

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名 前花 祥太郎



論 文 題 目

「遺伝子改変細胞を用いた細胞治療と治療遺伝子の探索」

指 導 教 授 承 認 印

北里 英 郎



## 【背景】

現在、がんの治療法は外科的治療、化学療法および放射線療法が一般的である。近年では、がんのヘテロジェネイティーの概念や転移前ニッチ形成の概念によりがんの複雑性が問題視される。一方で、分子標的薬による化学療法の進歩や抗 PD-1 抗体や遺伝子改変 T 細胞によるがん免疫治療の登場などが登場し、これらに柔軟に対応できる治療法の開発が期待されている。本研究で行った細胞治療は、治療細胞として正常な細胞に治療遺伝子を導入し、その治療細胞を体内に移植することで疾患を治療する。細胞治療の利点として、体内で定着した治療細胞が病巣局所で持続的に産生することで、治療物質が高濃度に維持される。今回我々はがん治療における治療物質として、可溶性血管内皮増殖因子受容体 sVEGFR-2 および sVEGFR-3、インターロイキン (IL-) 24 に着目した。

### A. 可溶性血管内皮増殖因子受容体 sVEGFR-2 および sVEGFR-3 による抗リンパ管新生抑制を目的とした細胞治療

がんは、その旺盛な増殖による局所での虚血状態を避けるために血管・リンパ管を新生し、酸素や栄養分とその老廃物の運搬ルートを確保することで転移、増殖を繰り返す。脈管系の発生・新生には様々な因子が関与することが知られているが、その主要な因子が血管内皮増殖因子 vascular endothelial growth factor (VEGF) ファミリーであり、リンパ管形成に関わる因子として VEGF-C 及び D が知られている。これらの因子の受容体は VEGF receptor (VEGFR) -2, 3 が知られており、MAP キナーゼによるシグナル伝達が内皮細胞の増殖に関与している。近年、リンパ管新生の機構が明らかになりつつあり、リンパ管新生が、がんのリンパ節転移を促進する重要なステップであるという概念が提唱された。がん細胞の中には VEGF-C を自ら産生するものが多く確認されており、リンパ管新生の抑制とリンパ行性転移のメカニズムの解明が期待されている。

今回我々は、VEGFR-2 のスプライスバリエントである可溶性 VEGFR-2 をマウス肺がん細胞 Lewis lung carcinoma (LLC) に導入することにより、sVEGFR-2 が腫瘍リンパ管新生を阻害し、センチネルリンパ節へのリンパ行性転移を抑制することを示した。また VEGFR-3 の VEGF-C との結合力が VEGFR-2 より高いことが報告されていることから、sVEGFR-3 によるリンパ管新生を抑制のさらなる効果が期待し、リンパ管新生に対する細胞治療にこれを使用した。今回レトロウイルスベクターを用いて sVEGFR-3 遺伝子を C57 線維芽細胞に導入することにより、sVEGFR-3 治療細胞を作製し、*in vivo* における細胞治療の効果を検討した。

## B.新規抗腫瘍性サイトカイン・インターロイキン 24 の作用解析

前立腺癌は、男性で頻度の高い悪性腫瘍であり、アメリカでは罹患率第一位、部位別死亡率第二位である。前立腺癌は痛みを伴わずに進行し、一部は積極的に骨に転移し死亡率を高める。またホルモン療法抵抗/去勢抵抗性のステージでは、基本的に治療が困難である。IL-24 はメラノーマ細胞の分化療法中に同定された遺伝子であり、melanoma differentiation associated gene-7 (mda-7) として発見された。IL-24 は脾臓や末梢血白血球、メラノサイト等で産生される単量体の糖タンパクであり、体内での半減期が 5 時間である。アデノウイルスベクターを介して細胞内で過剰発現させると、種々の癌細胞に対して増殖を抑制するが、正常細胞には影響を及ぼさないことが特徴とされる。しかし、その作用機序は完全には解明されていない。そこで今回 IL-24 をレトロウイルスベクターを用いて前立腺癌細胞内に導入し、作用機序を解析した。

