

マウスモデルにおける肝臓に対するエレクトロポレーション法を用いたインターロイキン12による遺伝子治療

山下, 洋市
九州大学大学院医学研究院消化器・総合外科学（第2外科）

<https://doi.org/10.15017/7183629>

出版情報：福岡医学雑誌. 93 (8), pp.135-140, 2002-08-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



マウスモデルにおける肝癌に対するエレクトロポレーション法を用いたインターロイキン 12 による遺伝子治療

九州大学大学院医学研究院消化器・総合外科学 (第2外科)

山下 洋 市

Electroporation-mediated Interleukin-12 Gene Therapy for Hepatocellular Carcinoma in the Mice Model

Cancer Res 61; 1005-1012, 2001.

はじめに

肝癌の治療は、肝癌が慢性肝炎・肝硬変を背景に発生し、また多中心性に発生する場合も多いため、拡大切除は不适当であり、残肝機能に制約された治療にならざるを得ない。従って、現在行われている主な治療法は、肝切除、PEIT, MCT, RFA など肝癌の局所コントロールを目標としたものが中心である。しかし、肝癌のステージ別生存率を比較すると、肝外転移を合併している Stage-IVB の予後の悪さが際だっており、また我々が提唱してきた肉眼的門脈浸潤 (VP) と肉眼的肝内転移 (IM) の積で表す VI スコアが高い、高度脈管侵襲と多発肝内転移を認める症例の予後の悪さも際だっている。則ち肝癌においては、原発巣のコントロールばかりでなく、遠隔転移・肝内転移巣の治療が現在の課題といえる。

世界では、癌治療の新しいオプションとして遺伝子治療が注目されている。現在までの所、全適応患者 3436 例の 68.7% が癌であり、使用しているベクターは、レトロウイルスやアデノウイルスなどのウイルスベクターが大部分である。日本でも岡山大学や千葉大学などで癌遺伝子治療の臨床試験が始まっているが、癌抑制遺伝子である p53 や自殺遺伝子である HSV-tk の導入など、癌局所の治療を目指したものが主流であり、用いるベクターもウイルスベクターがほとんどである。

しかし、ウイルスベクターには次のような問題点がある。レトロウイルスに関しては、遺伝子発

現は半永久的に保たれるが、増殖細胞にのみ感染可能であり、in vivo での導入効率が低いことが指摘されている。また、アデノウイルスは、導入効率は極めて高いものの発現が一過性であり、その免疫原性のため繰り返し投与が不可能とされている。また、1999 年 9 月 17 日にアメリカのペンシルバニア大学でアデノウイルスベクターに対するアナフィラキシーが直接の死因と考えられる患者が出たことから、ウイルスベクターの安全性に警鐘を鳴らす研究者が増えているのが現状である。

そこで、物理的遺伝子導入法であるエレクトロポレーション (EP) 法にいち早く注目し、肝癌遺伝子治療に応用すべく検討した。エレクトロポレーション法とは、細胞表面に直径 0.5-2 nm の電気孔を開け、電場により細胞内へ plasmid を移行させる方法である。その特徴としては、非ウイルスベクターの物理的方法であること、導入する遺伝子量に制約がないこと、組織の特定部位を狙って行えること、簡単でかつ短時間に処理できること、繰り返して導入が可能であることなどが挙げられる。

また導入する遺伝子は、Interleukin-12 (IL-12) を用いた。IL-12 は、p 40 と p 35 の 2 つのサブユニットが S-S 結合した 2 量体で、NK 細胞や NKT 細胞、CD 4⁺T 細胞や CD 8⁺T 細胞の活性を上げ、腫瘍免疫を誘導・増強する作用を持つとされている。また in vivo において、ケモカインである IP-10 や MIG を介した血管新生抑制効果があることが知られている。本検討の目的は、非ウ

