

ゲノムと技術

間野 博行

Question & Answer

Q：ヒトゲノムの解明が医療・医学にもたらす影響は？

A：多くの疾患の発症・進展のメカニズムが、これまでにないスピードで解明されていく。さらに、これらの知見を基にした新しい疾患分類法、診断法および治療法が提案されるようになる。

Keyword：PCR法、ゲノムワイドスクリーニング、DNAチップ。

ヒトゲノムの塩基配列解明とともに、ヒトのもつ全遺伝子セットが明らかになりつつある。蛋白質をコードしない遺伝子がどの程度あるかは未だ不明であるが、蛋白質を作る一般的な遺伝子のほぼすべてが決定される日は近い。21世紀の医療・医学はこの膨大なヒトゲノム情報によって大きく変革されると期待される。現在なお病因が不明な疾患の発症機構はこれまでにないスピードで解明されると考えられ、それに伴い疾患の診断法・治療法も大きな変化を余儀なくされるであろう。さらに、遺伝子異常を基にした新しい疾患概念の定義、分類の変更も現実のものになるであろう。本稿では、今日の医療の場において利用される遺伝子診断法を概説するとともに、DNAチップを初めとした新しいゲノミクス技術についても紹介したい。

Polymerase chain reaction (PCR) 法

PCRは、任意の遺伝子領域を試験管のなかできわめて簡便に増幅する代表的な手技であり、数時間の反応で100万倍ほどの増幅率を得ることも困難ではない。実際には、増幅したいDNA領域の両端に結合する短いDNA断片(プライマー)を基質となる微量のDNAと混和し、DNA合成酵素

を働かせる。すると、プライマーを先頭としてDNAが合成されていくが、ここでいったん試験管を熱し、作成された2本鎖DNAを解離させる。その後もう1度冷やすことにより、新たなプライマーの結合が生じ、再びDNA合成酵素を働かせることでプライマーからの新しい合成が起きる。これをn回繰り返すと、理論的にはプライマーで挟まれた領域が 2^n 倍に増幅されることになる(図1)。

PCRを応用することで、健常者には「存在しない」が特定の疾患のみで「存在する」ようなDNA/RNA断片を、きわめて高感度かつ信頼性良く検出することができる。PCRによる診断法の応用範囲は広いが、たとえば感染症の遺伝子診断などはその最も良い例であろう。今日の医療においても、PCR法を用いることで、結核菌やC型肝炎ウイルスをきわめて感度良く検出することができる。

現在臨床の場で行われているPCRの他の適応として、「疾患特異的染色体転座」の検出がある。たとえば、慢性骨髄性白血病のほぼ全例および急性リンパ性白血病の一部において、9番染色体と22番染色体の相互転座であるt(9;22)が認められ、その結果BCR遺伝子とABL遺伝子との融合遺伝子BCR-ABLが生じることになる。今この融合点をまたぐようにBCRとABL両遺伝子中に

プライマーを設定しPCR反応を行うと、両遺伝子の融合産物のみを増幅可能である。健常者においては、9番と22番染色体は物理的につながっていないためPCR産物は作られない。また、これまで白血病の「完全寛解」は「骨髄中に幼若芽球が5%以下しか存在しない」ことによって定義されてきたが、PCRを用いれば、たとえば100万個の血液細胞中に1個でも白血病細胞が残っていれば検出できるのだ¹⁾。現在ではこのようにして、微少残存白血病細胞をきわめて高感度に検出でき、それを基に患者さんの治療戦略を変更することが可能である。さらに最近では、real-time RT (reverse transcription)-PCR法、TaqMan RT-PCR法など、遺伝子発現量を定量的に評価するPCR法も広く用いられるようになっている。

新しい技術

旧来のPCR法、サザンブロット法(DNAを検出する)、ノーザンブロット法(mRNAを検出する)などは原則的に1~数種類の遺伝子(あるいは蛋白質)の解析を前提とした技術であり、たとえば1度に数百の標的を解析することは不可能であった。しかし近年、ヒトゲノム情報を直接利用する全く新しい技術が開発されつつある。

■ DNAチップ

たとえばDNAチップ・DNAマイクロアレイ(以下、DNAチップ)を用いることで、何万種類もあるヒト全遺伝子の発現量を簡便に測定することも可能になってきた。DNAチップは、スライドガラスなどの小さな担体上にきわめて高密度にDNA断片あるいはオリゴヌクレオチドを配置したもので、1度の実験でこれらすべての遺伝子の発現量を定量可能である(図2)²⁾。1枚のスライド上に3万種類上のヒト遺伝子すべてのcDNAをセットすれば、1度の実験で「ヒト全遺伝子の発現スクリーニング」という夢のような解析が可能

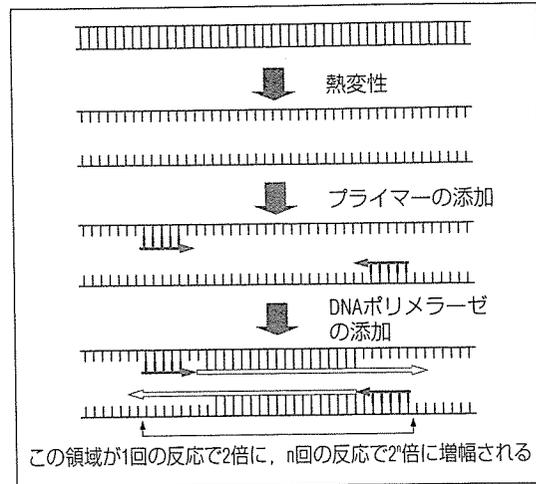


図1 PCR法のメカニズム

基質DNAを熱変性後、プライマーを添加しDNA合成酵素を作用させることで、プライマーから相補的なDNA鎖を合成する。その後「熱変性-プライマーの結合-DNA合成」を繰り返すことで、指数関数的にプライマーで挟まれた領域を試験管内で増幅可能である。RNAに関しては、逆転写酵素でいったんcDNAとすることで、同様に増幅できる。

になる。すなわち、ヒトにおける任意の細胞および組織における遺伝子発現プロファイル(JI)全体を、直接比較することができるのだ。たとえば、このような全ヒト遺伝子チップを用いて、ある疾患の患者20名と健常者20名のサンプルを比較することにより、疾患患者においてのみ発現が上昇(あるいは低下)する遺伝子が同定できるであろう。これらの遺伝子は診断用遺伝子マーカーとしてきわめて有用だけでなく、疾患発症自体の原因となっている可能性も高い。さらに、これまでは鑑別診断に苦慮していた類縁疾患AとBとを直接比較することで、新しい診断法も提示できると予想される³⁾。

JIMノート

J1 遺伝子発現プロファイル

任意の遺伝子に関する発現量、あるいはその変化のパターンなどの特徴を総称する言葉。近年は、任意の細胞や組織におけるすべての遺伝子に関する発現様式(=トランスクリプトーム)についても用いられることが多い。

