

膵癌に対する遺伝子治療法の開発

所属機関 杏林大学医学部第一外科
研究者名 跡見 裕

《研究の概要》

難治性の膵癌の治療成績を向上させるため 1) 増殖のために必要な必須アミノ酸の輸送系である LAT-1 の遺伝子治療の応用の可能性 2) 遺伝子導入を目指したアデノウイルスの感染効率・遺伝子導入効率に関する検討 3) ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤による遺伝子調節化学療法 4) 膵癌組織内の angiotensin 産生系について基礎的研究を行い、膵癌に対する有効な遺伝子療法の可能性を検討した。LAT1 の抑制により腫瘍細胞は増殖が抑制され、LAT1 は膵癌遺伝子治療の新しいターゲットとなるが、臨床応用には LAT1 ノックアウトアンチセンスを腫瘍細胞に効率良く運ぶベクターの開発などが重要な課題であると考えられた。ベクターに関する検討結果では、AxdAdB3-F/RGD を用いた実験から、1) 改良型ファイバーを有するに RSAd は CAR の発現に左右されない良好な感染効率が得られること、2) 腫瘍選択的に増殖し強い殺細胞効果が認められること、3) 動物実験においても *in vitro* 実験同様な結果が得られ、静脈投与によっても抗腫瘍効果が認められること、などが明らかとなった。また、HDAC 阻害剤である FR901228 は、アポトーシスに対して抵抗性を示す膵癌細胞に対しても、p21Waf-1 蛋白の強い誘導を介して細胞周期停止 (G1 arrest または G2/ Marrest) を招来し、最初は cytostatic な作用を示すだけでなく、その後は効率よくアポトーシスを誘導していることが判明した。多くの抗癌剤に抵抗性を示す膵癌細胞に対して、HDAC 阻害剤である FR901228 を用いての p21Waf-1 遺伝子を標的にした遺伝子調節化学療法は優れた制癌作用を示した。この遺伝子調節化学療法を効率よく行うためには、アンギオテンシン受容体ブロッカーを併用する治療がきわめて有用である可能性が示唆された。

松野 正紀	東北大学大学院消化器外科 教授	ファイバーノブを改変した制限増殖型アデノウイルスを用いた膵癌の治療
太田 哲生	金沢大学大学院医学系研究科 がん局所制御学分野 助教授	p21WAF-1 遺伝子を標的にした分化誘導剤による遺伝子調節化学療法

研究報告

I 研究目的

難治性の膵癌の治療成績を向上させるため 1) 増殖のために必要な必須アミノ酸の輸送系である LAT-1 の膵癌における発現と特異的抑制による膵癌細胞増殖抑制効果、LAT-1 を標的とした遺伝子治療の基礎的実験 2) 増殖型アデノウイルスの殺細胞効果 3) アデノウイルスの感染効率・遺伝子導入効率に関する検討 4) ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤による遺伝子調節化学療法 5) 膵癌組織内の angiotensin 産生系について種々の基礎的研究を行い、得られた結果をもとに膵癌に対する有効な遺伝子療法の可能性を検討した。

II 研究計画および材料と方法

1) LAT1 の検討

①膵癌における LAT1 の発現を検討するために、膵癌手術標本の免疫組織化学、及び 2 種類のヒト膵癌由来の細胞株 (Miapaca2 及び Bxpc3) のリアルタイム定量 PCR、ノーザンブロット、ウエスタンブロットを行った。②LAT1 抑制の腫瘍細胞増殖抑制効果を検討するために、まず *in vitro* で LAT1 阻害薬である BCH を用いて、LAT1 の代表的輸送基質である必須アミノ酸ロイシンの取り込み阻害、及びヒト膵癌由来の細胞株の増殖抑制実験を行った。③ヌードマウスの皮下腫瘍モデルに対して LAT1 ノックアウトアンチセンスを用いて増殖抑制効果を検討した。