## 【方法】

### A. sVEGFR-2 および sVEGFR-3 による抗リンパ管新生抑制を目的とした細胞治療

#### 1. sVEGFR 遺伝子のクローニング

Mouse sVEGFR-2 遺伝子は、199-2084 部位を mouse cDNA library より PCR にて、1981-2312 部位を人工合成にてそれぞれ作製し、両部位を制限酵素 *Hind* III サイトを用いて連結させることにより作製した。sVEGFR-2 全配列は、レトロウイルスベクター pDON-5 Neo の制限酵素 *Apa* I 及び *Bam* HI サイトにクローニングした (pDON-sVEGFR-2)。Human sVEGFR-3-Fc 遺伝子は、ヘルシンキ大学 (Translational Cancer Biology Research Program, Institute of Biomedicine, Biomedicine, Helsinki) の Dr. Kari Alitalo より譲渡された。sVEGFR-3 遺伝子は pDON-5 Neo の制限酵素 *Apa* I, *Not* I サイトにクローニングした (pDON-sVEGFR-3)。

#### 2. レトロウイルスを用いた遺伝子導入と治療細胞の作製

##### (1) レトロウイルスによる遺伝子導入

pDON-sVEGFR-2,3 をそれぞれパッケージング細胞 PT67 にトランスフェクションし、G418 添加メディウムを用いてセクションを行った (PT-67-sVEGFR-2,3)。PT-67-sVEGFR-2,3 細胞の培養上清中に産生される一過性の感染性を有する組み換えレトロウイルス DON-sVEGFR-2,3 を回収し、感染価を測定した。

## **(2) sVEGFR-2 導入 LLC 細胞の作製**

LLC (マウス肺がん細胞)は北里大学医学部薬理学研究室馬嶋正隆先生より譲渡された。LLC 細胞に組み換えレトロウイルス DON-sVEGFR-2 を  $MOI=10^{-4}$  で感染させ、G418 添加メディウムを用いてセクションを行い、LLC-sVEGFR-2 細胞を樹立した。対照として pDON-5 Neo を導入した細胞を樹立した (LLC-EV)。

## **(3) sVEGFR-3 治療細胞の作製**

C57 マウス胎児由来線維芽細胞 (RCB0558) は RIKEN BRC 細胞バンクより購入した。C57 細胞に組み換えレトロウイルス DON-sVEGFR-3 を  $MOI=10^{-4}$  で感染させ、G418 添加メディウムを用いてセクションを行い、治療細胞 C57-sVEGFR-3 を樹立した。対照として pDON-5 Neo を導入した細胞を樹立した (C57-EV)。

# **3. 動物モデルを用いた可溶性受容体の機能解析と細胞治療**

## **(1) 肺がん原発巣モデル**

LLC 細胞をマウス背部皮下組織に移植し、肺がん原発巣モデルを作製した。がん細胞移植 14 日後、形成した腫瘍組織を摘出し、mRNA 発現解析及び免疫組織化学染色による病理学的検討を行った。

## **(2)肺がん縦隔リンパ節転移モデル**

LLC 細胞をマウス左肺実質に同所移植し、同所肺がん転移モデルを作製した。がん細胞移植 10 日後、肺実質と周囲組織を摘出し、連続薄切した組織標本を HE 染色し、腫瘍細胞のマクロメタスタシスの有無を確認した。

## **(3) 細胞治療**

肺がん原発巣モデルに対し、がん細胞移植 7 日後に形成した腫瘍局所に、治療細胞を移植した。その後がん細胞移植 21 日まで腫瘍径を測定した。また組織 mRNA 発現及び病理学的検討はがん細胞移植 14 日目に摘出した腫瘍組織を用いた。

# **B.新規抗腫瘍性サイトカイン・インターロイキン 24 の作用解析**

## **1. IL-24 の前立腺癌細胞への導入**

ヒト前立腺がん細胞 DU145 に、human IL-24 遺伝子を組み込んだレトロウイルス DON-hIL-24 を  $MOI=10^{-4}$  で感染させ、G418 添加メディウムを用いてセクションを行い、DU145-hIL-24 細胞を樹立した。対照として pDON-5 Neo を導入した細胞を樹立した (DU145-EV)。

## 2. 細胞増殖の変化

DU145-hIL-24 の増殖能は WST-8 assay 及び BrdU ELISA assay により確認した。

## 3. 上皮系、間葉系遺伝子発現及び形態的变化の解析

DU145-hIL-24 細胞における上皮系マーカー及び間葉系マーカーの mRNA 発現量を real time PCR にて解析した。蛍光ファロイジンによりストレスファイバーを染色し、形態的变化を確認した。