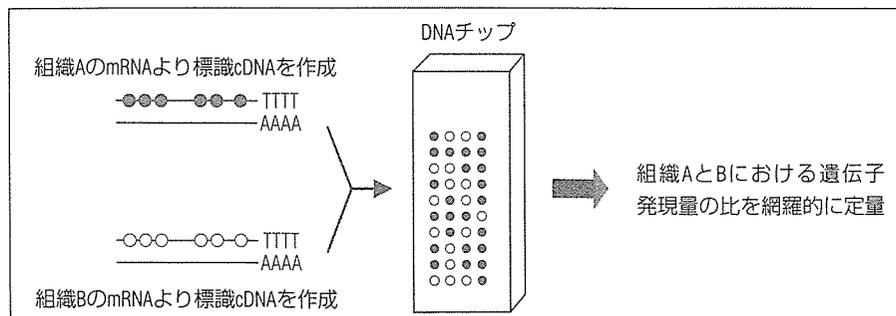


図2 DNAチップ実験の原理

組織 A と B との間で遺伝子発現プロファイルを比較したい場合、まず組織 A と B それぞれから等量の mRNA を調整する。次にこれら mRNA からオリゴ dT プライマーと逆転写酵素 (RT) を用いて cDNA を合成する。その際に蛍光色素である Cy3 あるいは Cy5 で標識した dUTP をそれぞれに加えることで、各組織由来の cDNA を異なる蛍光色素で標識する。この標識 cDNA 混合物を、DNA チップとハイブリダイゼーションさせることで、各スポットに標識 cDNA が結合する。その結果、任意のスポット上の遺伝子に関する組織 A と組織 B における発現量の比は、Cy3 と Cy5 との蛍光強度の比で表されることになる。

しかし、DNA チップがその新しいパワーを最も発揮できる局面は、「疾患の分類」自体を再定義できることではないだろうか。たとえば、多くの癌はその細胞の形態からサブグループが定義されてきたが、DNA チップを用いた解析によって「治療に対する反応性」自体を規定する遺伝子が検出可能であるし、それら遺伝子の発現量に依存した形での疾患の新しい分類法が提唱されるであろう。そうやってこそ初めて、「臨床診断に応用される簡易 DNA チップ」が現実のものになると思われる。

■ 遺伝子多型解析

ヒト染色体上には数百塩基対に 1 つ程度の割合で配列の多様性があり、なかでも 1 塩基の多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) が代表的である。ある遺伝子のプロモーター配列上に SNP が存在すれば、その配列に依存した形で遺伝子発現量に変化することが予想される。同様に SNP がエクソン上であれば、mRNA の安定性や、コードする蛋白質の配列自体に影響を及ぼすこともある。このような SNP に代表される遺伝子多型は、各個人の生活習慣病への罹りやすさや、薬

剤の代謝能力を直接反映していると予想されており、いわば「遺伝的個性」を規定すると考えられる。

多型をゲノムワイドで解析する技術も急速に進歩しており、TaqMan PCR 法、Invader 法などさまざまな方法が広く用いられている。また SNP 解析専用の DNA チップも市販されており、これらの技術を通して、疾患関連 SNP の同定が世界中で大規模に試みられている⁴⁾。



- 1) Ben-Yehuda D, et al : Molecular follow-up of disease progression and interferon therapy in chronic myelocytic leukemia. *Blood* 90 : 4918-4923, 1997.
- 2) 間野博行 : DNA チップ法. 横田昇平 (編) : 血液・固形腫瘍診断マニュアル, pp70-75. フジメディカル出版, 2002.
- 3) Oshima Y, et al : DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 17 : 1990-1997, 2003.
- 4) Ozaki K, et al : Functional SNPs in the lymphotoxin- α gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet* 32 : 650-654, 2002.

まの ひろゆき

自治医科大学ゲノム機能研究部

〒329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1

Tel : 0285-58-7449 Fax : 0285-44-7322

血液・免疫・腫瘍 BIC Forum

別冊

メヂカルレビュー社

7 ゲノミクス解析に基づく白血病治療

間野 博行*

Key Sentences

- ①DNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルによって白血病の新しい鑑別診断が可能になる。
- ②遺伝子発現プロファイルを利用することで、治療反応性を予測可能な新しい疾患グループが定義できる。
- ③遺伝子多型を解析することで代表的な白血病治療薬の最適量を患者個人に最適化できる。

Key Words

急性骨髄性白血病, 悪性リンパ腫, 多発性骨髄腫, GST

はじめに

約 30 億塩基対におよぶヒトゲノムの核酸配列を決定する大規模事業である「ヒトゲノムプロジェクト」がついに 2003 年 4 月に終了宣言を行い、ヒト染色体の euchromatin 領域のほぼ完全な塩基配列が決定された (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/>)。現在これら配列上に遺伝子を割り付ける作業が行われており、

ヒトの持つ総遺伝子数はおそらく 3 万種類前後になると予想されている。現段階では遺伝子予測プログラムの精度などの問題から実際的な全遺伝子構造の解明にはまだ時間がかかるが、かつて夢であったヒトの全遺伝子プールの全貌がいよいよ明らかになるうとしている。

これからの「ポストゲノム」時代においては、造血器悪性腫瘍の臨床も大きく様変わりすることが予想される。例えば疾患の分類・カテゴリーについても、旧来の診断法に大きく寄与していたものは病理学すなわち「疾

Genomics-based medicine for leukemias

* MANO Hiroyuki : 自治医科大学ゲノム機能研究部教授

表1 AMLにおける予後関連遺伝子

<i>VDAC1</i>	<i>ZYX</i>	<i>VAT1</i>	<i>NPC2</i>	<i>AZU1</i>
<i>ECGF1</i>	<i>HOMER-3</i>	<i>PGD</i>	<i>ENSA</i>	<i>TKT</i>
<i>BST1</i>	<i>STK17B</i>	<i>CDK6</i>	<i>RAB32</i>	<i>PTP4A2</i>
<i>APLP2</i>	<i>CYLN2</i>	<i>OGT</i>	<i>HNRPD</i>	<i>POLR2H</i>
<i>TIAL1</i>	<i>ATP6F</i>	<i>NME1</i>	<i>GRIK5</i>	<i>CD14</i>
<i>GABARAP</i>	<i>NFKBIA</i>	<i>GCN5L2</i>	<i>HSPE1</i>	<i>LBR</i>
<i>ECE2</i>	<i>BZRP</i>	<i>XPO1</i>		

(文献5より改変、引用)

患責任細胞の形態学的変化」であった。しかし例えばこれまでの分類では単一の「白血病」と考えられていたものでも、実際の患者1人ひとりの治療反応性は大きく異なる。ある患者では骨髄移植を行っても短期間の内に白血病の再発が生じる一方、別の患者では化学療法で速やかに治癒がもたらされる。今後の医療においては、ゲノミクス技術を駆使した大規模な疾患細胞の情報が蓄積され、これを基にした新たな層別治療が可能になると期待される。各患者の治療反応性の違いを精度良く予測する方法の開発も可能になるであろうし、また例えば特定の薬を使うことによって生じる副作用の種類・程度を予測することも可能ではないであろうか？

