

遺伝子導入により作製した drug delivery system による tumor dormancy therapy

東北大学医学部第1外科

砂村 眞琴 Dan G. Duda 島村 弘宗 元井 冬彦
八岡 利昌 渋谷 和彦 武田 和憲 松野 正紀

遺伝子導入した線維芽細胞を drug delivery system (DDS) として用い tumor dormancy therapy への応用の可能性を検討した . ヒト膀胱癌株 PK-1 , SCID マウスを実験に用いた . NIH3T3線維芽細胞に IL-12遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入し , IL-12を持続的に産生する drug delivery cell (IL-12/3T3) を作製した . soluble VEGF receptor (s-flt1) , brain specific angiogenesis inhibitor 1 (BA11) の cDNA を組み込んだアデノウイルスベクター (Axf1t , AxBA11) を作製した . マウス背部に透明窓を装着 , 同部に腫瘍を移植して腫瘍血管新生過程を解析した . IL-12/3T3は血管新生を抑制し , この作用は抗 IFN- γ 抗体で消失した . IL-12により IP-10 , IFN- γ の発現が誘導され , VEGF および bFGF の発現は低下した . Axf1t , AxBA11は腫瘍血管新生と腫瘍増殖を有意に抑制した . IL-12を産生する DDS には抗腫瘍効果が認められ , s-flt1や BA11もこのシステムに応用可能なことが判明した .

はじめに

Folkman が提唱した tumor dormancy therapy により癌治療に対する考え方が変貌してきている¹⁾. われわれも , matrix metalloproteinase inhibitor や fumagilin 誘導体 TNP470により tumor dormancy を誘導できることを報告してきた²⁾. この tumor dormancy の概念は単に腫瘍血管新生の抑制にとどまらず , 抗癌剤を用いた治療や , 免疫療法に対しても影響を及ぼしてきている . Tumor dormancy therapy で問題となる大きなポイントは , この治療では癌細胞の増殖を抑制するものの癌細胞自体は残存しているため , 腫瘍の増殖とこれを押さえる治療のバランスが一度崩れれば再び腫瘍の増殖を招くという点である . このため , 薬剤投与を中断することはできず , 薬剤の服用を継続しなければならない . このことは患者自体にも過度の負担をかけるが , 同時に医療経済的にも問題となる .

一方 , 分子生物学の進歩により , さまざまな物質の遺伝子情報が明らかとなり , 目的とする蛋白を人工的

に産生する事が可能となっている . この技術を用いることにより , 特定の細胞を用いて継続的に目的とする産物を分泌させることができる . すなわち , 患者自身の細胞に治療効果が期待できる物質の遺伝情報を導入しこの細胞を drug delivery system (DDS) 化することが可能となっている . この DDS を用いることにより , 患者の目標とする局所で治療効果のある物質の濃度を一定に保つことが可能となれば , tumor dormancy の維持も可能となり , 薬剤の服用といった精神的かつ経済的負担が飛躍的に軽減できる .

著者らは , 腫瘍血管新生を標的とした DDS の作製が可能であることを Interleukin 12 (IL-12) を用いてすでに報告している³⁾. 本稿では , 従来腫瘍免疫の面から注目されていたが血管新生抑制作用も存在することが明らかとなった IL-12を中心に述べ , 血管新生因子 VEGF のレセプターで最もアフィニティーが強い flt-1 の soluble form (s-flt1)⁴⁾と , p53により脳で特異的に発現し , 血管新生抑制作用が報告されている brain specific angiogenesis inhibitor 1 (BA11)⁵⁾を用いた結果についても触れる .

