

癌抑制遺伝子の難治性癌遺伝子治療への 応用に関する基礎的研究

江里口正純*

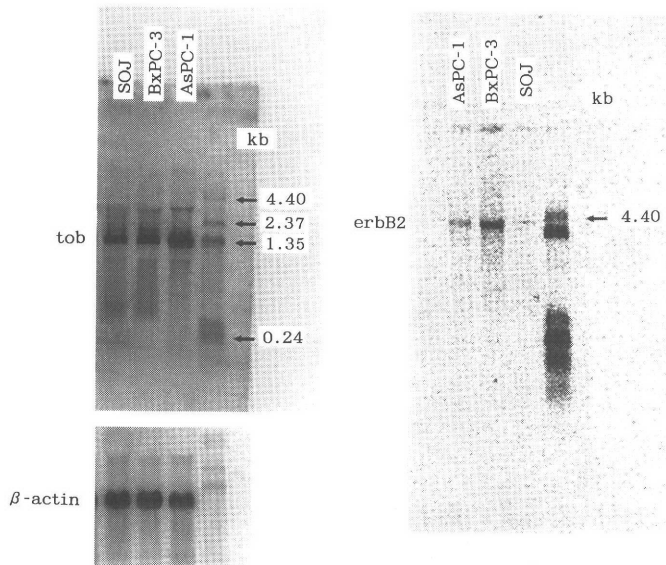


Fig. 1 Expression of tob, β -actin and erb B-2 mRNA in pancreatic cancer cell lines. Total RNA was extracted and processed for Northern blot analysis as described in Materials and Methods. Ten μ g of RNA were loaded in each lane.

[目的] Tob は, Erb B-2 を含むチロシンキナーゼ型受容体と結合し, 腫瘍増殖抑制をきたす新規蛋白である. Erb B-2 のリン酸化は, Shc と反応した後, Ras シグナルを伝達し, 癌化へと進んでいく. Tob は, 345 アミノ酸より成る約 45 kDa の蛋白質であり, cyclin dependentkinase 2 と cyclin E との反応を抑制することによって, retinoblastoma gene (Rb gene) 産生蛋白のリン

酸化を促し, 細胞周期の G 1 arrest を引き起こすことによって細胞増殖抑制活性を起こしている. Tob 蛋白は, 細胞増殖抑制蛋白 BTG-1, BTG-2 と相同性を示し, 現在までに 5 個の Tob ファミリーが同定されている. Tob を over expression させた NIH 3 T 3 細胞は増殖抑制を示した. 今回筆者らは, 膵癌細胞における Tob 遺伝子の発現を測定し, さらに, 膵癌細胞に Tob 遺伝子を導入し, 細胞増殖抑制効果を *in vitro*, *in vivo* において検討した. また, 膵癌細胞に p 53 遺伝子を導入し,