イルスベクターである EP 法を用いた IL-12 による肝癌の遺伝子治療の効果をマウスモデルで確認する事である。

方 法

1) EP 法の至適条件

6 週齢の C3H/HEN マウスの右背部に MH134 2.5×10^6 個を接種して、腫瘍体積が約 0.5 cm^3 になった皮下肝癌に、Luciferase 遺伝子を導入し Luciferase の発現を定量的に評価した。Plasmid $100 \mu\text{g}$ を腫瘍内に注入した直後、タングステン針電極を腫瘍の両端に刺し、エレクトロポレーターにて電場をかけた。エレクトロポレーション法による導入効率は、発生熱 Q に比例するとされ、 Q は矩形波の場合、電圧を V 、組織抵抗を R 、パルス時間を T で表すと、 $Q = V^2 \cdot T / (4.2 \times R)$ となる。ただし、 Q が大きくなり過ぎると組織障害が大きくなり、かえって導入効率は落ちるとされる。

2) 腫瘍増殖抑制効果

IL-12 plasmid として、2 ケ所の CAG プロモーターと poly A テールの間に、それぞれマウス mIL-12 p 40 と mIL-12 p 35 の 2 つのサブユニットを別々に挿入した型の plasmid を作製した。

6 週齢の C3H/HEN マウスの両側背部皮下に MH134 2.5×10^6 個を接種した両側背部皮下肝癌モデルにて、1) で決定したエレクトロポレーションの至適条件により、右背部腫瘍にのみ、プロモーター領域 pCAGGS のみを導入した mock 群 ($n = 5$) と、pCAGGS-mIL-12 を導入した mIL-12 群 ($n = 8$) の 2 群間で、血中 mIL-12、mIFN- γ 、腫瘍体積を経時的に比較した。それぞれ対側の腫瘍は無治療とした。

導入 14 日目の mock 導入側、mIL-12 導入側、mIL-12 導入対側の 3 群で以下の病理学的検討を加えた。腫瘍 viable 領域に関して、H&E 染色によりイメージアナライザーにて評価した。腫瘍内血管新生に関して、抗 CD31 抗体による免疫組織染色により、Weidner らの hot spot methods を用い、平均微少血管数 Microvessel density mean (MVD mean) により評価した。また、腫瘍内アポトーシスに関して、TUNEL 染色により MH 134 細胞 100 個当たりの TUNEL 陽性細胞

数を Apoptosis index として評価した。

3) 腫瘍免疫効果

CTL アッセイにて腫瘍特異免疫獲得の有無を検討した。腫瘍接種のない Naive 群、右背部皮下肝癌に pCAGGS を導入した mock 群、pCAGGS-mIL-12 を導入した mIL-12 群の 3 群において、導入 7 日目に脾臓よりリンパ球を抽出し、in vitro で MMC 処理 MH134 で刺激した後に、 ^{51}Cr を食させた MH134 に対する細胞傷害性を放出された ^{51}Cr 量にて評価した。

腫瘍内リンパ球 (TIL) を定量的に評価した。pCAGGS を導入した右背部皮下肝癌、pCAGGS-mIL-12 を導入した右背部皮下肝癌とその対側の 3 群において、導入 14 日目に腫瘍を摘出し、ハサミで細切後に TIL を濃度勾配遠心法で抽出し、FACS スキャンでリンパ球分画を定量的に解析した。

また、腫瘍再接種における対側腫瘍形成抑制率の評価のために、右背部皮下肝癌に pCAGGS を導入した mock 群 ($n = 5$)、pCAGGS-mIL-12 を導入した mIL-12 群 ($n = 8$) において、導入 3 日目に対側左背部に MH 134 2.5×10^6 個を接種した場合の腫瘍形成率を比較した。

4) 遠隔転移抑制効果

右背部皮下肝癌に pCAGGS を導入した mock 群 ($n = 5$)、pCAGGS-mIL-12 を導入した mIL-12 群 ($n = 8$) において、導入 14 日目に皮下肝癌を切除し、切除 14 日目に肺転移の有無を比較する外科切除モデルにて評価した。