対象と方法

1) 細胞とベクター

ヒト膀胱癌株 PK-1 , マウス血管内皮細胞 KOP2.16を実

* 第55回日消外会総会シンポ9・消化器癌における tumor dormancy therapy

< 2000年12月19日受理 > 別刷請求先 : 砂村 眞琴

〒980 8574 仙台市青葉区星陵町1 1 東北大学医学部第1外科

験に用いた。NIH3T3線維芽細胞に IL-12遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入し、IL-12を持続的に産生する drug delivery cell (IL-12/3T3) を作製した。s-flt1, BA11の cDNA を組み込んだアデノウイルスベクター (Axflt, AxBA11) を作製した。

PK-1は RPMI 1640 (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) を用いて培養した。IL-12の細胞増殖に及ぼす影響を評価するために、IL-12/3T3の上清を加えて細胞増殖を検討した。

2) サイトカインの測定

線維芽細胞 NIH3T3, IL-12/3T3そして血管内皮細胞 KOP2.16 腫瘍細胞 PK-1からの IL-12産生量を ELISA キット (Endogen Inc. Wobun, MA) を用いて測定した。

3) 実験動物と腫瘍増殖の評価

6~8か月の雄性 SCID マウス (Fox Chase C. B-17/lcr-SCID Jcl) を実験に用いた。動物実験に当たっては東北大学の動物実験に関するガイドラインに従った。動物実験ではラビット抗 asialo GM-1抗体 (Wako, Tokyo, Japan) を尾静脈から100 μ l を週2回投与した。IFN- γ 抗体 (α -IFN- γ R4-GA2) は200 μ l を1日おきに静注した。

SCID マウスの背部に5 \times 10⁶個の PK-1を移植した。また、同数の IL-12/3T3と PK-1を移植した群、またこの移植の前に抗 IFN- γ 抗体で処置した群と腫瘍増殖を比較した。

4) 腫瘍血管新生の観察

腫瘍血管新生は、SCID マウス背部にチタニウム製の透明窓を装着、透明窓内に PK-1を移植して皮下血管網における血管新生過程を生体顕微鏡観察システムを用いて経時的に解析した。PK-1移植後11日目に周囲に発達した腫瘍血管網を確認した後、IL-12/3T3を移植した。その反対側に NIH3T3を移植した。Axflt, AxBAI をおのおの感染させた PK-1を同様に移植して腫瘍血管新生の観察を行った。

5) 組織染色

腫瘍は摘出しパラフィンで固定後 H&E 染色を行った。また、凍結切片を用い Lectin 染色と Tdt-labeling (Apoptosis Detection Kit, Wako, Tokyo, Japan) を用いて TUNEL 染色を行った。増殖指数はマウス抗 ki-67モノクローナル抗体 (Immunotech, Marseille, France) を用いた ki-67染色にて求めた。

6) RT-PCR

PK-1および KOP2.16を混合培養し、これに IL-12/3

T3細胞培養液を加え、30分と2時間後に細胞を採取して Rneasy Mini Kit (Qiagen KK, Tokyo, Japan) を用いて RNA を抽出した。また、単独で培養した PK-1と KOP2.16からもそれぞれ RNA を抽出した。VEGF, bFGF, IP-10, IFN- γ およびコントロールとしての G3PDH のプライマーを作製し、RT-PCR を行った。

結 果

1) IL-12の産生量

PK-1, NIH3T3, KOP2.16のいずれからも IL-12の分泌は認めなかったが、IL-12/3T3からは細胞10⁶個あたり48時間で12.06ng/ml の IL-12分泌が認められた (Table 1)。

2) IL-12の細胞増殖に与える影響

腫瘍細胞 PK-1に IL-12/3T3培養液の量を徐々に増やして加え、4日間培養した。PK-1の増殖は IL-12を含んだ培養液の量に関わらず、ほぼ同様な増殖を示した (Fig. 1)。