### 【結果と考察】

#### 1. sVEGFR-2 導入による肺がんへの影響

肺がん原発巣モデルにおいて、LLC-sVEGFR-2 群では対照群と比較し、有意にリンパ管密度が抑制された。その反面で、LLC-sVEGFR-2 群は対照群と比較し、腫瘍成長に有意な差が認められなかった。肺がん縦隔リンパ節転移モデルにおいて LLC-sVEGFR-2 群では対照群と比較し、リンパ節転移が抑制された。このことから LLC 細胞は sVEGFR-2 により増殖抑制を受けず、がん間質におけるリンパ管新生抑制を介して、リンパ行性転移を抑制したことが示唆された。また原発巣では MMPs 遺伝子の抑制が認められた。リンパ管内皮細胞の起源の 1 つは炎症性マクロファージであることが知られており、VEGF-C 発現部位に集積するマクロファージの抑制にともない MMP-9 発現が減少したと考えられた。

#### 2. 肺がんモデルマウスに対する sVEGFR-3 細胞治療

C57-sVEGFR-3 細胞のリンパ管新生への作用を解析するため、がん細胞移植 7 日の肺がん原発巣モデルに対し、C57-sVEGFR-3 細胞を投与した。C57-sVEGFR-3 移植群ではがん細胞移植後 21 日において約 20% の腫瘍退縮が確認された。抗 CD31 抗体による CD31 陽性微小血管密度 (MVD) は減少傾向にあるものの有意な差は認められなかったが、Podoplanin 陽性リンパ管密度は有意に減少した。sVEGFR-3 治療細胞は sVEGFR-2 と同様に腫瘍リンパ管新生を抑制した。これに加え sVEGFR-3 は腫瘍増殖を抑制し、抗腫瘍効果も発揮した。VEGF-C/VEGFR-3 シグナルはリンパ管内皮細胞において MAP キナーゼ経路を介して細胞増殖を制御している。多くのがん細胞で VEGF-C 発現が確認されており、VEGFR-3 阻害剤の腫瘍の抑制も報告されている。VEGFR-3 の VEGF-C とのアフィニティが VEGFR-2 より高いことが報告されていることから、今回 sVEGFR-3 による VEGF-C のより効果的な阻害作用が、腫瘍増殖抑制に寄与したと考えられた。

## **B.新規抗腫瘍性サイトカインであるインターロイキン 24 の作用解析**

### **1. 前立腺癌細胞に対する IL-24 導入による抗腫瘍効果**

IL-24 の導入による細胞増殖能への影響を調べるため、in vitro において増殖能を比較したところ、DU145-hIL-24 細胞では、DU145-EV 細胞と比較し、細胞増殖が 70 %に有意に抑制され、抗腫瘍効果が確認された。

### **2. IL-24 導入の及ぼす前立腺癌細胞への影響**

DU145-hIL-24 細胞の形態は、密集して増殖し、扁平にフラスコに定着していた。この細胞形態の変化を解析するため、蛍光ファロイジンをを用いてアクチンフィラメントを染色した。蛍光ファロイジン染色の結果、DU145-hIL-24 細胞では、DU145-EV 細胞と比較し、アクチンフィラメントの形成が抑制された。このことから hIL-24 遺伝子の導入により、アクチンを重合し運動する能力が抑制されたことが示唆された。この変化をさらに解析するため、DU145-hIL-24 細胞の遺伝子発現変化を real time PCR にて解析した。DU145-hIL-24 では、DU145-EV 細胞と比較し、fibronectin 及び  $\alpha$ -SMA 発現量が有意に抑制されていた。これらの結果は、IL-24 遺伝子の導入により、前立腺癌細胞の基質非依存性に増殖・運動する性質の抑制が抗腫瘍効果の一因となっていることが示唆された。

## **【結論】**

今回 sVEGFR を用いた細胞治療と新規抗腫瘍性サイトカイン IL-24 の細胞治療への応用可能性を検討した。sVEGFR-2 遺伝子導入肺がん細胞を用いた検討においては、腫瘍リンパ管新生の抑制およびリンパ節転移の抑制を証明し、このことから VEGF-C を標的とした sVEGFR-2 の投与によりリンパ行性転移を抑制できる可能性を見出した。さらに sVEGFR-3 細胞治療により、リンパ管新生を阻害効果とともに腫瘍の増殖抑効果が得られ、新規治療法としての可能性が期待される結果が得られた。前立腺癌細胞への IL-24 遺伝子導入では、新たに IL-24 による上皮間葉転換の抑制作用を見出した。