日消外会誌　33（4）：543～548，2000年

特集 7

原発性および転移性肝癌に対する遺伝子治療の研究
―転移性肝癌に対する治療戦略―

名古屋大学医学部第 2 外科
林　　衆　治　　中　尾　昭　公

消化器癌治療上の大きな問題として，肝転移が挙げられる．本研究において，我々は肝転移制御に対する遺伝子治療の有用性に関して検討した．アデノウイルスベクターを用いて，tissue plasminogen activator（tPA），interleukin 10（IL10），I kappa beta（IKB）遺伝子を腫瘍組織，肝臓へ導入し肝転移抑制効果を検討するとともに，抗癌剤との併用効果を検討した．その結果は，1）tPA，IL10遺伝子を用いた腫瘍組織，肝臓への遺伝子導入により，肝転移が抑制されること，2）IKB 遺伝子と CDDP を併用した場合，肝転移抑制に相乗効果を示すこと，が明らかとなった．以上から，肝転移制御のための，腫瘍組織および肝臓に対する遺伝子治療は，新しい治療手段として有用であると示唆された．

目　的

遺伝子治療は，欧米を中心としてすでに3,000例以上が臨床で実施されている．悪性腫瘍に対する遺伝子治療としては，herpes simplex virus-thymidine kinase（HS-tk）遺伝子，cytosine deaminase（CD）遺伝子などの毒素遺伝子，interleukin 12（IL12）遺伝子，granulocyte-macrophage-colony stimulating factor（GM-CSF）遺伝子，などのサイトカイン遺伝子，を中心として，臨床応用が行われつつあるが，最近 p53などの癌抑制遺伝子を用いた遺伝子治療も実施されている[1)2)]．遺伝子導入方法は，ex vivo，in vivo 両者ともに行われているが， in vivo は現時点では導入効率の問題もあり，局所投与によるプロトコールが多く認められている．肝癌遺伝子治療は将来有望な治療法であり，特に切除不能肝癌はこの治療法のよい対象になると考えられる．これまでの報告では，単発の肝腫瘍に対して，HS-tk，IL2などの遺伝子を局注で用いることにより，抗腫瘍効果が認められることが報告されている[3)4)]．我々は，以前より切除不能肝癌に対する遺伝子治療研究として，1）原発性および転移性ともに，多発性肝癌に対する遺伝子治療，2）肝転移抑制のための遺伝子治療，という 2 つの方向から研究を行ってきた．そして，多発性肝癌遺伝子治療の研究として，HS-tk，GMCSF，interleukin 12（IL12）遺伝子を用いた肝癌遺伝子治療は，多発性肝癌治療に有効であることを報告してきた[5)6)]．肝転移は，腫瘍細胞の肝血管床への接着，着床，そして実質組織への浸潤，増殖という複雑なメカニズムを経て，転移形成に至る．消化器癌は，一般的に肝転移を高率に引き起こすことが知られている．また，実際外科手術後肝転移再発する症例が多いことが知られている．したがって，外科医にとって，術後肝転移対策はきわめて重要と考えられる．

アデノウイルスベクターは，in vivo で優れた導入効率を示すことが知られているが，特に肝臓における遺伝子導入効率が良好であることが報告されている．アデノウイルスベクターを用いた肝臓に対する遺伝子治療研究として，先天性代謝性疾患に対する遺伝子治療，肝癌に対する遺伝子治療が報告されているが，我々は肝臓移植などの臓器移植に対する遺伝子治療の研究を行い，遺伝子免疫抑制療法の可能性に関して報告してきている[7)8)]．本研究において，我々は，アデノウイルスベクターが肝臓ですぐれた導入効率を示す事実に注目し，肝組織への遺伝子導入により転移抵抗性を示す肝臓を作成し，肝転移抑制が可能かどうか，また同時に腫瘍組織への遺伝子導入との併用により，相乗効果が得られるかどうかについて検討を行うとともに，抗癌剤との併用療法の可能性に関して検討した．