3) IL-12による腫瘍増殖抑制効果

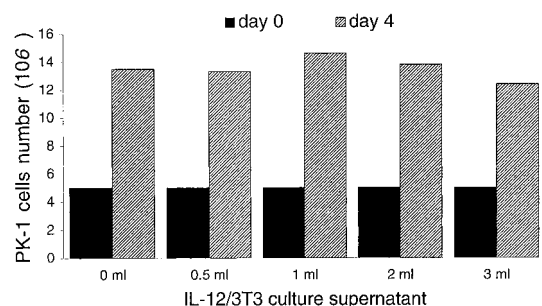
PK-1の腫瘍増殖は移植後20日目において、PK-1単独

Table 1

Cell line	IL-12 expression in culture supernatant (ELISA)
PK-1	N.D.* by 10 ⁶ cells/48h
IL-12/PK-1	1.1 pg/ml by 10 ⁶ cells/24h
NIH3T3	N.D. by 10 ⁶ cells/48h
IL-12/3T3	12.06 ng/ml by 10 ⁶ cells/48h
KOP 2.16	N.D. by 10 ⁶ cells/48h

* N.D.-not detectable

Fig. 1 PK-1 cell growth *in vitro* was not affected by the addition of IL-12 culture supernatant from IL-12 transfected fibroblasts, regardless of the dose used.



に比べ IL-12/3T3を加えた場合に有意に増殖抑制されることが示された(Fig. 2) . しかし , 抗 IFN- γ 抗体でマウスを処理すると , IL-12によって抑制された腫瘍増殖抑制効果が消失した .

4) IL-12/3T3による腫瘍血管制御

IL-12/3T3を移植した部位ではすでに形成されてい

た腫瘍血管網が破壊されていた . しかし , NIH3T3を移植した周囲の血管網には破壊像などは認められなかった(Fig. 3) . また , AxfIt , AxBAl をそれぞれ感染させた PK-1においては , どちらも顕著に腫瘍血管新生が抑制されていた .

5) 組織染色

Fig . 2 Subcutaneous tumor growth at day 20 after inoculation of 1×10^6 PK-1 cells was significantly (*p < 0.05) inhibited by the co-inoculation of 1×10^6 IL-12/3T3 cells. Administration of anti-IFN- γ antibody completely reversed this effect.

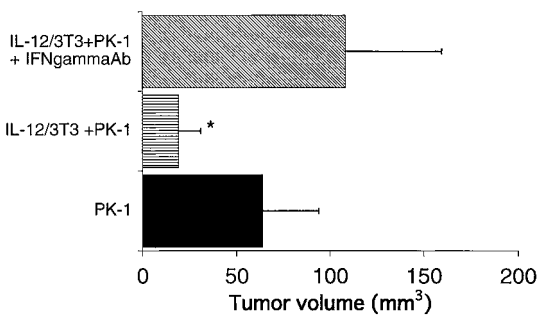


Fig . 3 PK-1 tumor angiogenesis in dorsal skinfold chamber of SCID mice. At day 11, we implanted IL-12/3T3 on the established PK-1 tumor. Total vessel disruption could be seen at day 17 in the IL-12/3T3 site.

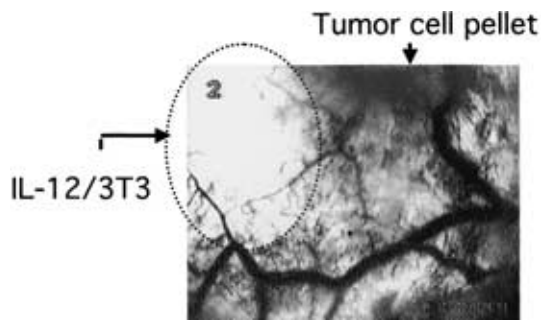


Fig . 4 Immunohistochemistry-examination of tumors grown in SCID mice. Lectin staining of tumor samples revealed a decrease in the number of microvessels in the co-inoculation group (PK-1+IL-12/3T3-A ; magnification, $\times 10$) sections as compared to wild type tumors (PK-1-B). TUNEL for apoptosis shows an increased apoptotic rate in samples from the co-inoculation group (C) as compared to wild type PK-1 tumor samples (D) ; magnification, $\times 40$.

