

19980418

厚生省科学研究費補助金（ヒトゲノム遺伝子治療研究事業）
総括研究報告書

難治癌に対する p53 遺伝子を用いた遺伝子治療の
基礎的・臨床的研究

主任研究者 田中紀章 岡山大学医学部・外科学第一講座・教授

難治癌に対するp53遺伝子を用いた遺伝子治療の基礎的・臨床的研究

主任研究者 田中 紀章 岡山大学医学部・外科学第一講座・教授

【研究要旨】 p53遺伝子による癌治療の開発のための基礎的研究として、癌細胞への正常なp53遺伝子導入によるアポトーシス誘導機構および血管新生抑制機構について検討した。p53遺伝子導入によりFasリガンドの一過性の発現増強が得られた。また、p53遺伝子発現によりアポトーシス抑制に作用するNF- κ Bの活性が低下し、アポトーシスの感受性が増強していると考えられた。p53遺伝子変異を有するヒト癌細胞に正常なp53遺伝子を導入することで、in vivoでの血管新生は抑制され、その結果、遺伝子導入されていない癌細胞の増殖に影響を与えるBystander効果が発揮された。臨床研究実施計画は、厚生省および文部省の委員会等で科学的小および倫理的妥当性が認められ、非小細胞肺癌を有する被験者選定の後に、p53遺伝子発現アデノウイルスベクターの腫瘍内投与が開始された。

分担研究者：

藤原俊義（岡山大学医学部附属病院・第一外科・助手）

A. 研究目的

本研究の目的は、p53遺伝子に突然変異や欠失などの異常を有する根治的切除不能な原発性あるいは再発性非小細胞肺癌症例において、正常型p53遺伝子発現アデノウイルスベクターの腫瘍内局所投与とDNA障害性抗癌剤の全身投与による副作用および治療効果を検討することである。基礎的研究では、臨床的に使用するベクターを用いて、多方面からその有効性の理論的根拠を確立することである。

B. 研究方法

1. 基礎研究

1) ヒト肺癌細胞H1299 (p53欠失株)、大腸癌細胞DLD-1 (p53変異株)に正常なp53遺伝子を発現するアデノウイルスベクターAd5CMVp53を感染させ、reverse transcription-PCR (RT-PCR)および抗Fasリガンド抗体を用いたフローサイトメトリー解析によりFasリガンドの発現を検出した。

2) DLD-1細胞にAd5CMVp53を感染させ、抗アポトーシス作用を有するとされる転写因子NF- κ Bの発現変化と活性変化を、ウエスタンブロット解析およびゲルシフト解析により観察した。また、抗NF- κ B抗体による蛍光免疫組織染色で、p53遺伝子導入後のNF- κ Bの局所の変化を検討した。さ

らに、NF- κ Bと結合するI κ Bの発現の変化を調べ、作用機構を解析した。

3) p53遺伝子治療におけるBystander効果のメカニズムを解析するために、ヒト肺癌細胞H226Br細胞 (p53変異株)にAd5CMVp53を感染させ、非感染H226Br細胞と20%、50%、100%の比率で混合してヌードマウスの背部皮下に移植し、腫瘍増殖に与える影響を観察した。また、28日目に摘出した腫瘍を血管内皮細胞を特異的に認識する抗CD31抗体で染色し、血管新生抑制の関与を検討した。

2. 臨床研究

1) 遺伝子治療臨床研究「非小細胞肺癌に対する正常型p53遺伝子発現アデノウイルスベクター及びシスプラチン(CDDP)を用いた遺伝子治療臨床研究」の実施計画書を厚生省および文部省に提出した。

2) 非小細胞肺癌患者より採取した肺癌組織のp53遺伝子異常を、抗p53抗体(PAb1801、DO-7)を用いた免疫組織染色およびPCR-SSCP解析により検討した。

3) p53遺伝子変異が検出された被験者に対して、気管支鏡下にAd5CMVp53ベクター液の腫瘍内局所投与を行った。

C. 研究結果

1. 基礎研究

1) H1299およびDLD-1いずれの細胞株でも、Ad5CMVp53感染により24時間をピークに一過性

にFasリガンドのmRNA発現が上昇し、36時間後にはベースラインに戻っていた。また、metaloprotease阻害剤を用いてFasリガンドのsheddingを防いだ後にフローサイトメトリー解析を行ったところ、Ad5CMVp53の感染により細胞表面のFasリガンド発現が増強していた。