＊第54回日消外会総会シンポ 5・消化器癌転移能の分子生物学的側面（肝胆膵）

＜1999年12月22日受理＞別刷請求先：林　　衆治
〒466-8560　名古屋市昭和区鶴舞町65　名古屋大学医学部第 2 外科

対象と方法

細胞および動物：細胞として，マウス大腸癌細胞Colon 26, マウス血管内皮由来細胞 F2を用いた．動物として，Balb/c 雌性マウスを用いた．

遺伝子：遺伝子として，tissue plasminogen activator（tPA），interleukin 10（IL10），i kappa beta（IKB）遺伝子を，コントロール遺伝子としてbeta-galactosidase（LacZ）遺伝子を用いた．

ベクター：アデノウイルスベクター AdexCAwt に対して，遺伝子をそれぞれ組み込み，組み替えアデノウイルスを得た（AdextPA，AdexIL10，AdexIKB，AdexLacZ）．ウイルス力価の検定は，既報の方法で行った[9]．

遺伝子導入：In vitro 遺伝子導入は，Colon26細胞がプレート上にてコンフルエントになった後，20 multiplicity of infection（MOI）で行った．肝臓への in vivo 遺伝子導入は，マウス脾臓へ 2×10^8 plaque forming unit（PFU）のベクターを注射して行った．

遺伝子発現：TPA，IL10測定は，培養上清を用いて ELISA で行い，IKB 測定は，遺伝子導入細胞の抽出液を用いて，ウエスタンブロットで行った．

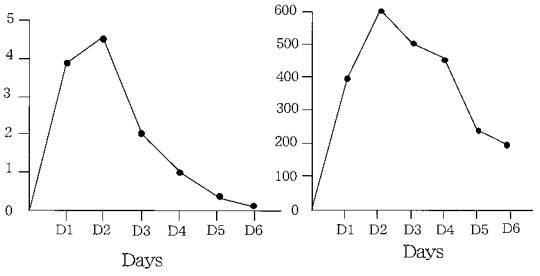
細胞接着：F2細胞および Colon26細胞へ遺伝子導入後，それぞれの細胞を37度60分間反応させ，洗浄後，接着した細胞をカウントした．

細胞増殖：Colon26細胞へ遺伝子導入後，経時的に細胞増殖能を MTT 法を用いて測定した．また，抗癌剤 CDDP（0から10μg/ml）の併用を行った．

肝転移作成：Colon26細胞 2×10^4個または 1×10^5個を上腸間膜静脈末梢から30G 針を用いて，注射し，肝転移を作成した．

抗腫瘍免疫誘導：肝転移後長期生存したマウスに対して，Colon26細胞 2×10^6個を腹腔内に注射して，マウス生存を観察した．

Fig. 1　Expression of tPA and IL10 in vitro



結　果

1．tPA，IL10遺伝子を用いた肝転移抑制

遺伝子発現：tPA，IL10ともに in vitro での遺伝子発現が認められた．両者とも，遺伝子導入後 3 日をピークとして遺伝子発現は，漸減し，約 1 から 2 週間で消失した（**Fig. 1**）．In vivo でもほぼ同様に，肝臓での蛋白発現は，遺伝子導入後 1 から 3 日で 1 から 2 週間で漸減した．

細胞接着への影響：遺伝子導入による影響は，1)腫瘍細胞へ遺伝子導入，2）血管内皮細胞へ遺伝子導入，3）腫瘍細胞および血管内皮細胞へ遺伝子導入の 3 つのケースで検討した．コントロールとして，LacZ 遺伝子を用いた．TPA 遺伝子導入により，1）から3）において，IL10, LacZ 遺伝子導入群と比較して，有意に細胞接着が抑制された．IL10遺伝子導入では，LacZ 遺伝子導入と比較して，有意差は認められなかった（**Fig. 2**）．

肝転移への影響：遺伝子導入による肝転移への影響を調べるために，1）in vitro で遺伝子導入後，肝転移作成，2）肝臓への遺伝子導入後，肝転移作成，3）1)と2）の併用の 3 群に関して検討した．LacZ 遺伝子を in vitro で腫瘍細胞に遺伝子導入後，肝転移を作成した場合，平均生存17.25日，対して IL10遺伝子では30.88日，tPA 遺伝子では35.63日であり，IL10，tPA 遺伝子導入により，平均生存日数は有意に延長した（**Fig. 3**）．死亡したマウスは，全例多発性肝転移を認め癌死であった．肝臓へ遺伝子導入後，肝転移を作成した場合，LacZ