5) 統計学的比較

両群の連続変数の比較は Mann-Whitney U テストで、両群の名義変数の比較は Fisher's exact probability テストで行った。腫瘍増殖の相違に関しては、繰り返し ANOVA テストで比較した。遠隔接種の皮下肝細胞癌の腫瘍形成の比較は、Wilcoxon テストで比較した。P < 0.05 を有意差ありとした。

結 果

1) EP 法の至適条件

1998 年に報告されたラット肝臓へのエレクトロポレーションによる導入結果⁴⁾から、電圧 50 V、パルス時間 50 msec、回数 8 回を今回の検討のスタンダードとした。発生熱 Q は、電圧 V に最も

影響される事から、他の条件をスタンダードに固定して至適電圧Vを検討した所、150 VでLuciferaseの発現が最高値となった。今度は、電圧を150 V、回数を8回に固定した時の至適パルス時間を検討した結果、50 msecでLuciferaseの発現が最高値になった。最後に電圧を150 V、パルス時間を50 msecとした時の至適回数を検討した所、10回でLuciferaseの発現が最高値となった。従って、MH 134 皮下肝癌に対するエレクトロポレーション法の至適条件は、電圧150 V・パルス時間50 msec・回数10回となった。

2) 腫瘍増殖抑制効果

血中mIL-12は導入5日目にピークとなり平均4.4 ng/mlに達し、導入28日目まで平均2.5 ng/mlと高値を持続した。一方、血中mIFN- γ は、mIL-12のピークより少し遅れて導入7日目でピークとなり、平均101.6 pg/mlに達した後、急激に低下した。

腫瘍体積を経時的に計測した結果、mIL-12導入側皮下肝癌のみならず導入対側の無治療皮下肝癌にも統計学的に有意な増殖抑制効果を認めた(図1)。

Mock導入側のviable領域は $93.7 \pm 1.1\%$ であり、mIL-12導入側は $25.2 \pm 2.7\%$ 、mIL-12導入対側は $48.7 \pm 3.1\%$ と、ともにviable領域が統計学的に有意に減少した。また、mIL-12導入側・mIL-12導入対側ともに腫瘍viable領域周囲のリンパ球浸潤が著明であった。Mock導入側のMVD mean $21.4 \pm 0.9/\text{mm}^2$ と比較して、mIL-12導入側は $2.4 \pm 0.5/\text{mm}^2$ と約10分の1、mIL-12導入対側は $4.6 \pm 1.1/\text{mm}^2$ と約5分の1に減少し、ともに統計学的に有意であった。Mock導入側のApoptosis index 0.12 ± 0.1 と比較し、mIL-12導入側は 2.42 ± 0.1 と20倍、mIL-12導入対側は 1.72 ± 0.3 と約10倍に増加し、ともに統計学的に有意であった。

3) 腫瘍免疫効果

mIL-12群の脾臓リンパ球のみMH134に対する強い細胞障害性を示した。また、MH134同様C3H/HEN由来の形質細胞癌株であるX5563細胞に対しては細胞傷害性を示さなかった事から、MH134に対して特異的な腫瘍免疫の獲得を認めた。

TILの単位体積当たりのそれぞれのリンパ球

分画の総数を比較すると、mIL-12導入皮下肝癌、およびmIL-12導入対側皮下肝癌ともに、T細胞・NK細胞・マクロファージの腫瘍内浸潤が著明に増加していた。T細胞の分画としては、 $\text{CD4}^+\text{T}$ 細胞・ $\text{CD8}^+\text{T}$ 細胞ともに同等の浸潤の増加を認めた。

腫瘍再接種における対側腫瘍形成抑制率を比較した所、mock群ではすべて14日後には腫瘍形成を認めたのに対し、mIL-12群では有意に腫瘍形成が抑制され、8匹中4匹(50%)のマウスには1ヶ月を越える観察期間に渡って腫瘍形成を認めなかった。