2) DLD-1細胞にAd5CMVp53ベクターを感染させることで、核内のNF- κ B蛋白質レベルが減少し、ゲルシフト・アッセイでもNF- κ Bの結合活性が低下していた。蛍光免疫組織染色では、NF- κ Bの細胞質から核への移行が抑制されており、細胞質への著明な集積が観察された。また、細胞質のI κ Bレベルの上昇とNF- κ Bとの結合能の増強が認められ、NF- κ Bの細胞質集積のメカニズムの一つと考えられた。

3) Ad5CMVp53感染させたH226Br細胞を非感染H226Br細胞と混合することで、非感染細胞のヌードマウスにおける腫瘍増殖が濃度依存性に抑制された。50%、100%混合した群では、非感染H226Br細胞による腫瘍に比較して有意に増殖が抑制されていた。また、28日目のH226Br腫瘍では抗CD31抗体で染色される腫瘍血管が多数認められたが、p53遺伝子を導入したH226Br細胞を混合した腫瘍では血管新生が顕著に抑制されていた。

2. 臨床研究

1) 遺伝子治療臨床研究「非小細胞肺癌に対する正常型p53遺伝子発現アデノウイルスベクター及びシスプラチン(CDDP)を用いた遺伝子治療臨床研究」は、倫理的および科学的に検討された結果、1998年9月に厚生省先端医療技術評価部会および文部省遺伝子治療臨床研究専門委員会での実施について了承された。

2) 非小細胞肺癌を有する57歳の男性および58歳の男性に気管支鏡下生検を施行し採取した組織を解析したところ、前者では免疫染色陽性、SSCPにてエクソン5に変異あり、後者では免疫染色陽性、SSCPにてエクソン6に変異ありとの結果を得た。その他の検査結果も含めて適応判定委員会で検討され、1999年2月および3月にそれぞれ適応ありとの判断を得た。

3) 1999年3月2日、適応ありと判定された最初の患者の気管分岐部の腫瘍に、 10^9 PFUのAd5CMVp53ベクター液の局所投与を施行した。患者は特に問題なく経過し、喀痰のDNA-PCRにてベクターが検出されなくなった後に、退院した。また、3月30日、第1例目の患者への2回目の投与

および第2例目の患者の左下葉原発の腫瘍への投与を施行した。今後、安全性や効果を評価しながら24例の症例に投与する予定である。

D. 考察

現在、米国を中心に遺伝子治療の臨床応用が精力的に続けられているが、その効果に関する検討の結果、基礎研究に立ち戻って疾患治療の理論的根拠を確立することや、ベクターの改良・改善などの技術的向上に重点を置くべきという意見が注目されている。われわれも、米国で進行中のp53遺伝子治療を本邦で実施することで安全性や臨床効果に関する独自のデータを得るとともに、基礎的にまた臨床的にその作用機構の検討を行うことで、より効果的な治療法としての確立に寄与しようと考えている。

p53遺伝子導入が抗癌治療として期待されるのは、まずその直接的な殺細胞効果がみられるためである。アポトーシスは抗癌治療の終局的な実行機構として、近年精力的に研究が進んでいる。アポトーシスのシグナル伝達機構としてはFasリガンドや抗Fas抗体によるFas受容体刺激が重要と考えられているが、われわれはp53遺伝子導入によりFasリガンドの発現が一過性に増強することを明らかにした。この現象は、部分的にp53依存性アポトーシスに関与するとともに、Fasリガンドの発現を介した細胞浸潤の誘導によりin vivoの抗腫瘍効果に関わっている可能性が考えられる。

また、p53の標的遺伝子としてBaxやFasなど積極的にアポトーシスを誘導する因子が注目されているが、われわれはp53によるアポトーシス抑制因子の発現低下を検討した。NF- κ Bは、抗アポトーシスに働く転写因子として、TNFや抗癌剤でその発現が増強することが知られているが、p53遺伝子導入はNF- κ Bの核移行を阻害することで、NF- κ Bの抗アポトーシス機能を抑制し、アポトーシス感受性を増強していることを明らかにした。さらに現在、その他のアポトーシス抑制因子についてもp53との関連性を検討中である。

局所投与という投与経路を考えると、現在のアデノウイルスベクター・システムで癌組織を形成する100%の癌細胞に遺伝子導入を期待することはできない。しかし、遺伝子導入効率の低いレトロウイルスベクターによる臨床試験でも明らかな腫瘍縮小がみられたという事実は、遺伝子導入された細胞が周辺の遺伝子導入されなかった細胞に何らかの抗腫瘍効果を与えた可能性を示している。