* 東京大学医科学研究所外科

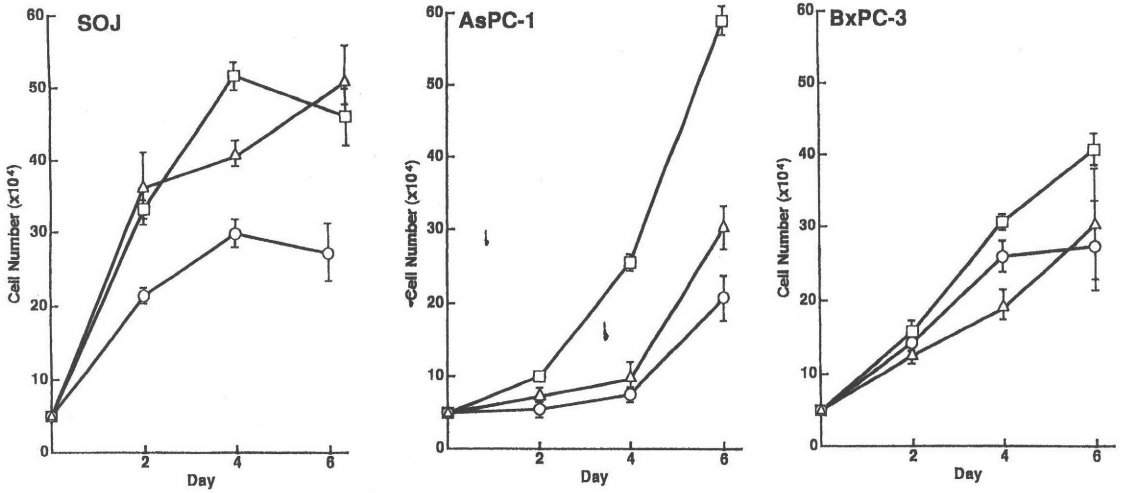


Fig. 2 a Tumor suppressor effect of the *tob* gene.

Three human pancreatic cancer cell lines, AsPC-1, BxPC-3, and SOJ were transfected with AdCALac Z (○—○) or AdCA *tob* (△—△) at a MOI of 20. Medium only (□—□) is also shown. These cancer cells were able to be transfected with MOI 20 without adeno-viral virulence. The number of live cells were counted at the indicated days after transfection. The results are represented as means ± SD from three independent experiments.

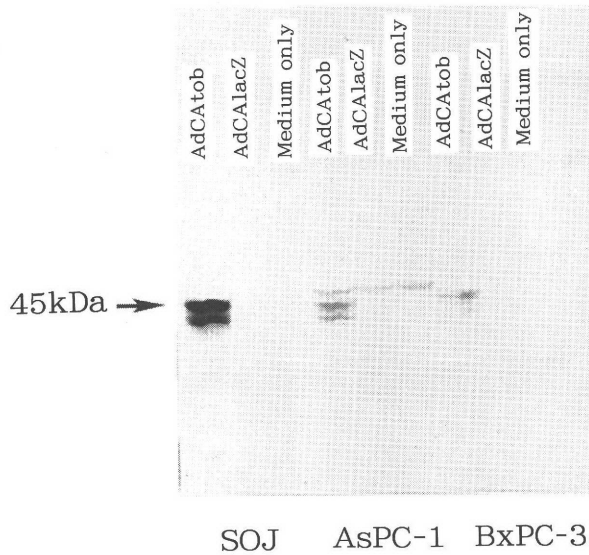


Fig. 2 b Western blot analysis of lysates of pancreatic cancer cell lines after transfection of AdCALac Z or AdCA-*tob* using the anti-Tob monoclonal antibody
A 45kDa band was detected in three cell lines. The magnitude of the expression of *tob* gene is correlated to the tumor growth suppressive activity.