2) 増殖型アデノウイルスの殺細胞効果およびアデノウイルスの感染効率・遺伝子導入効率

①膵癌細胞における CAR の発現解析: Flowcytometry analysis、免疫染色を用いて、膵癌細胞および正常細胞における CAR の発現を検討した。②感染効率の検討: 非増殖型の LacZ 遺伝子を挿入した改変型ファイバーをもつウイルスと同様の構造だが野生型ファイバーをもつウイルスとの感染効率を、Betagal staining および cell cycle analysis にて比較検討した。③*in vitro* でのポテンシャルの検討: RSAd で RGD にファイバーノブが改変された AxdAdB3-F/RGD と野生型ファイバーを持つ AxdAdB3-F/wt の腫瘍選択的増殖能、殺細胞効果を、viral replication assay、immunoblotting、MTS assay にて比較検討した。④*in vivo model* での治療効果 (局所投与): SCID マウスにヒト膵癌細胞株を移植する皮下腫瘍モデル、および腹膜播種モデルを作製し、ウイルス局所投与での AxdAdB3-F/RGD と AxdAdB3-F/wt の抗腫瘍効果を検討した。⑤*in vivo model* での治療効果 (全身投与): SCID マウスにヒト膵癌細胞株を移植する皮下腫瘍モデルを用いて、AxdAdB3-F/RGD の尾静脈投与を行い、ウイルスの全身投与治療の可能性を検討した。抗腫瘍効果を検討すると共に、RSAd の選択的増殖能を免疫染色で確認した。また 5FU 投与を行い、化学療法を併用した場合のウイルス療法の抗腫瘍増強効果を確認した。

3) HDAC の検討および膵癌組織内におけるアンギオテンシン II 産生系の存在に関する研究
Mutant type の p53 遺伝子を持ち、通常の抗癌剤に抵抗性を示し、しかも分化度の異なる 5 種類のヒト膵癌細胞株 (Capan-1、BxPC-3、HPAF-II、Panc-1、MIAPaCa-2) を ATCC より購入して実験に使用した。HDAC 阻害剤としては、FR901228 (藤沢薬品工業株式会社から供与) を使用した。①HDAC 阻害剤によるヒストンのアセチル化および p21Waf-1 蛋白の誘導、②HDAC 阻害剤による膵癌細胞の *in vitro* での増殖抑制効果、③HDAC 阻害剤による膵癌細胞の細胞周期停止とアポトーシス、④Caspase-3 の活性化に伴う p21Waf-1 蛋白および survivin 蛋白の減少、⑤HDAC 阻害剤による膵癌細胞の *in vivo* での増殖抑制効果について検討した。

血管作動物質のアンギオテンシン II の膵癌組織中含量とその特異的受容体である AT1 蛋白の発現程度・組織内局在について検討した。対象は、進行膵癌で外科的切除を行った 13 例 (男: 6 例、女: 7 例、年齢: 44-75 歳 (平均 60 歳)、stage III 2 例、IVa4 例、IVb7 例) である。切除後ただちに採取した組織片を凍結保存し、アンギオテンシン II、アンギオテンシン変換酵素 (ACE) 測定用に供した。AT1 蛋白は、通常の免疫染色で評価した。また、正常膵 7 例、大腸癌 7 例、肝細胞癌 7 例との比較もおこなった。さらに、アンギオテンシン II の膵癌細胞の増殖や抗癌剤抵抗性に及ぼす影響についても、膵癌細胞株を用いて分子生物学的側面から検討した。

III 研究成果

1) LAT1 の検討結果

①浸潤型膵管癌組織 (原発巣 24 例、肝転移巣 2 例、腹膜播種巣 1 例) では 27 例中 23 例で LAT1 の発現を認めた。またヒト膵癌細胞株である MiaPaCa-2、BxPC-3 を用いて定量 PCR、ノーザンブロットおよびウエスタンブロットを行ったところ、MiaPaCa-2、BxPC-3 の両者において LAT1 の高発現が認められた。②BCH を用いた Miapaca2 及び Bxpc3 におけるロイシンの取り込み阻害実験では、BCH 非処理群と比べ BCH 処理群ではロイシンの取り込みが濃度依存的に抑制された。*In vitro* における BCH を用いたヒト膵癌由来細胞株の増殖抑制実験では、BCH 非処理群と比べ BCH 処理群では腫瘍細胞の増殖が濃度依存的に抑制された。③ヌードマウスの皮下腫瘍モデルに対する BCH 投与による腫瘍増殖抑制実験でも、コントロール群と比べ BCH 投与群では腫瘍の増殖が抑制された。さらに LAT1 が遺伝子治療のターゲットとなり得る可能性について検討する目的で行った、LAT1 ノックアウトアンチセンスを用いた増殖抑制実験でも、コントロール群と比べ LAT1 ノックアウトアンチセンス投与群では腫瘍増殖抑制が確認された。