新しい疾患の分類法

疾患責任細胞のダイナミックな遺伝子変化をリアルタイムに把握し、疾患の予後に直結した分類法・診断法の開発の上では、DNAマイクロアレイを中心とした網羅的遺伝子発現解析が有用である¹⁾²⁾。例えば白血病の診断を行う場合、旧来では患者骨髄細胞を①ペルオキシダーゼ、エステラーゼなどの特殊染色、②FACSを用いた細胞表面マーカーの解析、③遺伝子異常の有無の解析(免疫グロブリン遺伝子やT細胞表面受容体遺伝子の再構成、*BCR-ABL* 遺伝子、*PML-RAR α* 遺伝子などの有無)、④染色体型の解析、などの情報を基にそれぞれの疾患におけるFAB分類を行ってきた³⁾。これらを総合的に解析することで予後にある程度リンクした診断が行えるが、上記の解析を全て行うのは煩雑であり多くの専門技術も必要とする。一方、例えば一枚のDNAマイク

ロアレイを用いることで旧来の方法で得られる情報がすべて解析可能となれば、診断はより簡便になりかつ異なった施設間での診断の一致率も上昇するであろう。

このようなDNAマイクロアレイを用いた診断の試みとしてGolubらは、6817遺伝子を配置したDNAマイクロアレイによる発現プロファイルに基づいて、急性骨髄性白血病(AML)と急性リンパ性白血病(ALL)とを鑑別する可能性について検討した⁴⁾。AML 11例、ALL 27例をこのDNAマイクロアレイによって解析した結果、約50個の遺伝子がAMLとALLの間で偏って発現していることが明らかになった。そこでこれら“informative genes”から20個の遺伝子を選びそれらの発現量の偏りの程度を数値化したものを実際の発現量をかけあわせ合計することで、それぞれの患者のAMLあるいはALLの確からしさを数値化した。本法を患者におけるAMLとALLの鑑別診断に応用してみると38例中34例で正しい診断が行われ、1例不明、3例が誤診であった。したがってある程度の確からしさを持ってDNAマイクロアレイによる疾患診断が可能であることがわかった。

一方DNAマイクロアレイによる解析は新しい疾患分類法の開発にも有用である。Yagiらは小児AML患者54例についてAffymetrix社GeneChip HGU 95 Aチップを用いた遺伝子発現解析を行い、小児AML内での予後良好群と不良群とを予測する試みを行っている⁵⁾。彼らのサンプル内で3年以上完全寛解を維持している症例9例と初回緩解導入に失敗した症例9例の間で発現量が統計的に異なる遺伝子35種類を抽出し(表1)、これら予後関連遺伝子の発現をもとに、患者全体を2wayクラスタリング法あるいはsupported vector

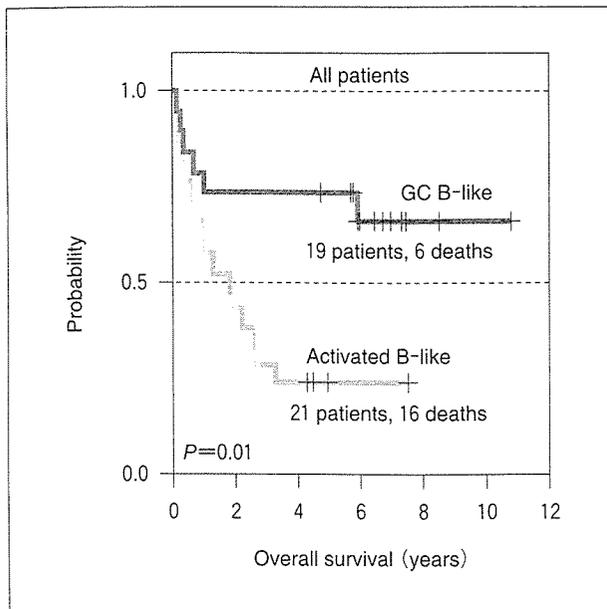


図1 びまん性大細胞型リンパ腫の予後

びまん性大細胞型悪性リンパ腫患者を、リンパ節の遺伝子発現プロファイルから「濾胞中心Bリンパ球に発現パターンが似たサンプル群(GC B-like)」と「活性化Bリンパ球に似た群(Activated B-like)」に分け、両者の生命予後をグラフ(Kaplan-Meier解析)にした。後者が有意に予後不良群であることがわかる。

(文献6より改変、引用)

machine (SVM)法によって層別化した。その結果どちらの方法によってもAML内で生命予後が異なるサブグループを検出することに成功している。すなわち遺伝子発現プロファイルを基にした新しい疾患分類法の可能性が提示されたことになる。

悪性リンパ腫についても、AlizadehらはDNAアレイを用いて非Hodgkinリンパ腫の1つであるびまん性大細胞リンパ腫の新たな予後予測法の開発を試みている⁶⁾。その結果、びまん性大細胞リンパ腫には濾胞中心Bリンパ球に遺伝子発現パターンが似ている群と活性化Bリンパ球に似ている群が存在することが示され、しかも両群間で予後に有意な差が認められることが明らかになった。すなわち活性化Bリンパ球に似た細胞からなるリンパ腫患者の5年生存率(16%)は濾胞中心Bリンパ球に似た細胞からなるリンパ腫患者のそれ(76%)に比べて有意に低いことがわかった(図1)。このことはDNAマイクロアレイによる解析で非Hodgkin悪性リンパ腫

の新たなサブグループが定義可能なこと、しかもその分類が予後判定に有意な情報を与えることを示唆しており、今後の臨床におけるDNAマイクロアレイの新たな可能性を示したものとして意義深い。

多発性骨髄腫(multiple myeloma ; MM)はCD138陽性形質細胞の腫瘍性増殖であるが、ZhanらはMM内の予後良好群と不良群を鑑別する目的で、CD138に対するアフィニティカラムを用いて同分画を純化しアレイ解析を行っている⁷⁾。具体的に健常者31例、MGUS患者5例およびMM患者74例の骨髄より形質細胞分画を純化し、Affymetrix社のGeneChip HuGeneFLチップ(~6800遺伝子)による実験を行った。これら発現データを基にMMサンプルの系統樹を作成すると、図2に示されるように大きく同患者が4種類のサブグループ(MM1~MM4)に別れることが明らかになった。しかもMM1はmonoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS)に最も近い遺伝子発現プロファイルをもち、一方MM4グループは骨髄腫細胞株に最も近似したプロファイルをもつことも示された。すなわちMM内のこれらサブタイプが患者の予後にリンクする可能性が示唆されたのである。

遺伝子多型解析

ヒトゲノムの解明が医学・医療にもたらす第二の革新は個人の持つ先天的なゲノムの多様性・個性の解明であろう。ヒトゲノムの配列は各個人間で完全に同じではなく、例えばアングロサクソンとコーカシアンでは人種特異的な塩基配列の違いが存在することが知られる。また例えば同じ日本人の中でも地域によって固有の塩基配列の多型があり、さらに部分的には各家系、個人にも固有の配列多型があると思われる。一塩基多型(single nucleotide polymorphism ; SNP)が話題に上ることが多いが、これらSNPを含む遺伝子配列の多型が個人の遺伝的個性を決定していると予想される。