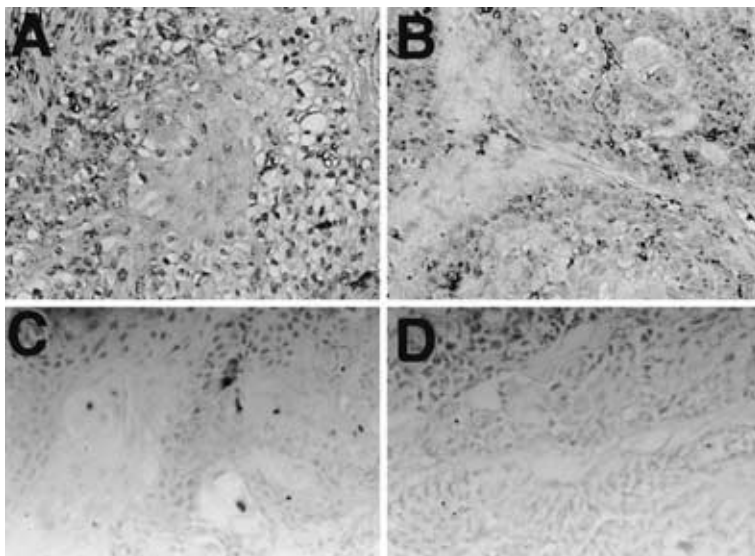
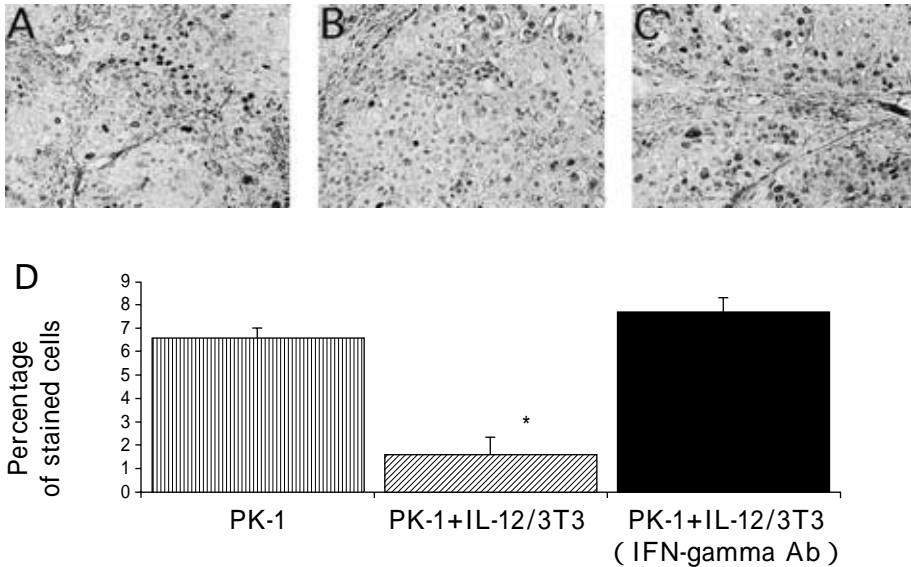


Fig . 5 Proliferation index using ki-67 staining(magnification, × 10)revealed that the presence of IL-12 decreased significantly the tumor proliferation rate in mice from the co-inoculation group(B) but not in tumors from the mice treated with anti-IFN-γ antibody (C). A represents control PK-1 tumor sample staining. The quantification of this staining is shown in D.



IL-12/3T3 (Fig. 4-A)は PK-1の腫瘍でみられる血管 (Fig. 4-B)の数を減少させることが判明した . また , IL-12/3T3を共移植した場合 (Fig. 4-C)には , apoptosisを起す細胞は PK-1の腫瘍 (Fig. 4-D)と比較し , その頻度が増加した . また , PK-1の腫瘍でみられた ki-67陽性細胞 (Fig. 5-A)は IL-12の作用により減少した (Fig. 5-B) . しかし , 抗 IFN-γ抗体で処理した場合には , ki-67陽性細胞は増加した (Fig. 5-C) . 組織検査の結果を定量化したものを Fig. 5-D に示した .