2) 膵癌組織内におけるアンギオテンシン II 産生系の存在に関する研究

a) 臨床材料での検討: 膵癌組織中の ACE 活性値は正常膵、大腸癌、肝細胞癌とほぼ同程度で低値を示したが、膵癌組織中のアンギオテンシン II 含量は正常膵や癌間質の少ない肝細胞癌や大腸癌に比べてきわめて高値を示し、とくに癌間質の多い膵癌ほど高値であった。さらに、膵癌組織内ではアンギオテンシン II の特異的受容体である AT1 蛋白が、血管壁の内皮細胞や平滑筋細胞、マクロファージや線維芽細胞だけでなく、膵癌細胞にも強く発現していた。しかし、大腸癌細胞や肝癌細胞では逆に AT1 の発現は減弱していた。以上、膵癌組織内では少なくとも ACE 非依存性のアンギオテンシン II 産生系が存在するこ

とが確認された。

b) アンジオテンシン II の膵癌細胞に及ぼす影響の検討：3 種類のヒト膵癌細胞株 (HPAF-II、AsPC-1 および Panc-1) を用いて検討した結果、アンジオテンシン II は、AT1 受容体を介して ERK1/2 や NF- κ B を活性化することで、膵癌細胞増殖を促進させ、一方では Bel-XL や survivin の発現を抗進させて抗癌剤抵抗性を増強させていることが判明した。したがって、高度進行膵癌の組織中に存在している高濃度のアンジオテンシン II は、膵癌の survival に大きく関与し、とくに抗癌剤抵抗性獲得に大きな役割を果たしていることが明らかとなった。

3) 増殖型アデノウイルスの殺細胞効果およびアデノウイルスの感染効率・遺伝子導入効率
①CAR の発現はヒト膵癌細胞株ごとに異なっており、CAR の発現を認めない癌細胞株があった。②CAR の発現の弱い膵癌細胞株においても、Adv-F/RGD は高い感染効率を示した。しかしながら、野生型ファイバーのウイルスでは感染効率が著しく低下した。③in vitro において AxdAdB3-F/RGD は、腫瘍選択的に増殖し、AxdAdB3-F/wt よりも高い殺細胞効果が示された。④マウスを用いた腫瘍モデルでは、いずれのモデルにおいても AxdAdB3-F/RGD は AxdAdB3-F/wt に比較して強い抗腫瘍効果が確認された。⑤AxdAdB3-F/RGD の全身投与では、一回投与という条件にもかかわらず、腫瘍選択的増殖、治療効果が認められた。また、RSAd の選択的増殖が腫瘍局所において確認された。一方、正常臓器においては RSAd の選択的増殖は確認されなかった。

4) HDAC 阻害剤による p21Waf-1 遺伝子を標的にした遺伝子調節化学療法の研究

HDAC 阻害剤である FR901228 が実際にヒストンのアセチル化に関与しているか否かをまず確認する目的で、FR901228 処理後に経時的に膵癌細胞の蛋白を抽出し、Histone H3、acetyl-Histone H3 (Lys 9) に対する一次抗体を用いて Western blotting を行った。その結果、FR901228 処理 3 時間後より濃度依存性にヒストンのアセチル化が起こっていることが確認できた。また、p21Waf-1 蛋白に関しては、処理 6 時間目より発現が誘導され、経時的に漸増していくのが観察された。これに伴い、Rb のリン酸化が抑制された。FR901228 の増殖抑制効果を MTT assay 法にて評価したところ、Panc-1 を除く 4 種類の膵癌細胞株は FR901228 処理により、その増殖が濃度依存性にナノモル (nM) レベルで効率よく抑制された。その抑制効果は、腫瘍の分化度と無関係であった。次に、FR901228 処理による膵癌細胞の細胞周期停止の状態を flow cytometry で観察した。FR901228 にきわめて感受性のある膵癌細胞では、いずれも 10nM 濃度で G1 期あるいは G2/M 期で細胞周期が停止した。また、FR901228 に抵抗性を示した Panc-1 でも、100nM の高濃度で処理することで G1 期での細胞周期停止が観察された。さらに注目されることは、細胞周期停止に引き続いて、程度の差こそあるものの、すべての膵癌細胞がアポトーシス (subG0/G1 分面の増加で評価) に陥っていたことである。なかでも、100nM で処理された Panc-1 が G1 期での細胞周期停止に引き続いてアポトーシスに陥っていたのが注目された。そこで、FR901228 に最も高い感受性を示した MIAPaCA-2 を用いて、アポトーシスの程度を FITC 標識 AnnexinV の細胞表面結合状態で評価したところ、治療開始 24 時間目頃からアポトーシス細胞が出現し、経時的に増大しているのが観察された。さらに、サイトスピン法で細胞の形態を観察したところ、FR901228 処理により細胞質の萎縮、核の濃染と分断化などアポトーシスに特徴的な細胞形態が認められた。このように、FR901228 処理により細胞周期停止が認められ、それに引き