今後の白血病臨床における遺伝子多型が持つ重要な意義は、薬剤感受性あるいは薬剤の副作用発症の予測である⁸⁾⁹⁾。例えばアミノグリコシド系抗生剤の重要な副作用

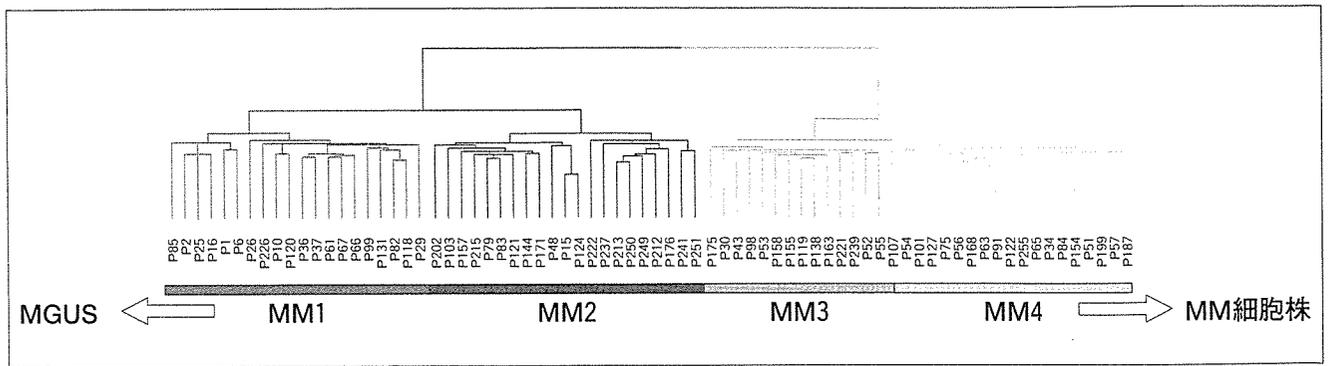


図2 MM患者サンプルの遺伝子発現プロファイルによる系統樹

MM患者74例の骨髄CD138陽性細胞における遺伝子発現プロファイルを基にサンプルの系統樹を作成したところ、MM1～MM4までの4種類のサブタイプに大きく分類されることが示された。なおMM1はMGUSのCD138陽性細胞に似た発現プロファイルを持ち、MM4は骨髄腫細胞株群と似たプロファイルを持つ。

(文献7より改変、引用)

用に難聴があるが、薬剤投与の結果難聴が生じるのはごく一部の患者のみである。詳細な解析の結果12SリボゾームRNA遺伝子にA1555G変異があると重度の難聴が発症することがわかっており、このような多型をあらかじめ検査することで副作用の発生を最小限にとどめることが可能になるであろう。

一方有効な抗癌剤を選択する上でも遺伝子多型は重要な評価ポイントとなるであろう。細胞内は常に酸化ストレスにさらされている状態であり、真核生物にはこのような酸化状態から細胞を守る様々なメカニズムが存在する。その代表的なものがグルタチオンを利用した還元系であり、なかでもglutathione S-transferase (GST)は重要な役割を担っている¹⁰⁾。GST活性は重要な抗アポトーシス因子であり、実際ある種の癌細胞においては亢進したGST活性により抗癌剤が無効になる。しかもGST遺伝子ファミリーは遺伝子多型が豊富なことでも知られており、遺伝子の配列異常、欠失を含む変化が抗癌剤感受性を直接制御している。代表的な薬剤感受性・毒性関連遺伝子多型に関する個人情報が入力された電子カードをもって診療を受ける、というような時代も遠からず訪れるのではないだろうか。

最後に

ヒトゲノムの完全版配列が完成しても、そこに存在する遺伝子の多様性はまだ十分に解明されていない。これまで「遺伝子」は暗黙のうちに「蛋白をコードする単位」と考えられていたが、意外にもたとえ長大なmRNAを作っても蛋白をコードする領域を持たない「遺伝子」が極めて多く存在することもわかってきた¹¹⁾。また数は少ないもののmicroRNAと呼ばれる20-30塩基の短いRNAも全く異なった生理機能を持って存在しているらしい。ヒトゲノムプロジェクトの成果を医療・社会へフィードバックする事業はまだ始まったばかりである。この分野の進歩においてもわが国から多くの貢献がなされることを期待したい。

文献

- 1) Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, et al : Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21 : 10-14, 1999
- 2) Cheung VG, Morley M, Aguilar F, et al : Making and reading microarrays. *Nat Genet* 21 : 15-19, 1999
- 3) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al : Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103 : 620-625,

1985

- 4) Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al : Molecular classification of cancer : class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286** : 531-537, 1999
- 5) Yagi T, Morimoto A, Eguchi M, et al : Identification of a gene expression signature associated with pediatric AML prognosis. *Blood* **102** : 1849-1856, 2003
- 6) Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al : Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403** : 503-511, 2000
- 7) Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, et al : Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood* **99** : 1745-1757, 2002
- 8) Roses AD : Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature* **405** : 857-865, 2000
- 9) Relling MV and Dervieux T : Pharmacogenetics and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **1** : 99-108, 2001
- 10) Tew KD : Glutathione-associated enzymes in anti-cancer drug resistance. *Cancer Res* **54** : 4313-4320, 1994
- 11) Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, et al : Complete sequencing and characterization of 21, 243 full-length human cDNAs. *Nat Genet* **36** : 40-45, 2004

予後の予測
急性白血病

間野 博行

臨 床 医

Vol. 30 No. 12 別 刷

2 0 0 4 年12月10日発行

中 外 医 学 社

1. 急性白血病

間野博行

急性白血病の治療戦略は、アントラサイクリン + シトシンアラビノシドを中心とする化学療法と骨髄移植療法とを2本柱としたプロトコールで組み立てられてきた。しかし近年、白血病の病態解明と臨床データが蓄積されるに従い、各患者個人に最適化された治療スケジュールの構築が求められている。急性白血病はきわめて多様な病因・臨床像からなるいわば症候群のようなものであるため、白血病患者への治療法の最適化のためには、白血病の成因・予後因子に応じた形での新たな患者層別化が必要であろう。そのよい例としてt(15;17)を有する急性前骨髄球性白血病 (APL) があげられる。この染色体転座の結果、レチノイン酸受容体 (RAR α) と PML との融合蛋白質が産生されるが、本分子を標的とした all-trans retinoic acid は APL の寛解導入に著効するのである。

これまで急性白血病の分類には、主に白血病細胞の形態学を基盤とした French-American-British グループ (FAB) 分類¹⁾ が利用されてきたが、近年の遺伝子解析の知見を取り入れた World Health Organization (WHO) 分類が1999年に提唱された²⁾。しかしながら、これらの分類法は各患者の予後予測にはいまだ不十分であり、たとえばDNAマイクロアレイによる網羅的発現解析データを取り入れる工夫などが試みられている。

まの ひろゆき / 自治医科大学ゲノム機能研究部教授

急性骨髄性白血病 (AML)

旧来のFAB分類では、APLに相当するM3サブタイプが予後良好なこと、また未分化なタイプのM0および赤白血病M6、巨核芽球性白血病M7が予後不良なことが知られていた。しかしながら、症例数の多いM1やM4サブタイプの患者予後は均一ではなく、新たな層別化のマーカーが待たれていた。その後、AMLにおいてしばしば観察される染色体転座の原因遺伝子が同定され、これら染色体異常と各患者予後との詳細な解析がなされるに至った。