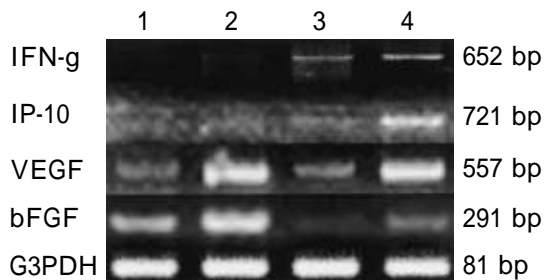
6) RT-PCR

IL-12により IFN-γと IP-10の発現が誘導された(Fig. 6) . 一方 , 血管新生因子である VEGF の発現は30分後に低下した . しかし , 2時間後には発現が回復している . bFGF も IL-12により発現が低下し , 2時間経過しても回復しなかった .

考 察

線維芽細胞から IL-12が分泌される DDS は , 局所において腫瘍血管新生を抑制するとともに , すでに形成されている腫瘍血管網も破壊した . これまでの多くの腫瘍血管新生に関する仕事が , 血管新生過程を標的としていたが , IL-12はすでに存在している腫瘍血管網を

Fig . 6 Results of RT-PCR using as template cDNA from PK-1(lane 1)KOP2.16 murine endothelial cells (lane 2) and from a mixture of these cells cultured in the presence of IL-12 for 30 min (lane 3) or 2 h (lane 4) IFN-γ and IP-10 and were induced by IL-12 as early as 30 minutes , and VEGF and bFGF levels of expression were suppressed by IL-12 . G3PDH was amplified as internal control .



も破壊する点で大変興味深い . この作用は , IP-10および IFN-γを介した作用であることは抗体を用いた実験から推察できる . IP-10は IFN-γやαによって誘導されるが , IL-12の直接作用によっても誘導できると考えら

れている。IFN- γ はIL-12の刺激によりPK-1とマウス血管内皮細胞であるKOPとの混合培養細胞から産生されているが、このIFN- γ はマウスの構造であるため、IFN- γ は血管内皮細胞から産生されたと結論できる。

IL-12はTリンパ球やNK細胞を刺激するサイトカインとして注目され、腫瘍免疫において中心的役割を果たすと考えられている。Taharaら⁶⁾はIL-12遺伝子導入線維芽細胞の有用性について報告しているが、著者らも、IL-12により腫瘍抗原特異的免疫応答の誘導が可能であることを証明した⁷⁾。また、最近臨床治験が開始されている樹状細胞を用いた抗腫瘍免疫療法においても、樹状細胞からIL-12が分泌されることが判明している⁸⁾。このIL-12を用いた癌治療の可能性が検討されたが、合成IL-12の臨床試験では強烈な副作用が問題となり、治験途中で中止となっている。今回のDDSから分泌されるIL-12の量はきわめて微量であり、副作用は問題ないと言える。この微量なIL-12で腫瘍血管を破壊することは可能であったが、局所の免疫応答を刺激し、抗原特異的な免疫反応を誘導できるかは明らかではない。

今回の論文では詳しく報告しないが、s-flt1やBA11もこのシステムに応用可能なことが推察できる。今後、癌の性格や治療法との組み合わせで、どのような血管新生抑制因子を併用することが好ましいかを検討し、このDDSに組み込む遺伝子を決定することが重要である。臨床応用の1つの例としては、手術前に患者の線維芽細胞を採取し、培養中に適切な抗腫瘍血管作用を有する遺伝子を導入し、手術の際に腫瘍を摘出したtumor bedにこの遺伝子工学で作製したDDSを置いてくる、といった方法が考えられる。ウイルスベクターの問題点、IL-12などの発現遺伝子のコントロール法が解決できれば今すぐにも臨床応用可能と考えられる。