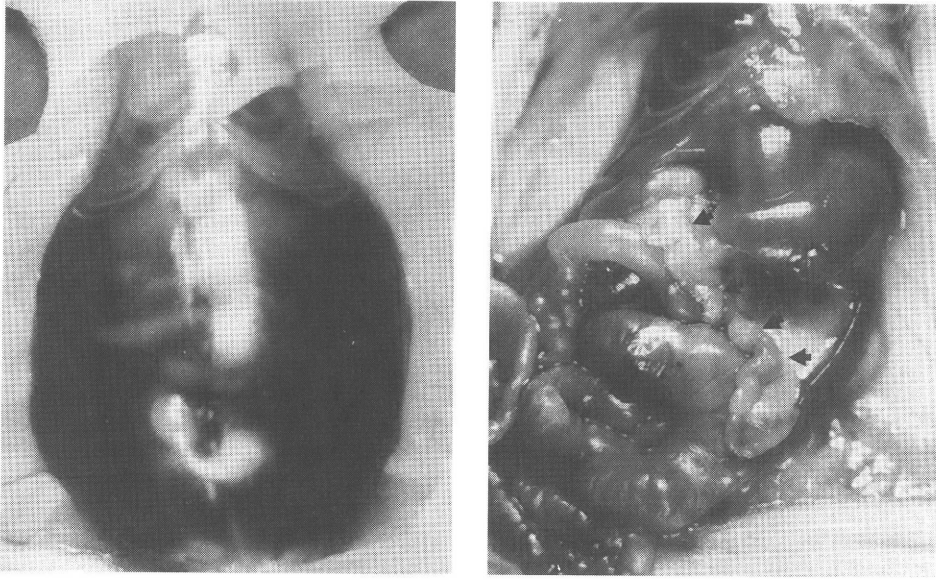
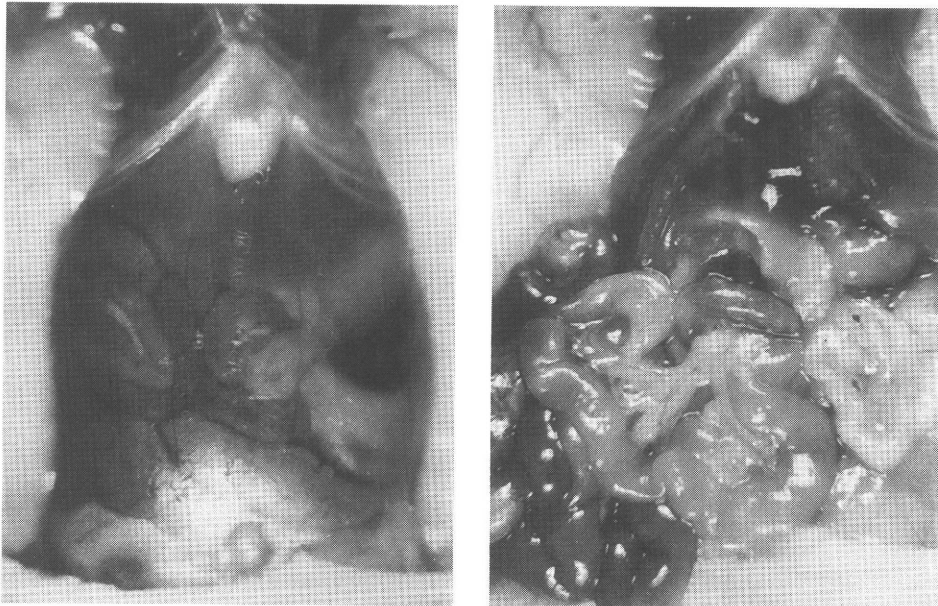
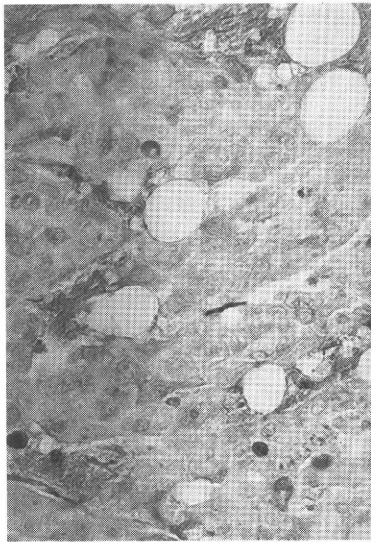


Fig. 3 Morphological findings of tumor treated with AdCA_{tob} vector

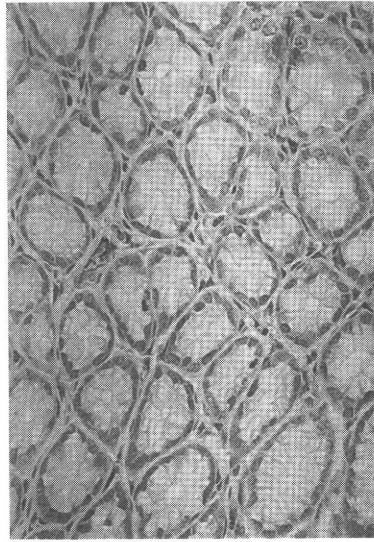
Non-treated control: The mice were performed intraperitoneal injections of AdCA *tob* (5×10^7 or 1.5×10^8 pfu/0.2ml/day, from day 5 to day 9) after 4 days of intraperitoneal injection of AsPC-1 cells (2×10^6 , doubling time 2-3 days). Bloody ascites and multiple tumor nodules were seen at the methotarium after 16 days with 2×10^6 .