Fig. 2　Inhibitory effect of cell adhesion by adenovirus-mediated gene transfer（C26：murine colon carcinoma cells Colon 26, F2：murine vascular endothelium-derived cells）

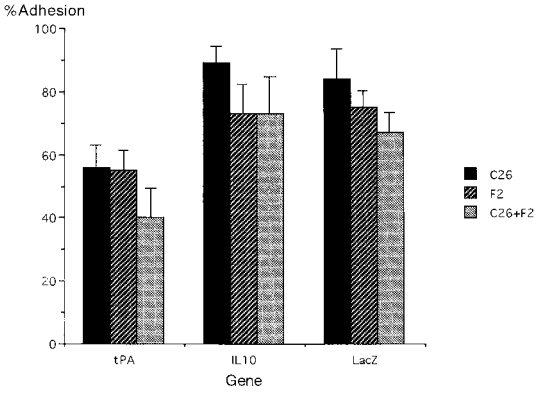


Fig. 3 Survival of mice with hepatic metastasis after adenovirus-mediated gene transfer to Colon 26

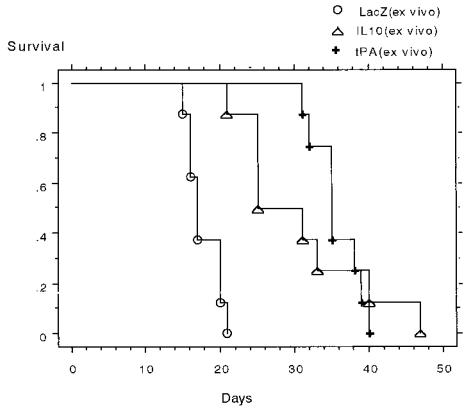
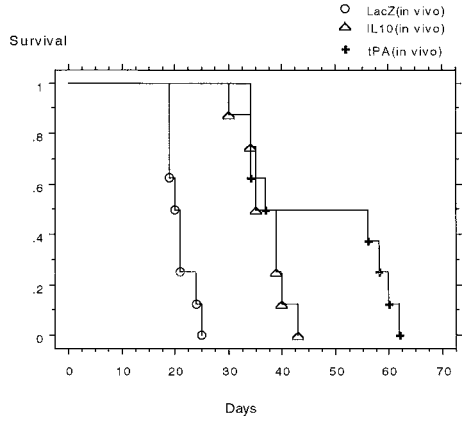


Fig. 4 Survival of mice with hepatic metastasis after adenovirus-mediated gene transfer to the liver

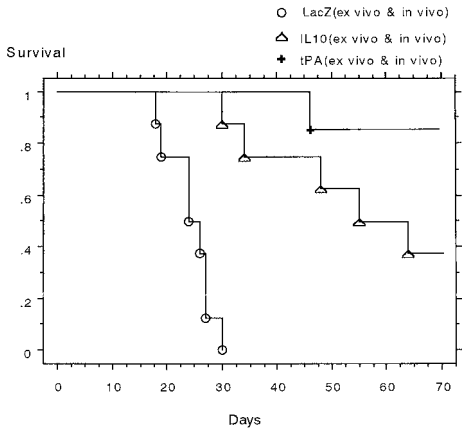


遺伝子導入群では平均生存21.0日であった．一方，IL10遺伝子導入群では，36.88日，tPA遺伝子群では，46.88日であり，IL10，tPA遺伝子導入群の生存日数は，有意に延長した（**Fig. 4**）．腫瘍への遺伝子導入と肝臓への遺伝子導入を併用した場合，LacZ遺伝子では，24.38日であったが，IL10遺伝子では，53.25日，tPA遺伝子では，62.63日であり，IL10，tPA遺伝子導入群では有意に生存期間は延長した（**Fig. 5**）．

抗腫瘍免疫誘導：IL10，tPA遺伝子導入群における長期生存マウスを用いて，肝転移100日後に抗腫瘍免疫誘導の有無を検討したが，抗腫瘍免疫誘導は認められなかった．

2．IKB遺伝子およびCDDPによる肝転移抑制

Fig. 5 Survival of mice with hepatic metastasis after adenovirus-mediated gene transfer to both Colon 26 and the liver.