現段階では、これらの知見を取り入れた核型による患者層別化がシンプルでかつAMLの予後予測に最も有効なものといえる。Medical Research Council (MRC) による1,600例に及ぶAML患者の核型解析の結果、表1に示される患者層別化が

表1 核型に基づくAMLサブグループの定義
(文献3より改変)

グループ	核型
favorable	t(8;21) t(15;17) inv(16)
intermediate	all others
adverse	−5/del(5q) −7 abnormal 3q complex

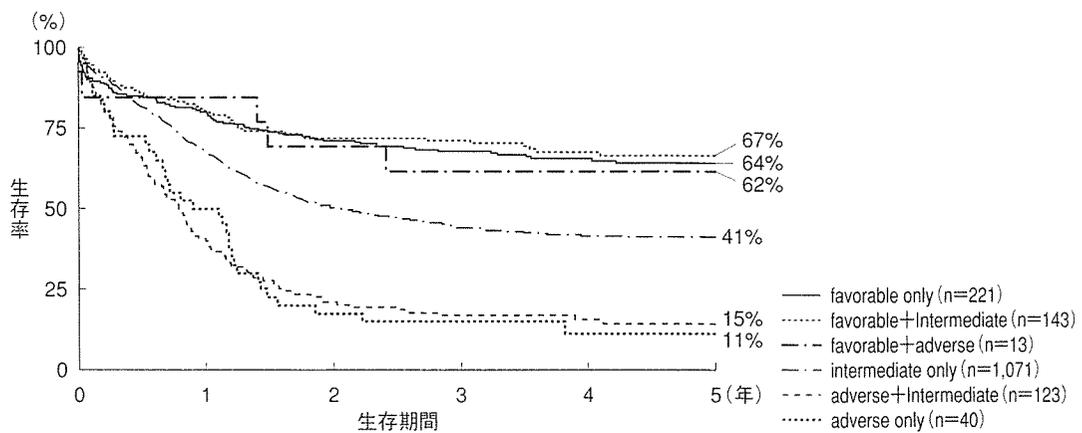


図1 核型による患者生命予後 (文献3より改変)

表1に示されるfavorable, intermediate, adverse各患者グループの生存曲線をKaplan-Meier解析で示す。3群の長期生存率が大きく異なることがわかる。

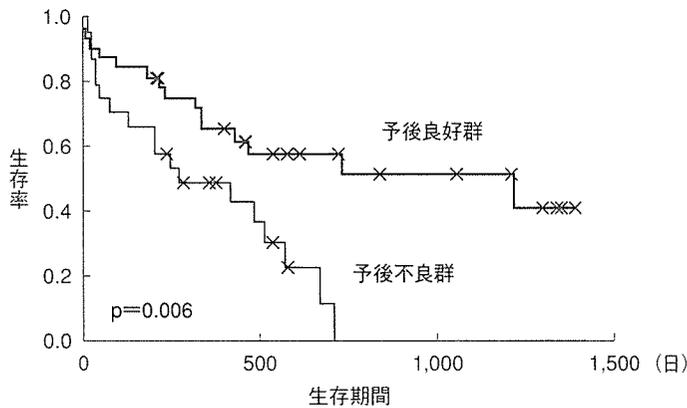


図2 DNAマイクロアレイによる層別化 (文献5より改変)

DNAマイクロアレイ解析の結果同定された「予後にリンクする遺伝子セット」の発現量を用いて、患者を2群に分類した。両群間の生存曲線が大きく異なることをKaplan-Meier解析で示す。

提案された³⁾。予後良好なfavorable groupに属するt(15;17), t(8;21) およびinv(16) は、それぞれFAB分類におけるM3, M2およびM4 Eoに相当する。また, intermediate groupに属する11q23転座はMLL遺伝子の変化を含むことが多い。一方, monosomy 7および5q-は重要な予後不良因子であるが, 本核型異常において具体的に

どの遺伝子の量的変化が重要なのかは全く不明なままである。これら核型による予後予測はきわめて強力であり, たとえば表1の各グループの長期生命予後を比較すると図1の生存曲線に示されるとおり, 3群は大きく異なる予後を有することが明らかである。なお, 「正常核型」が予後良好群ではなくintermediate groupに属することは注意すべきであろう。

核型による分類だけでは, AML患者の約半数を占める正常核型を有する患者の層別化が困難である。そこで核型以外のさまざまな

パラメータも単変量あるいは多変量解析によって検討されてきた。たとえばJapan Adult Leukemia Study Group (JALSG) の解析では, 年齢, 芽球のmyeloperoxidase陽性率, performance status, 末梢白血球数, 血球の異形成の有無などが生存に有意にリンクすることが報告されている⁴⁾。

近年では, DNAマイクロアレイを用いた網羅

的遺伝子発現データによってAML芽球の遺伝子発現プロファイルをとらえ、そのパターンから予後を予測する試みもなされている。たとえば Bullingerらは、26,260種類の遺伝子が配置されたDNAマイクロアレイを用いて、116例のAML検体（骨髄あるいは末梢血単核球）の遺伝子発現データを得た⁵⁾。これらの遺伝子中、患者予後にリンクするもの133種類を抽出し、その発現プロファイルから患者を大きく2群に分けている。その結果図2に示されるように、両患者グループの長期予後は有意に異なることが明らかになった。しかもこれら遺伝子データによる分類は、正常核型の患者内でも予後が異なる2群が存在することを示しており、発現プロファイルによる分類が旧来の核型分類とは異なる情報を与えるといえる。

急性リンパ性白血病 (ALL)

小児のALLがきわめて予後良好な白血病であるのに比し、成人のALLは一般に予後不良である。ALLはFAB分類によりL1, L2, L3の3種類に分類されてきた。L3は本邦ではまれなBurkittリンパ腫型であり、実際はL1とL2が大部分を占める。今日の治療において患者の生命予後にL1とL2の区別はリンクしておらず、新しいWHO分類でもL1, L2, L3のサブタイプは却下された。

文 献

- 1) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985; 103: 620-5.
- 2) Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al, editors. *Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC Press; 2001.
- 3) Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1612 patients entered into the MRC AML10 trial. *Blood* 1998; 92: 2322-33.
- 4) 栗山一孝, 吉田真一郎, 今西大介, 他. JALSGにおけるAML化学療法. *臨床血液* 1988; 39: 98-102.