このBystander効果の作用機構の一つとして、われわれは血管新生抑制の関与を検討してきた。より実際的な実験系として、p53遺伝子導入細胞を非導入細胞と混合することでin vivoの腫瘍増殖が抑制され、また新生血管の密度低下から、血管新生の阻害がメカニズムの一つと考えられた。Bystander効果は、p53遺伝子治療の局所治療としての有効性を評価するために重要な現象であり、今後さらにそのメカニズムの解析が期待される。

臨床的に遺伝子治療はまだ非常に未熟な実験的な段階にある。しかし、臨床応用の結果得られるデータは重要であり、動物実験では予測されなかった副作用や臨床効果が確認される場合も多い。したがって、最低限の安全性を確保した上で臨床応用を試みることは十分に意義あることと考えられる。われわれは、Ad5CMVp53を用いたp53遺伝子治療の臨床応用を開始した。今後、本邦でも研究を進展させることで、p53遺伝子治療がより生理的かつ効果的な高いquality of life (QOL)を望める癌治療法として確立されることを期待する。

E. 結論

1) p53遺伝子導入によりmRNAおよび蛋白質レベルでFasリガンドの発現が増強し、p53依存性アポトーシスに関与している可能性が示唆された。

2) p53遺伝子導入によりI κ Bの発現および活性が増強し、その結果としてNF- κ Bの核移行が阻害され、NF- κ Bの抗アポトーシス活性が抑制された。

3) p53遺伝子導入により周辺の遺伝子導入されていない癌細胞の新生血管の増生が抑制され、血管新生抑制作用はBystander効果に関与していると考えられた。

4) 非小細胞肺癌に対するp53遺伝子治療の実施が了承され、被験者の肺癌へのp53遺伝子導入が実際に開始された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Fukazawa, T., Fujiwara, T., Morimoto, Y., Shao, J., Nishizaki, M., Kadowaki, Y., Hizuta, A., Owen-Schaub, L. B., Roth, J. A., Tanaka, N. Differential involvement of the CD95(Fas/APO-1) receptor/ligand system on apoptosis induced by the wild-type p53 gene transfer in human cancer cells. *Oncogene*, (in press), 1999.

2) Nishizaki, M., Fujiwara, T., Tanida, T., Hizuta, A., Nishimori, H., Tokino, T., Nakamura, Y., Bouvet, M., Roth, J. A., Tanaka, N. Recombinant adenovirus

expressing wild-type p53 is antiangiogenic: a proposed mechanism for bystander effect. *Clin. Cancer Res.*, (in press), 1999.

3) Tada, M., Sakuma, S., Iggo, R. D., Saya, H., Sawamura, Y., Fujiwara, T., Roth, J. A. Monitoring adenoviral p53 transduction efficiency by yeast functional assay. *Gene Ther.*, 5: 339-344, 1998.

4) Bouvet, M., Ellis, L. M., Nishizaki, M., Fujiwara, T., Liu, W., Bucana, C. D., Fang, B., Lee, J. J., Roth, J. A. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res.*, 58: 2288-2292, 1998.

5) 藤原俊義、井上文之、田中紀章：p53遺伝子導入による分子レベルでの癌治療。癌と化学療法 25: 194-200, 1998.

6) 藤原俊義、井上文之、田中紀章：肺癌の遺伝子治療。肺癌の臨床 1:140-148, 1998.

7) 藤原俊義、田中紀章：p53遺伝子を用いた癌治療。Pharma Medica 16:69-75, 1998.

8) 藤原俊義、田中紀章：肺癌の遺伝子治療。カレントセラピー 16: 129-134, 1998.

9) 藤原俊義、田中紀章：ヒト癌におけるp53の異常とその標的遺伝子。Surgery Frontier 5:271-278, 1998.

2. 学会発表

1) 藤原俊義、片岡正文、片岡和彦、Roth, J. A., 田中紀章：p53遺伝子導入による分子レベルでの癌治療の実際。第99回日本外科学会総会（ワークショップ）、1999.

2) 藤原俊義、片岡正文、片岡和彦、Roth, J. A., 田中紀章：肺癌のp53遺伝子を用いた遺伝子治療。第1回外科遺伝子治療研究会（シンポジウム）、1999.

3) 藤原俊義：肺癌の遺伝子治療：臨床試験に臨んで。第3回関西遺伝子医療研究会（パネルディスカッション「遺伝子治療の実現に向けて」）、1999.

4) 藤原俊義、西崎正彦、片岡正文、片岡和彦、西森博幸、時野隆至、中村祐輔、田中紀章：p53遺伝子導入による血管新生の抑制：非小細胞肺癌の遺伝子治療への応用。第39回日本肺癌学会総会（シンポジウム）、1998.