4) 遠隔転移抑制効果

mIL-12群においては、8例中7例(87.5%)に肉眼的肺転移を認めなかったが、mock群では5例中4例(80%)に多発する肉眼的肺転移を認めた。mIL-12導入による肺転移抑制は、統計学的に有意であった。

考 察

組織や細胞が不可逆的に障害されなければ、エレクトロポレーションによる遺伝子導入効率は発生するエネルギー量にほぼ比例する。この研究における肝癌に対する遺伝子導入の至適条件も、この仮説を部分的には支持するものである。電圧を150 V以上、パルス時間を50 msec以上、回数を10回以上にすると、肝癌へ導入したルシフェラーゼ遺伝子の活性は減少してしまう。Muramatsuらはマウス精巣への遺伝子導入の検討により、電圧を100 Vから25 Vへ下げた場合、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ活性が著明に低下するが、矩形時間を10 msecから50 msecへ長くすれば、25 Vでもクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ活性が100 V、10 msecの時と同じに保たれると報告している²⁾。しかしながら、我々の検討では、電圧を150 Vから100 Vや50 Vと落としてパルス時間を長くしたり、パルス回数を増やしたりしても150 Vで得られた遺伝子導入効率は再現されない。この現象の主要な原因の一つは、in vivoで形成された皮下肝癌の細胞密度が、肝臓のような他の正常な臓器と比較して高いためであると考えられる。実際、我々のマウスモデルでは、組織抵抗が有意に増大していた(皮下肝癌; $1.62 \pm 0.09 \text{ kohm}$ 、肝

臓; 0.42 ± 0.04 kohm). 従って, 細胞膜に孔を開けるのに必要な電圧は 150 V 以上なのであろう. 我々は, 様々な電圧やパルス時間, パルス回数の効果を検討したが, 他のパラメーター, 例えばパルスの Hz (1 回/秒), plasmid の濃度 ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), 注入液の量 ($100 \mu\text{l}$), plasmid の溶媒 (生理食塩水) は固定している. これらのパラメーターも至適化すれば, まだ遺伝子導入効率を改良できる可能性がある.

IL-12 は NK 細胞や細胞傷害性 T 細胞の細胞融解を活性化し, また, IFN- γ の強力な誘導因子であり, TH1 免疫反応の主要な誘導因子である. IL-12 蛋白治療が広い範囲のマウス癌細胞に対して一般的に有効であるという報告があり, IL-12 の抗腫瘍効果を IL-2, TNF- α , IFN- γ など他のサイトカインと比較した場合, IL-12 はより効果的で細胞毒性が少ないとされる. しかしながら, 最初の IL-12 蛋白治療のヒト臨床試験では, 2 人の死亡者と 15 人に重篤な副作用がでるなどの毒性が取り沙汰され, Pre-dosing の欠落がこの毒性の原因であると推測されている¹⁾. このモデルは, 腫瘍内に遺伝子を導入する事により, 腫瘍周囲に安定した蛋白発現レベルを容易に維持するという IL-12 遺伝子治療の方法論を試したが, 血清 IL-12 や IFN- γ の上昇を認めた. しかし, 実験期間中に IL-12 の遺伝子治療を受けたマウスで死亡したものはなかった.

この MH134 マウスモデルにおける IL-12 遺伝子治療の抗腫瘍効果は, 腫瘍特異免疫獲得と血管新生抑制の 2 つの作用が相まった結果と考えられるが, 病理学的検討における TUNEL 陽性細胞の散在したパターンは, H&E 染色で明らかにされた広汎な壊死領域を説明できず, この抗腫瘍効果の大部分は MVD mean の検討により明らかにされた血管新生抑制効果によるものと考えられる. しかしこの C3H マウスを用いた MH134 腫瘍モデルにおける IL-12 遺伝子治療の抗腫瘍効果では, 免疫の活性化と血管新生抑制効果のいずれが主要なメカニズムなのかを明らかにする更なる検討が必要である.