遺伝子発現：ウエスタンブロットでは，IKB遺伝子発現は，約40KDに認められ，3から5日をピークとして，1週間後より漸減した．コントロールとして，LacZ遺伝子導入を行った所，IKB発現は，1日後をピークとして漸減した．

細胞増殖への影響：IKB遺伝子導入後における細胞増殖能は，コントロールとほぼ同様であった．IKB遺伝子とともに，CDDPを用いた場合，CDDP濃度が2～4μg/mlにおいて，IKB遺伝子導入による増殖抑制効果が有意に認められた（**Fig. 6**）．

肝転移への影響：LacZ遺伝子導入後，肝転移を行った場合，マウス生存日数は，28.8日，IKB遺伝子導入群では，42.4日であり，IKB遺伝子導入により，有意に生存日数は延長した（**Fig. 7**）．CDDP 3mg/kgを併用した場合，LacZ遺伝子導入群は，33.2日，IKB遺伝子導入群では，55.1日であり，IKB遺伝子導入により有意に生存日数は延長した（**Fig. 8**）．死亡マウスにおける死亡原因は，全例癌死であった．

抗腫瘍免疫誘導：IKB群およびIKB+CDDP群での長期生存マウスを用いて肝転移100日後に抗腫瘍免疫誘導の有無を検討したが，抗腫瘍免疫は誘導されなかった．

討　論

悪性腫瘍に対する遺伝子治療は，欧米では多くのプロトコールで臨床試験が行われている．日本では，現時点では，腎癌に対するGMCSF遺伝子治療，肺癌に対するp53遺伝子治療が行われたのみである．切除不

Fig. 6　Synergistic effect by adenovirus-mediated IKB gene transfer and CDDP

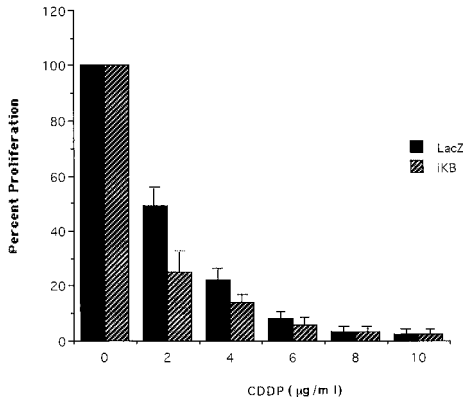


Fig. 7　Inhibitory effect of hepatic metastasis by adenovirus-mediated IKB gene transfer

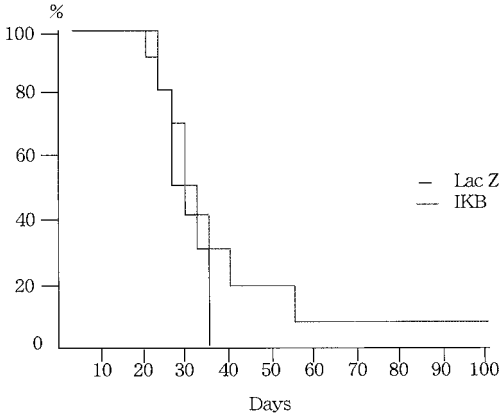
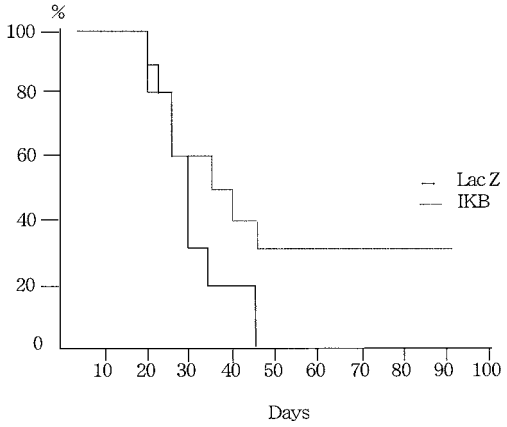
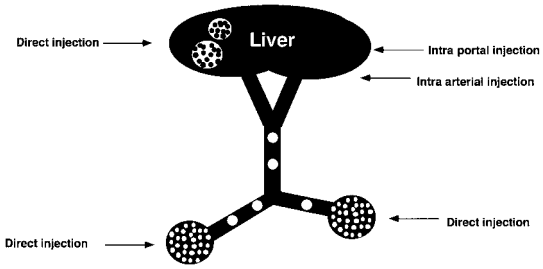