AdCA *tob* treated: Intraperitoneal injection of AdCA *tob* suppressed the tumor nodule formations in abdominal cavity compared with non-treated group. Bloody ascites was not seen in the AdCA *tob* treated mice.



A-1: AdCA Tob transfection



B-1: Jejunum

Fig. 4 Pathological findings of tumor treated with AdCA *tob* vector *in vivo*.

Only one tumor nodule was recognized in the abdominal cavity in the AdCA *tob* (5×10^7 pfu) treated groups, and not be found in 1.5×10^8 pfu groups. The tumor had continued to express the Tob-protein with staining by anti-Tob monoclonal antibody, 4 B-1 (A-1). The tumors of nontreated control and AdCA *lac Z* transfected groups were showed only a few endogeneous Tob protein. The jejunum (B-1), methoterium, acinal gland and Langerhans islet of pancreas did not show the expression of exogeneous Tob-protein with AdCA *tob* transfection.

細胞増殖抑制効果を同様に検討した。

【方法】 1: ヒト膵癌細胞 AsPC-1, BxPC-3, SOJ について RNA を抽出し, Northern blotting を行い, Tob 遺伝子の発現を検討した。Tob cDNA および p 53 cDNA を組み込んだ adeno virus vector (AdCA *tob* & AdCMV *p53*) をヒト膵癌細胞 AsPC-1 細胞に transfect し, 癌細胞の増殖率を検定した。

2: SOJ, AsPC-1 膵癌細胞をヌードマウスの腹腔内に注射し, 癌性腹膜炎モデルを作成した。In vitro の抑制効果を基に, in vivo において癌性腹膜炎に対する AdCA *tob* および AdCMV *p53* の治療効果を検討した。

【結果】 ヒト膵癌細胞 AsPC-1, BxPC-3, SOJ について RNA を抽出し, Northern Blotting を行い, 内因性 Tob 遺伝子の発現を検討すると, AsPC-1, BxPC-3, SOJ の順で強く発現していた

(Fig. 1)。また, Western blotting を行い蛋白レベルでも同様に, 内因性 Tob 遺伝子の発現を認めた。

ヒト膵癌細胞における adeno virus の感染効率を検討するため, Iac-ZcDNA を組み込んだ adeno virus vector を感染させ, X-gal 染色を用いて行った。膵癌株 AsPC-1, SOJ においては, MOI 20 において, ウイルス毒性なく, ほぼ 100% の感染率を認めた。さらに, Tob cDNA を組み込んだ adeno virus vector (AdCA *tob*) を作製した。AdCA *tob* の titer は 3.5×10^8 cpf/ml まで高めることができた。Tob 遺伝子を組み込んだ adeno virus vector (AdCA *tob*) を増殖させ, ヒト膵癌細胞に transfect させ, 増殖抑制効果を in vitro で検討した。MOI 20 では, SOJ, AsPC-1, BxPC-3 の順で増殖抑制効果を認め (Fig. 2 a), Western blotting において抑制効果に比例して

Table 1 Inhibition of the formation of pancreatic cancer peritonitis with Adeno-virus mediated *tob* gene transfer *in vivo*

Treatment group	Animal number	Tumor nodules	Ascites
AdCA <i>tob</i> (1.5×10^8 pfu)	1	Not detected	Afew, Serous
	2	Not detected	Afew, Serous
	3	Not detected	Afew, Serous
	4	Not detected	Afew, Serous
AdCA <i>tob</i> (5×10^7 pfu)	1	Not detected	Afew, Serous
	2	1	Afew, Serous
	3	Not detected	Afew, Serous
AdCA <i>lac Z</i> (1.5×10^8 pfu)	1	Not detected	Afew, Serous
	2	2	Afew, Serous
	3	2	Afew, Serous
AdCA <i>lac Z</i> (5×10^7 pfu)	1	Not detected	Afew, Serous
	2	2	Medium, Turbid
Non-treated (1.5×10^8 pfu)	1	Multiple	Full, Bloody
	2	Multiple	Full, Bloody
	3	Multiple	Full, Bloody

Despite the observed heterogeneity for individual animals, a significant tumor growth inhibitory effects of AdCG *tob* has been noted.