続いてアポトーシス細胞が観察されたので、次にアポトーシス関連分子の発現の推移について検討した。FR901228 に最も高い感受性を示した MIAPaCA-2 を 10 nMFR901228 で処理すると、24 時間目以降から Caspace-3 の活性体が観察され、その発現に伴い、それまで漸増していた p21Waf-1 蛋白が減少した。そして、Caspase-3 により切断されたと思われる p21Waf-1 蛋白の断片（分子量 15kDa）の出現が確認された。さらに、FR901228 処理で漸増した survivin 蛋白（最近同定された抗アポトーシス作用を有する分子）が Caspace-3 の活性化の時期に一致して、その発現が激減した。最後に、ヌードマウスの背部に移植した BxPC-3 膵癌細胞に対して、移植 7 日目に腫瘍の大きさが約 50mm³ 前後に育ったヌードマウスを選別して、FR901228 治療による腫瘍の増殖抑制効果を観察した。その結果、FR901228 を 1 回 2mg/kg、4 日毎に腹腔内に計 3 回注入したところ、治療開始 14 日目には有意に腫瘍の縮小が認められた

IV 考察

本研究により LAT1 の抑制により腫瘍細胞は栄養枯渇状態となりその増殖が抑制されることが確認され、LAT1 は膵癌遺伝子治療の新しいターゲットとなり得ると考えられた。今後、臨床応用していくために LAT1 ノックアウトアンチセンスを腫瘍細胞に効率良く運ぶベクターの開発などが重要な課題であると考えられた。そこで AxdAdB3-F/RGD を用いて検討を行った。その結果、1) 改良型ファイバーを有するに RSAAd は CAR の発現に左右されない良好な感染効率が得られること、2) 腫瘍選択的に増殖し強い殺細胞効果が認められること、3) 動物実験においても *in vitro* 実験同様な結果が得られ、静脈投与によっても抗腫瘍効果が認められること、4) 5FU との併用によりさらに殺細胞効果が増強されること、5) 細胞増殖は腫瘍局所に限られ、正常組織には悪影響を及ぼさないこと、などが確認できた。以上の結果から、全身に転移巣を形成する膵癌に対しても、治療効果が期待できるものと考えられる。また、既に報告しているように、この AxdAdB3-F/RGD には血管新生抑制作用もあることが判明しており、今回の実験でも主要部の新生血管に存在が確認できた。

また、HDAC 阻害剤である FR901228 は、アポトーシスに対して抵抗性を示す膵癌細胞に対しても、p21Waf-1 蛋白の強い誘導を介して細胞周期停止(G1 arrest または G2/ Marrest) を招来し、最初は cytostatic な作用を示すだけでなく、その後は効率よくアポトーシスを誘導していることが判明した。FR901228 がヒストンのアセチル化を介して p21Waf-1 蛋白を誘導することは予想できたが、cytostatic な増殖抑制に引きつづいて apoptosis という cytotoxic な増殖抑制が観察されたのは、実は想定範囲外であり、研究開始当初の目標以上の成果が得られたものと考えている。したがって、多くの遺伝子異常を併せ持ち、多くの抗癌剤に抵抗性を示す膵癌細胞に対して、HDAC 阻害剤である FR901228 を用いての p21Waf-1 遺伝子を標的にした遺伝子調節化学療法は優れた制癌作用を示すことから、大いに期待できる治療法と思われた。