Fig. 8　Inhibitory effect of hepatic metastasis by the combination with adenovirus-mediated IKB gene transfer and CDDP



能原発性および転移性肝臓癌は，遺伝子治療の適応と考えられている．本研究では，外科手術後の転移抑制に対する遺伝子治療の可能性を検討した．今回の結果から，転移抑制に対する遺伝子治療の方法として，1）tPA，IL10遺伝子の腫瘍組織および肝臓への遺伝子導入が肝転移抑制に有効であること，2）IKB 遺伝子の腫瘍組織への遺伝子導入により，肝転移が抑制されるとともに，CDDP に対する抗癌剤感受性を上げることが可能であること，が示唆された．TPA は，血栓溶解物質として知られているが，最近の報告では癌の悪性度と大きな関係があり，癌の転移・浸潤と関連することが報告されている[10]．以前の我々の報告では，レトロウイルスベクターを用いて tPA 遺伝子を腫瘍細胞へ遺伝子導入すると，肝転移が著明に抑制されることが証明されている[11]．今回の細胞接着実験から，tPA 遺伝子導入により，腫瘍細胞と血管内皮細胞の細胞接着が著明に抑制された事実から， tPA 遺伝子導入は，細胞接着抑制というメカニズムにより，転移抑制を誘導すると考えられる．今回の研究からは，IL10遺伝子導入による肝転移抑制メカニズムは明らかではないが，転移形成にマクロファージなどの免疫担当細胞からのサイトカインが大きな役割を果たすと考えられているので，IL10はマクロファージに対する作用により，間接的に転移抑制に働いている可能性が考えられる．今後さらなる検討が必要と考えている．IKB は，細胞内転写制御因子として重要な役割を果たしている NF-kappa B（NFKB）の細胞内阻害因子として知られている．また，NFKB は，サイトカイン産生，細胞接着因子発現と大きな関連を有している．今回の研究から，1）IKB 遺伝子導入は，肝転移抑制に有用であること，2）CDDP との併用により効果が増強すること，が示唆された．文献によれば，IKB 過剰発現により，腫瘍細胞の成長阻害やアポトーシスが誘導できると報告されている[12]．しかし，腫瘍細胞の種類により NFKB の発現状態が異なっており，IKB 過剰発現による効果に影響することが報告されている．我々の用いた細胞では，CDDP 添加により NFKB 発現が誘導されたと考えるならば，IKB 遺伝子導入と CDDP 併用で相乗効果が認められた説明となるであろう．今後詳細なメカニズムを検討する必要がある．今回行った研究から，転移抑制のための遺伝子治療戦略を立てると次のようになる．術前または術中に切除予定の腫瘍組織に，局所

Fig. 9 Strategy for the inhibition of hepatic metastasis by gene therapy



投与により遺伝子導入を行い，同時に肝臓へ動注ないしは門注で遺伝子導入を行う．術後抗癌剤投与を併用し，さらなる抗腫瘍効果をねらう（**Fig. 9**）．

我々はこれまでin vivo遺伝子治療におけるアデノウイルスベクターの有用性を報告してきたが，現時点でのベクターは，選択的な遺伝子導入が困難であり，特に経血管的に遺伝子導入を行うには改良が必要である．以前の報告では，組織特異的プロモーターの有用性が報告されていたが，最近の報告では，遺伝子導入組織とCARの発現との関連が示唆されており，トロピズムを変えるという方向で研究が行われている[13]．選択的遺伝子治療を実現するためにさらなる研究が必要であるが，現時点での肝癌遺伝子治療では，局所投与に，動注ないし門注などの経血管内投与を組み合わせて，投癌剤を併用するという戦略が最も合理的と考えている．