血管新生抑制作用、抗腫瘍免疫活性化作用を有するIL-12の遺伝子を線維芽細胞に導入することにより腫

瘍増殖を抑制するDDSが作製できた。今回の検討により遺伝子工学を応用したtumor dormancy therapyの可能性が示唆された。

文 献

- 1) Folkman J : Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 43 : 175-203, 1985
- 2) Lozonchi L, Sunamura M, Kobari M et al : Controlling tumor angiogenesis and metastasis of C26 murine colon adenocarcinoma by a new matrix metalloproteinase inhibitor, KB-R7785, in two tumor models. *Cancer Res* 59 : 1252-1258, 1999
- 3) Duda DG, Sunamura M, Lozonchi L et al : Direct in vitro evidence and in vivo analysis of the anti-angiogenesis effects of interleukin 12. *Cancer Res* 60 : 1111-1116, 2000
- 4) Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A et al : Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 269 : 26988-26995, 1994
- 5) Nishimori H, Shiratsuchi T, Urano T et al : A novel brain-specific p53-target gene, BA11, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis. *Oncogene* 15 : 2145-2150, 1997
- 6) Tahara H, Zeh HJ 3rd, Storkus WJ et al : Fibroblasts genetically engineered to secrete interleukin 12 can suppress tumor growth and induce antitumor immunity to a murine melanoma in vivo. *Cancer Res* 54 : 182-189, 1994
- 7) Matsumoto G, Sunamura M, Shimamura H et al : Adjuvant immunotherapy using fibroblasts genetically engineered to secrete interleukin 12 prevents recurrence after surgical resection of established tumors in a murine adenocarcinoma model. *Surgery* 125 : 257-264, 1999
- 8) Lotze MT, Hellerstedt B, Stolinski L et al : The role of interleukin-2, interleukin-12, and dendritic cells in cancer therapy. *Cancer J Sci Am Suppl* 1 : S109-114, 1997

Tumor Dormancy Therapy Using Genetically Engineered Drug Delivery System

Makoto Sunamura, Dan G. Duda, Hiromune Shimamura, Fuyuhiko Motoi,
Toshimasa Yatsuoka, Kazuhiko Shibuya, Kazunori Takeda and Seiki Matsuno
First Department of Surgery, Tohoku University School of Medicine

Tumor dormancy therapy appears useful in treating cancer, but requires that a patient take medication during control of remnant cancer cells. To overcome this inconvenience to patients, drug delivery using genetically engineered cells has become an alternative. Interleukin-12 is both a key regulator of the immune response, particularly that involving CTL and NK cells, and an antiangiogenesis agent. We report the usefulness of the drug delivery of fibroblasts genetically engineered to secrete this cytokine to control angiogenesis in human pancreatic tumors in NK-depleted SCID mice. We evaluate the antiangiogenesis of soluble VEGF receptor (s-flt1) and brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) Although the *in vitro* growth of tumor cells was not affected by the presence of IL-12, coinoculation of IL-12 secreting fibroblasts strongly inhibited tumor growth in immunodeficient mice. Neovascularization surrounding the tumor was markedly inhibited where IL-12-secreting fibroblasts were implanted, suppressing tumor growth. Lectin staining in tumor sample sections also showed a significantly reduced number of vessels. The RNA expression of IFN- γ and its inducible antiangiogenic chemokine IP-10 was stimulated in endothelial cells cultured with IL-12. We also found that IL-12 downregulated the expression of endothelial cell mitogens VEGF and bFGF. Antitumor effect and antiangiogenesis of s-flt1 and BAI1 were also demonstrated.

Key words : drug delivery system, tumor dormancy, pancreatic cancer

[Jpn J Gastroenterol Surg 34 : 425 430, 2001]

Reprint requests : Makoto Sunamura 1ST Department of Surgery, Tohoku University School of Medicine
1 1 Seiryō-cho, Aoba-ku, Sendai, 980 8574 JAPAN