そこで、この遺伝子調節化学療法を効率よく行うためには、ヒト膵癌組織内での特有の血行動態を踏まえ、腫瘍内での薬剤濃度を効率よく高度に保てるような治療上の工夫を施す必要があると考えた。そして、膵癌組織内にアンギオテンシン II 産生系が存在することをつきとめ、このアンギオテンシン II が既存の膵の血管系を収縮させて腫瘍内へ流入する血流量を下げているだけでなく、膵癌細胞が持つ AT1 受容体を介して ERK1/2 や NF- κ B を

活性化することで、膵癌細胞増殖を促進させ、一方では Bcl-XL や survivin の発現を充進させて抗癌剤抵抗性を増強させていることが判明した。したがって、高度進行膵癌の組織中に存在している高濃度のアンギオテンシン II は、膵癌の survival に大きく関与し、とくに抗癌剤抵抗性獲得に大きな役割を果たしていることから、遺伝子調節化学療法を行う際には、有効な drug delivery と膵癌細胞の抗アポトーシス能を減弱させるためにも、アンギオテンシン受容体ブロッカーを併用する治療がきわめて有用である可能性があると推察された。

以上より、遺伝子治療として LAT-1 を標的遺伝子とする可能性が示され、その効率的細胞内導入についての検討と、発現場所である膵がん細胞の血流等について、重要な諸点が明らかとなった。

V 研究成果の発表

- 1) 松本伸明、阿部展次、杉山政則、金井好克、遠藤仁、跡見裕、膵癌治療に対する遺伝子治療の現況、臨床外科、58 巻、p.1509-1513、2003 年
- 2) Duda DG, Sunamura M, Lefter LP, Furukawa T, Yokoyama T, Yatsuoka T, Abe T, Inoue H, Motoi F, Egawa S, Matsuno S, Horii A
Restoration of SMAD4 by gene therapy reverses the invasive phenotype in pancreatic adenocarcinoma cells. Oncogene, 22(44): 6857-64: 2003
- 3) Sunamura M, Hamada H, Motoi F, Oonuma M, Abe H, Saitoh Y, Hoshida T, Ottomo S, Matsuno S Oncolytic Virotherapy as a Novel Strategy for Pancreatic Cancer. Pancreas, 28(3): 326-9: 2004
- 4) Sunamura M, Lefter LP, Duda DG, Mori ta R, Inoue H, Yokoyama T, Yatsuoka T, Abe T, Egawa S, Furukawa T, Fukushige S, Oshimura M, Horii A, Matsuno S
The role of chromosome 18 abnormalities in the progression of pancreatic adenocarcinoma. Pancreas, 28 (3): 311-6: 2004
- 5) Yamanaka S, Sunamura M, Furukawa T, Sun L, Lefter LP, Abe T, Yatsuoka T, Fujimura H, Shibuya E, Kotobuki N, Oshimura M, Sakurada A, Sato M, Kondo T, Matsuno S, Horii A
Chromosome 12, frequently deleted in human pancreatic cancer, may encode a tumor suppressor gene that suppresses angiogenesis. Lab Invest, 84(10):1339-51: 2004
- 6) Ohta T, Amaya K, Yi S, et al. Angiotensin converting enzyme independent, local angiotensin II-generation in human pancreatic ductal cancer tissues. Int J Oncol, 23: 593-598, 2003.
- 7) Sato N, Ohta T, Kitagawa H, et al. FR901228, a novel histone deacetylase inhibitor, induces cell cycle arrest and subsequent apoptosis in refractory human pancreatic cancer cells, Int J Oncol, 24: 679-685, 2004.
- 8) 太田哲生、佐藤就厚、北川裕久、ほか：膵癌の分子標的治療薬—とくに、転写調節因子であるヒストンデアセチラーゼを標的にした新しい膵癌治療の可能性について。胆と膵 24(9) : 661-667, 2003.

- 9) Amaya K, Ohta T, Kitagawa H, et al. Angiotensin II activates MAP kinase and NF- κ B through angiotensin II type 1 receptor in human pancreatic cancer cells. Int J Oncol 25: 849-856, 2004.
- 10) Ohta T, Elnemr A, Kitagawa H, et al. Fas ligand expression in human pancreatic cancer. Oncol Rep 12 (4): 749-754, 2004.