文　献

1）Culver KW, Ram Z, Wallbridge S et al：In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of eaperimental brain tumors. Science **3**：1550—1552, 1992
2）Tahara H, Zeh HJZ, Stokus WJ et al：Fibroblasts genetically engineered to secret interleukin-12 cansuppress tumor growth and induce anti-tumor immunity to a murine melanoma in vivo. Cancer Res **54**：182—189, 1994
3）Caruso M, Panis Y, Gagandeep S et al：Regression of established macroscopic liver metastasis after in situ transduction of a suicide gene. Proc Natl Acad Sci USA **90**：7024—7028, 1993
4）Chen SH, Chen XHL, Wang Y et al：Combination gene therapy for liver metastasis of colon carcinoma in vivo. Proc Natl Acad Sci USA **92**：2577—2581, 1995
5）Hayashi S, Emi N, Yokoyama I et al：Inhibition of establishment of hepatic metastasis in mice by combination gene therapy using both herpes simplex virus-thymidine kinase and granulocyte macrophage-colony stimulating factor genes in murine colon cancer. Cancer Gene Ther **4**：339—344, 1997
6）Hayashi S, Nagasaka T, Namii Y et al：Mono and combination therapy with adenovirus-mediated IL12 gene therapy and CDDP for multiple hepatic metastasis from murine colon cancers. Ist Annual Meeting in American Society of Gene Therapy（Abstract），1998, p223
7）Namii Y, Hayashi S, Yokoyama I et al：Evidence that the adenoviral vector containing the CTLA4 Ig gene improves transgene expression and graft survival. Transplant Proc **29**：1738—1739, 1997
8）Guang-Lin M, Hayashi S, Yokoyama I et al：Adenovirus-mediated gene transfer of CTLA4Ig gene results in prolonged survival of heart allograft. Transplant Proc **30**：2923—2924, 1998
9）Miyake S, Makimura M, Kanegae Y et al：Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal Protein complex and a cosmid bearing full-length virus genome. Proc Natl Acad Sci USA **93**：1320—1324, 1996
10）Ganesh S, Cornelis FM, Griffioen G et al：Prognostic relevance of plasminogen activators and their inhibitors in colorectal cancer. Cancer Res **54**：4065—4071
11）Hayashi S, Yokoyama I, Namii Y et al：Inhibitory effect on the establishment of hepatic metastasis by transduction of the tissue plasminogen activator gene to murine colon cancer. Cancer Gene Ther **1999**：380—384, 1999
12）Sumitomo M, Tachibana M, Ozu C et al：Induction of apoptosis of cytokine-producing bladder cancer cells by adenovirus-mediated IKB overexpression. Hum Gene There **10**：37—47, 1999
13）Douglas JT, Rogers BE, Rosenfeld ME et al：Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. Nature Med **14**：1574—1578, 1999

Gene Therapy for Hepatic Metastasis

Shuji Hayashi and Akimasa Nakao
Department of Surgery II, Nagoya University, School of Medicine

Hepatic metastasis is an important factor to limit the prognosis of patient with abdominal malignancies. In this study, the authors examined the effect of gene therapy on the inhibition of hepatic metastasis after abdominal surgery using adenoviral vectors. After adenoviral vectors with tissue plasminogen activator (tPA), interleukin-10 (IL-10), and I Kappa beta (IKB) cDNAs were transduced to the liver and/or cancer cells, the experiments on hepatic metastasis were performed. The findings demonstrated that adenovirus-mediated gene transfer with tPA or IL-10 cDNA was effective in the suppression of hepatic metastasis. especially by transduction to both the liver and cancerous tissue, and that hepatic metastasis was synergistically inhibited by using both IKB cDNA and CDDP. In conclusion, gene therapy for the liver and cancer tissue is not only feasible but also a novel strategy to inhibit hepatic metastasis after abdominal surgery.

Key word：gene therapy, hepatic metastasis

〔Jpn J Gastroenterol Surg 33：543—548, 2000〕

Reprint requests：Shuji Hayashi　Department of Surgery II, Nagoya University, School of Medicine
65 Tsurumai, Showa-ku Nagoya, 466-8506 JAPAN