静脈内投与し10分経過観察を行い、安楽死させた。その後、腫瘍を一塊に摘出し顕微鏡で巨視的観察を行った。

2) ヌードマウス移植腫瘍の免疫染色

同様に3週間、遺伝子治療を行ったヌードマウスを3回目の遺伝子治療が終了した翌週に、マウスの尾静脈よりトマトレクチンを静脈内投与し10分経過観察を行い、安楽死させた。その後、腫瘍を一塊に摘出し、凍結切片を作成した。作製された標本をフォンウィルブランド因子抗体、ペッカム抗体および α スムースマッスル抗体で染色し観察した。

3. 結果

コントロール群のヌードマウスの移植腫瘍の腫瘍血管は毛細血管や太い血管が多く観察された。一方、pE3C1遺伝子で遺伝子治療を行ったヌードマウスの移植腫瘍の腫瘍血管は毛細血管がほとんど観察されなかった (図1)。

また、コントロール群ではトマトレクチンで染色された細胞はフォンウィルブランド因子抗体でも染色されていた。しかし、pE3C1群ではトマトレクチンで染色されない細胞がフォンウィルブランド因子

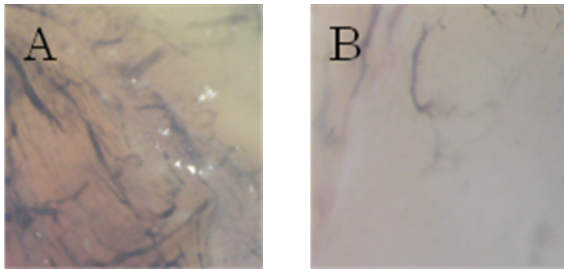


図1 ヌードマウス移植腫瘍の血管へのE3C1による遺伝子治療の影響
A: コントロール群, B: E3C1治療群

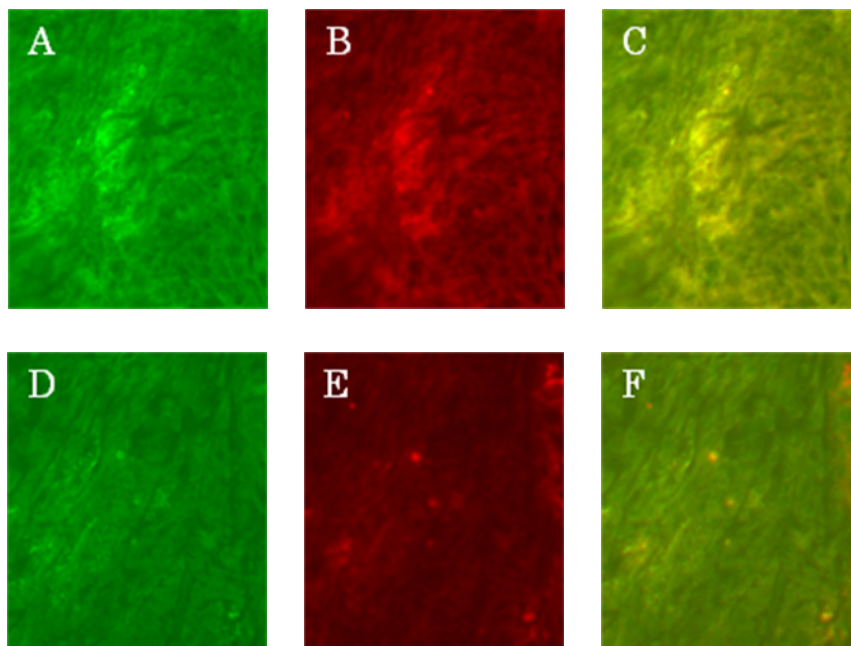


図2 E3C1による遺伝子治療での血管への影響
緑: トマトレクチン, 赤: フォンウィルブランド因子抗体
A, B, C: コントロール群, D, E, F: E3C1治療群

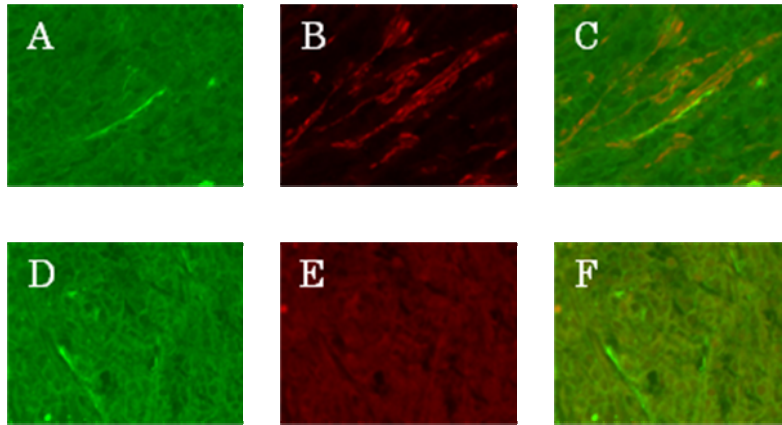


図 3 E3C1による遺伝子治療での血管周囲細胞への影響
 緑：ペッカム抗体，赤： α スモースマッスル抗体
 A, B, C：コントロール群, D, E, F：E3C1治療群

抗体で染色されている所見が観察された(図2)。

さらに、コントロール群ではペッカム抗体で染色された細胞の周囲に α スモースマッスル抗体で染色された細胞を観察することができた。一方、pE3C1群ではペッカム抗体で染色された細胞の周囲に α スモースマッスル抗体で染色された細胞を観察することはできなかった(図3)。

4. 考 察

今回の研究においてE3C1による遺伝子治療は腫瘍血管の血管新生に影響を及ぼしているのではないかと考えられた。なぜなら、E3C1による治療群では巨視的観察で毛細血管がほとんど観察されなかったことやトマトレクチンで染色されなかった細胞でもフォンウィルブランド因子抗体で染色されていることより、血流の無い血管新生が起きていることが強く示唆された。また、E3C1による治療群ではペッカム抗体で染色された細胞の周囲に α スモースマッスル抗体で染色された細胞を観察することはできなかった。このことより、E3C1による遺伝子治療は血管周囲細胞であるペリサイトに影響を与えていることが明らかになった。

以上のことより、Del1のE3C1による遺伝子治療の腫瘍増殖抑制効果や腫瘍を移植したヌードマウスの生命予後の改善に及ぼす効果は、E3C1が腫瘍血管の血管新生や血管周囲組織に与える影響が強く関与していると示唆された。

文 献

- 1) Hisataka Kitano, Atsushi Mamiya, Shinichiro Kokubun, Chiaki Hidai. A Del1 fragment improves the efficiency of FasL gene therapy with a non-viral vector in a mouse explanted tumor model, *Journal of Gene Medicine*, 2012 Nov;14(11):642-50. doi: 10.1002/jgm.2682.
- 2) Hisataka Kitano, Atsushi Mamiya, Tomomi Ishikawa, Kayo Egoshi, Shinichiro Kokubun, Chiaki Hidai. Long-term gene therapy with Del1 fragment using nonviral vectors in mice with explanted tumors. *Oncology Targets and Therapy*. 2016(9): 503-516, 2016. doi: 10.2147/OTT.S90801.