特に臨床応用を考えた場合, ウイルスベクターの使用に関してはかなり強い危惧が叫ばれているのが現状である. より強く肝癌に対する遺伝子治療の臨床応用を考えた場合, 生体エレクトロポ

レーション法による遺伝子導入はウイルスベクターと比較して絶対的に有利である. しかしながら, エレクトロポレーション法はウイルスベクターと比較して, 例えば遺伝子導入高率が低い事や, 遺伝子発現が一過性であるなど, 一般的にはいくつかの欠点があるとされている. Harrison らは, 鶏胚の心臓への GFP 遺伝子導入割合を比較した場合, 生体エレクトロポレーション法による遺伝子導入は, 10^6 タイターのアデノウイルスとはほぼ同じ導入効率を持つものの, 10^7 タイターのアデノウイルスと比較すると導入効率が落ちると報告している³⁾. しかし, エレクトロポレーションによる遺伝子導入の効率は, 電気パルスや電極のタイプ, または plasmid の濃度などの至適条件の検討により向上し得るし, 繰り返し治療が可能であるという利点がある. しかし, このモデルにおいて, ウイルスベクターを用いた場合 (特にアデノウイルス) とエレクトロポレーション法を用いた場合の IL-12 遺伝子治療の比較に関する追加の検討が必要である.

まとめると, 肝癌に対するエレクトロポレーション法を介した IL-12 遺伝子治療は, mLIL-12 を導入した肝癌に直接の効果があるばかりでなく, 遠隔の肝癌にも有効である. 加えて, 有意な肺転移の抑制と肝癌形成の抑制効果も示した. 我々は, 肝癌に対する生体エレクトロポレーション法を介した IL-12 の遺伝子治療は, 肝内転移を持つ進行肝癌患者の有望な治療法になる可能性を提示した.

研究の進展

我々は, 簡易的に筋肉へ遺伝子を導入する事により IL-12 を含めた治療蛋白を長期間発現させる事を目標に, 電極の形状などを工夫した結果, マウス筋肉に 10-30 V という低電圧で遺伝子を高発現率で導入する事に成功し, 現在特許を申請している (特願 2000-399959). また, 我々は同様のマウス肝癌モデルを用いて, 肝癌へ対するアポトーシス誘導因子である TRAIL/Apo2L (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) 遺伝子治療の有効性を示した⁵⁾. 現在, 前臨床試験として, 大動物におけるエレクトロポレーション法による遺伝子導入とその安全性の確認を行っており, 早期の臨床応用へ鋭意研