Tob 蛋白の発現増強を認めた (Fig. 2 b). Tob 蛋白の発現した細胞は、細胞の膨化と細胞質内の顆粒を認め、形態的に senescence な変化、すなわち膨化し細胞死の状態に陥っていた。

p53 癌抑制遺伝子を組み込んだ adeno virus vector (AdCMV *p53*) をヒト膵癌細胞に transfect させ、増殖抑制効果を *in vitro* で検討した。MOI 5 においても、SOJ, AsPC-1, BxPC-3 いずれの細胞でも増殖抑制効果を認め、強力な腫瘍抑制作用を確認した。

膵癌による癌性腹膜炎は、生命予後をも左右する治療困難な病態である。SOJ, AsPC-1, 膵癌細胞をヌードマウスの腹腔内に注入し癌性腹膜炎モデルを作成した。SOJ (5×10^6 , 1×10^7) を注入すると 16 日目に腸管膜に腫瘍小結節を形成した。AsPC-1 (2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7) を注入すると 16 日目において血性腹水を伴う多数の腫瘍結節を形成した。In vitro の抑制効果を基に、*in vivo* において癌性腹膜炎に対する AdCA *tob* および AdCMV *p53* の治療効果を検討した。このため、血性腹水を伴う癌性腹膜炎モデルとして AsPC-1 膵癌株を用い、 2×10^6 個 AsPC-1 細胞を腹腔内注入後、5 日目より 5×10^7 pfu/day のアデノウイル

スベクター (AdCA *tob* および AdCMV *p53*) を連続 5 日間腹腔内投与し、16 日目に開腹し、腹水の有無、腫瘍結節の有無を観察した。AdCA *tob* 注入群および AdCMV *p53* 注入群では、腫瘍の増殖抑制効果を認め、血性腹水および腫瘍結節の形成を認めなかった (Fig. 3)。また、AdCA *tob* 注入群において縮小した腫瘍および正常小腸を抗 *tob* monoclonal 抗体にて免疫染色すると、腫瘍において *tob* 蛋白の発現を認めた (Fig. 4)。正常小腸組織においては発現を認めなかった。コントロールの AdCA *lac Z* 注入群においても、同様の抑制効果を認めたが、AdCA *tob* 注入群に比較すると弱かった (Table 1)。また、AdCA *p53* 注入群では、アデノウイルスによると思われる全身発赤、衰弱などの症状が数匹に見られ、今後のアデノウイルスを用いた遺伝子治療における投与法の改善が必要と思われた。

さらに、*in vitro* において AdCA *tob* と、AdCMV *p53* の double transfection においては、AdCA *tob* 単独投与よりも腫瘍増殖抑制効果の増強を認めた。Double transfection により相乗効果も期待でき、MOI を下げることにより、アデノウイルスの毒性を軽減する可能性もでてきた。今後、

AdCA *tob* および AdCMV *p53* を用いた遺伝子治療において、投与方法、相乗効果の機構解析を行なっていきたい。

[結論] 細胞増殖抑制遺伝子 *tob* を導入することにより膵癌細胞の増殖抑制効果が認められた。今後、膵癌細胞において *Tob* 遺伝子と *Erb B-2* 遺伝子の発現における関係、*Tob* 蛋白の作用部位および増殖抑制機構の解明を図りたい。

膵癌の癌性腹膜炎は生命予後を左右する重篤な病態であり、この病態の発生を阻止する治療法の一つとして、遺伝子治療を進めていきたい。

文 献

- 1) Yanagie H, Eriguchi M et al.: Tumor growth suppression by the adenovirus-mediated introduction of a novel growth suppressing gene, *tob*, in pancreatic cancer peritonitis model *in vivo*. Proceedings of 4th European Conference on Gene Therapy of Cancer, (in press).
- 2) Yanagie H, Eriguchi M et al. Inhibition of Human Pancreatic Cancer Growth by the Adenovirus-Mediated Introduction of a Novel Growth Suppressing Gene, *tob*, in Vitro, Gene Therapy of Cancer (ed. P Walden), Plenum Press, 1998, p 91-96.