成人ALLの予後予測因子を解析した報告は多くないが、AMLの場合と同様に核型が重要な指標となる。Cancer and Leukemia Group B (CALGB) による256例の解析では、t(9;22), t(4;11), monosomy 7, trisomy 8の存在が長期生存に対する予後不良因子であることが示された⁶⁾。さらに高齢、初診時の白血球数高値、B細胞系芽球なども同様な予後不良因子であるとされている。また、JALSGによる本邦ALL症例の解析でも、t(9;22)の存在と高齢(30歳以上)、白血球数高値(3万/mm³以上)が予後不良因子であると報告された⁷⁾。

●おわりに

核型による層別化がきわめて有効なのは、急性白血病が多様な症候群であり、その病因単位に治療法を最適化すべきであることを示唆しているといえよう。白血病の成因が漸次明らかになるに伴い、層別化がさらに細分化されるとともに、各病因に対応した分子標的療法が開発されると期待される。一方、病因の多くが不明な今日においては、それを間接的に評価可能なDNAマイクロアレイ解析が有効なツールとなるのではないだろうか。

- 5) Bullinger L, Dohner K, Bair E, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350: 1605-16.
- 6) Wetzler M, Dodge RK, Mrozek K, et al. Prospective karyotype analysis in adult acute lymphoblastic leukemia: The Cancer and Leukemia Group B experience. *Blood* 1999; 93: 3983-93.
- 7) Takeuchi J, Kyo T, Naito K, et al. Induction therapy by frequent administration of doxorubicin with four other drugs, followed by intensive consolidation and maintenance therapy for adult acute lymphoblastic leukemia: the JALSG-ALL93 study. *Leukemia* 2002; 16: 1259-66.

Overexpression of A Hybrid Gene Consisting of The Amino-Terminal Fragment of Urokinase and Carboxyl-Terminal Domain of Bikunin Suppresses Invasion and Migration of Human Ovarian Cancer Cells *In Vitro*

Yuji Takei^{1,2}, Hiroaki Mizukami², Yasushi Saga¹, Hiroshi Kobayashi³, Mika Suzuki³, Takashi Matsushita², Keiya Ozawa² and Mitsuaki Suzuki^{1,*}

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Jichi Medical School, Tochigi, Japan

²Division of Genetics Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School, Tochigi, Japan

³Department of Obstetrics and Gynecology, Hamamatsu University School of Medicine, Shizuoka, Japan

A Kunitz-type protease inhibitor, bikunin, is known to suppress the invasion and metastasis of cancer cells. HI8, a carboxyl-terminal domain of bikunin, is an active site of this glycoprotein. To increase its affinity for cancer cells, we constructed a chimeric gene, *ATF-HI8*, and investigated the anti-invasive and anti-migratory activity of *ATF-HI8* on ovarian cancer cells. *ATF-HI8*-expressing plasmid and *ATF*-expressing plasmid were introduced into the highly invasive and metastatic ovarian cancer cell line HRA. The properties of the established cell line (HRA/*ATF-HI8*) were compared to those of the HRA/*ATF* and the HRA/luciferase (HRA/*LUC*, control) cell lines in terms of cell proliferation, invasion and migration. As a result, (i) there were no differences in cell proliferation between HRA/*ATF-HI8* and HRA/*LUC*; (ii) the invasion and migration of HRA/*ATF-HI8* cells were significantly inhibited compared to those of HRA/*LUC* cells; (iii) the migration, but not the invasion, of HRA/*ATF* cells was significantly inhibited compared to that of HRA/*LUC*. These results indicate that the overexpression of *ATF-HI8* inhibits the invasion and migration of ovarian cancer cells without affecting cell proliferation and suggest that *HI8* is involved in the anti-invasive and the anti-migratory activities, and the addition of *ATF* brought about the increase in the anti-migratory activity of *HI8*. The above findings suggest the applicability of therapeutic strategies targeting the inhibition of peritoneal invasion and dissemination of ovarian cancer by the use of the chimeric gene *ATF-HI8*.

© 2004 Wiley-Liss, Inc.

Key words: bikunin; amino terminal fragment (ATF); chimeric gene; ovarian cancer; invasion; migration

Bikunin is a physiologically active glycoprotein with a molecular weight of approximately 40 kD occurring in human amniotic fluid and urine and in lower concentrations in blood. It inhibits trypsin, chymotrypsin, plasmin and elastase and is used to treat acute pancreatitis and acute circulatory failure as a drug. HI8, a carboxyl-terminal domain of bikunin, is an active site for this glycoprotein. In addition, bikunin is known to suppress the invasion and metastasis of cancer cells. The mechanism of suppression is thought to involve inhibiting the activity of plasmin on the cancer cell surface and the production of urokinase-type plasminogen activator (uPA), thereby suppressing the destruction of extracellular matrix and the basement membrane of vascular endothelial cells and tumor cells, resulting in the inhibition of cancer cell invasion and metastasis.^{1–5} Since high-affinity receptors for bikunin are not found on the surface of cancer cells, enhancement of its affinity for cancer cells is necessary to increase its effectiveness. It is known that the affinity of uPA for uPA receptors (uPAR) is approximately 500 times higher than that of bikunin for bikunin receptors.^{6,7} Therefore, we focused our attention on the amino-terminal fragment (ATF) of uPA, the receptor-binding site, under the speculation that linking ATF to HI8 would increase the affinity of HI8 to the cancer cell surface. We have previously purified a chimeric protein consisting of ATF linked to HI8 and confirmed that exogenous ATF-HI8 could inhibit cancer cell invasion and metastasis.^{7,8} The plasmid used for purification of ATF-HI8 chimeric protein had no signal sequence. In our study, we added a signal sequence to the plasmid and could cause the human cells to secrete the ATF-HI8 chimeric protein. The purpose of our study

was to construct the chimeric gene *ATF-HI8* and to investigate whether it inhibits ovarian cancer cell invasion and migration.

Material and methods

Plasmid construction

Total RNA was extracted from human placental tissue, and a human placenta cDNA library was constructed by RT-PCR. The *ATF* cDNA was cloned by PCR using the human placenta cDNA library. The *HI8* cDNA was cloned by PCR using the *bikunin* cDNA,⁹ which was cloned from human liver cDNA and kindly provided by Dr. Hiroshi Itoh at Miyazaki Medical College. The following primers containing relevant restriction sites were used to amplify the cDNA for *ATF* and *HI8*. Primer 1 (5'-CGCGGATC-CACCTCGCCACCATGAGAGCCCTGCTG-3') and primer 2 (5'-GGGGTACCATCTGCGCAGTCATGCACCATGCA-3') are primers for *ATF* cDNA. Primer 3 (5'-GGGGTACCGTGGCGG-CCTGCAATCTCCCCATAGTCCG-3') and primer 4 (5'-GCTCTAGATCAGTTGGAGAAGCGCAGCAGCTCCTCAT-3') are primers for *HI8* cDNA. After several intermediate steps, a BamHI-*ATF*-KpnI-*HI8*-XbaI fragment was subcloned into pCMV-IRES-*bsr*.¹⁰ Similarly, BamHI-*ATF*-KpnI fragment was subcloned into pCMV-IRES-*bsr*.

Transfection into HRA cell line

The human ovarian serous carcinoma cell line HRA was provided by Prof. Y. Kikuchi and was cultured as described previously.¹¹

pCMV-*ATF-HI8*-IRES-*bsr*, pCMV-*ATF*-IRES-*bsr* and the control plasmid pCMV-luciferase (*LUC*)-IRES-*bsr*¹⁰ encoding *LUC* were transfected into HRA cells by the standard calcium phosphate precipitation method.¹² The cells were selected in the presence of 10 µg/ml of blasticidin S hydrochloride (Funakoshi, Tokyo, Japan). Resistant cells were obtained after 4 weeks. HRA/*ATF-HI8*, HRA/*ATF* and HRA/*LUC* were subsequently maintained in the presence of 10 µg/ml of blasticidin S hydrochloride.