究を進めている。

謝 辞

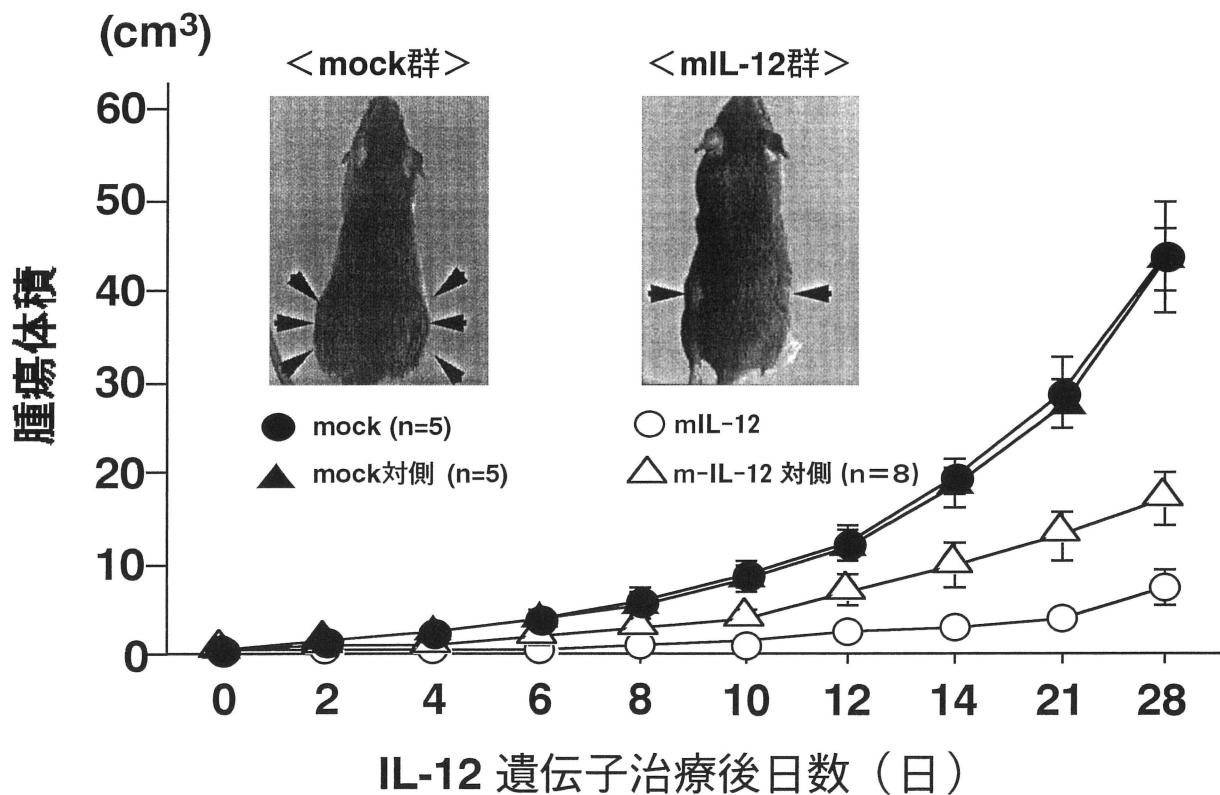
本研究を進めるにあたり御指導賜りました九州大学大学院医学研究院消化器・総合外科学（第2外科）の杉町圭蔵名誉教授，島田光生助教授，調 憲講師，田中真二講師に深く感謝申し上げます。また，本研究における幾多の困難を乗り越えるにあたり，長谷川博文氏，皆川良介氏の協力が不可欠でした。最後に，この研究を評価して頂いた福岡医学会ならびに福岡医学会幹事の諸先生方に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Jenks S: After initial setback, IL-12 regaining popularity. J Natl Cancer Inst, 88: 576-577, 1996.
- 2) Muramatsu T, Nakamura A and Park H-M: In vivo electroporation: a powerful and convenient means of nonviral gene transfer to

tissues of living animals (Review). Int J Mol Med, 1: 55-62, 1998.

- 3) Harrison RL, Byrne BJ and Tung L, Electroporation-mediated gene transfer in cardiac tissue. FEBS Lett, 435: 1-5, 1998.
- 4) Suzuki T, Shin B, Fujikura K, Matsuzaki T and Takata K: Direct gene transfer into rat liver cells by in vivo electroporation. FEBS Lett, 425: 436-440, 1998.
- 5) Yamashita Y, Shimada M, Tanaka S, Okamoto M, Miyazaki J and Sugimachi K: Electroporation-mediated tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL9/Apo2L Gene Therapy for Hepatocellular Carcinoma. Human Gene Ther 13: 275-286, 2002.



著者プロフィール

山下 洋市（やました よういち）

九州大学大学院医学研究院消化器・総合外科学（第2外科）

1996年3月 九州大学医学部卒業、同年九州大学医学部第2外科入局

1998年4月 九州大学大学院医学系研究科博士課程 臓器機能医学専攻入学
（指導教官：杉町圭蔵教授）

2002年3月 同上卒業（医学博士）

2002年4月 大分赤十字病院 外科（肝・胆・膵センター）

現在に至る。

◇研究テーマ：肝癌の遺伝子治療・解析，人工肝臓の開発，肝癌の分化誘導

◇趣味：サッカー