Western blotting

HRA/*ATF-HI8* and HRA/*LUC* were plated in 10 cm plastic dishes and cultured in serum-free DMEM/F-12 medium. The supernatant was collected 24 hr later and subjected to electrophoresis. Western blotting was performed by standard procedures¹³ with either anti-uPA-A chain antibody to detect the ATF portion of the

Abbreviations: ATF, amino-terminal fragment; HPF, high-power field; uPA, urokinase-type plasminogen activator; uPAR, urokinase-type plasminogen activator receptors; CMV, cytomegalovirus promoter; IRES, internal ribosome entry site; *bsr*, blasticidin S resistant gene; *LUC*, luciferase; AAV, adeno-associated virus.

*Correspondence to: Department of Obstetrics and Gynecology, Jichi Medical School, 3311-1 Yakushiji, Minamikawachi, Kawachi, Tochigi 329-0498, Japan. Fax: +81-285-44-8505. E-mail: ytakei@jichi.ac.jp

Received 22 September 2003; Accepted after revision 23 June 2004
DOI 10.1002/ijc.20548

Published online 25 August 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

chimeric protein or anti-inter-alpha-trypsin inhibitor antibody (DakoCytomation A/S, Copenhagen, Denmark) to detect the HI8 portion. Anti-mouse antibody and anti-rabbit antibody were used as the second antibodies, respectively. The reactions were visualized using an ECL Detection System (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

In vitro cell growth kinetics

HRA/ATF-HI8 and HRA/LUC were plated in 6-well plates at 5×10^4 cells/well and cultured in 10% serum-supplemented DMEM/F-12 medium. For each group, the cells in 1 well were dislodged with 0.05% trypsin-EDTA every 24 hr and were counted using a hemocytometer. This experiment was performed in triplicate.

In vitro invasion assay

The methods for testing tumor cell invasion were essentially the same as previously described.^{1-3,5,14,15} In our study, a BD BioCoat Matrigel Invasion Chamber (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) was used to measure cell invasion. Medium containing 5 μ g/750 μ l of fibronectin was added to each well. Cells (2×10^5) were resuspended in 2% serum-supplemented DMEM/F-12 (500 μ l) and seeded into the upper chamber. After incubation for 20 hr at 37°C, the chamber was stained and the number of cells invaded into the Matrigel-coated membranes was counted. We counted the cells in 5 high-power fields.

In vitro scratch wound healing assay

Cell migration was measured by the *in vitro* scratch wound healing assay.¹⁶ Monolayer cells were scratched with a sterile pipette tip in 10 cm plastic dishes, and after 8 hr of culture in 2% serum-supplemented DMEM/F-12, the cell migration was evaluated by counting cells that migrated from the wound edge.

Statistical analysis

All experiments were independently repeated twice or more. The significance of differences was analyzed by unpaired Student's *t*-test. The ANOVA and the post-hoc tests were used for

comparison among the 3 groups. A value of $p < 0.05$ was regarded as significant.

Results

Construction of the chimeric gene ATF-HI8 and its expression in HRA cells

We constructed the chimeric gene *ATF-HI8*, which was 675 bp long, containing a signal sequence to be a secretable protein.

The ATF-HI8 expression plasmid pCMV-ATF-HI8-IRES-bsr, the ATF expression plasmid pCMV-ATF-IRES-bsr and the control plasmid pCMV-LUC-IRES-bsr (Fig. 1) were each transfected into HRA cells. As shown in Figure 2, ATF-HI8 expression was detected by Western blotting at the position corresponding to a molecular weight of 22 kD in the culture supernatant of HRA/ATF-HI8, while no ATF-HI8 expression was detected in the culture supernatant of HRA/LUC.

In vitro cell growth kinetics

The growth curves of HRA/ATF-HI8 and HRA/LUC are shown in Figure 3. There were no significant differences in growth between the 2 cell lines. Therefore, expression of the *ATF-HI8* gene did not affect the cell growth *in vitro*.

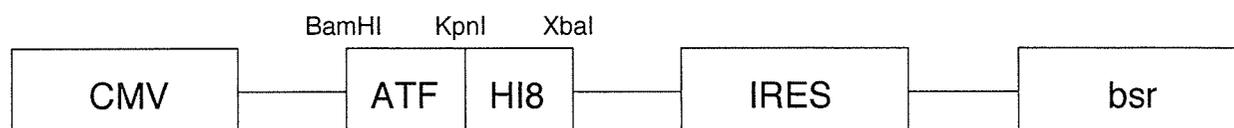
In vitro invasion assay

The effects of *ATF-HI8* expression on cell invasion *in vitro* are shown in Figure 4. ATF-HI8-expressing cells exhibited decreased invasion. The number of HRA/ATF-HI8 cells that invaded through the filter was 77 ± 24 /HPF, which was significantly lower than that of HRA/LUC (202 ± 52 /HPF, $p < 0.02$). No significant difference was noted between the numbers of HRA/ATF (119 ± 7 /HPF) and HRA/LUC.

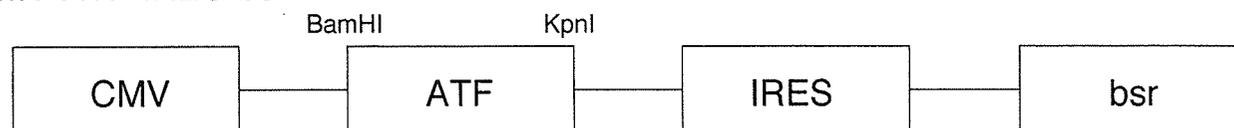
In vitro scratch wound healing assay

The effects of *ATF-HI8* expression on cell migration *in vitro* are shown in Figure 5. ATF-HI8-expressing cells exhibited decreased migration. The number of HRA/ATF-HI8 cells migrating to the scratched area was 198 ± 33 /scratched area, which was significantly lower than those of HRA/ATF (381 ± 72 /scratched area,

pCMV-ATF-HI8-IRES-bsr



pCMV-ATF-IRES-bsr



pCMV-LUC-IRES-bsr

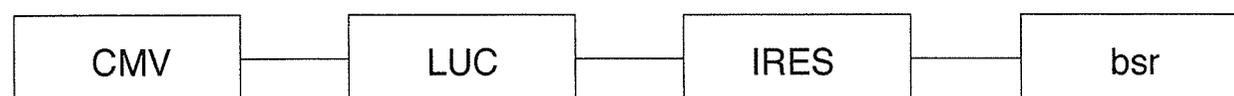


FIGURE 1 – Schematic representation of the construction of the ATF-HI8 expression plasmid vector (pCMV-ATF-HI8-IRES-bsr), ATF expression plasmid vector (pCMV-ATF-IRES-bsr) and control plasmid vector (pCMV-LUC-IRES-bsr) in a simple style. CMV, cytomegalovirus promoter; IRES, internal ribosome entry site; bsr, blasticidin S-resistant gene; LUC, luciferase.

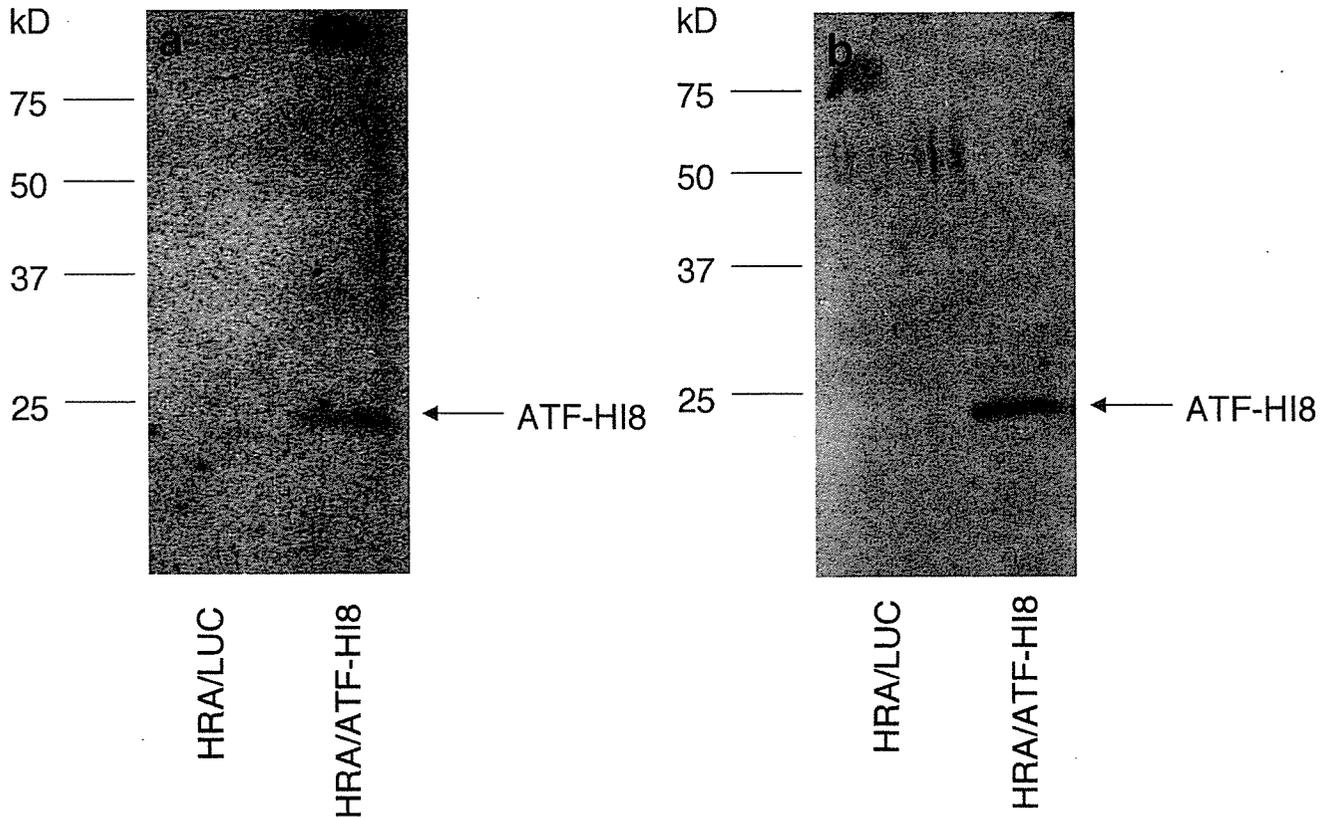


FIGURE 2 – Detection of ATF-HI8 in culture supernatant by Western blotting using anti-uPA-A chain antibody (a) and anti-inter-alpha-trypsin inhibitor antibody (b). ATF-HI8 expression was detected at a position corresponding to 22 kD. Molecular weight standards are indicated on the left of each figure.

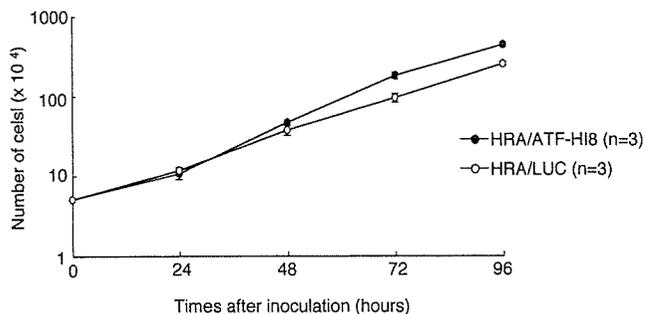


FIGURE 3 – The growth curves of HRA/ATF-HI8 and HRA/LUC. This experiment was independently repeated twice.

$p < 0.05$) and HRA/LUC cells (632 ± 78 /scratched area, $p < 0.001$). The migration of HRA/ATF cells was significantly inhibited compared to that of HRA/LUC cells ($p < 0.01$).

Discussion

In our study, we constructed the chimeric gene *ATF-HI8*, introduced it into the ovarian cancer cell line HRA and examined the influence of *ATF-HI8* expression on the cellular proliferation, invasion and migration properties.

The results showed that the overexpression of *ATF-HI8* inhibited the invasion and migration of ovarian cancer cells and that the expression of *ATF* alone inhibited the migration but not the invasion. Therefore, we speculate that *HI8* is involved in the anti-invasive and the anti-migratory activities, and the addition of *ATF*

brought about the increase in the anti-migratory activity of *HI8*. *ATF* prevents uPA from binding to the uPAR. uPA is known to be localized on the leading edge of migrating cells and to facilitate the dissolution of extracellular matrix by activating plasmin to allow cell migration. It has been reported that *ATF* competitively blocks the binding of uPA to uPAR, resulting in inhibition of the dissolution of extracellular matrix, leading to suppression of cell migration.^{17–20} To extend this approach, attempts to construct chimeric genes such as *TIMP-1-ATF* have been made in the cardiovascular field, mainly to prevent the restenosis of the vessel lumen.^{21–23}

What is the clinical relevance of the anti-migratory activity, one of the two activities of the chimeric gene *ATF-HI8*? Recently, we introduced *HGF/NK4*, a *hepatocyte growth factor (HGF)* antagonist, into an ovarian cancer cell line and showed that *HGF/NK4* overexpression inhibits ovarian cancer cell migration *in vitro* and peritoneal dissemination *in vivo*.²⁴ Thus, it is considered that cell migration is one of the critical factors that directs peritoneal dissemination and that the inhibition of cell migration could control peritoneal dissemination. Therefore, the present observation also suggests that *ATF-HI8* overexpression exerts an inhibitory effect not only on invasion but also on peritoneal disseminated metastasis of ovarian cancer.

As the body of work reflects the potential utility of *ATF-HI8* in ovarian cancer therapy, a more practical experiment should be designed to prove the clinical relevancy. For this purpose, long-term expression of *ATF-HI8* is essential, and adeno-associated virus (AAV)-mediated gene transfer into normal tissue would be a reasonable choice. Since AAV vector can transduce normal tissues such as muscle and liver,^{25–28} the AAV vector-mediated administration of *ATF-HI8* may lead to a clinical benefit.

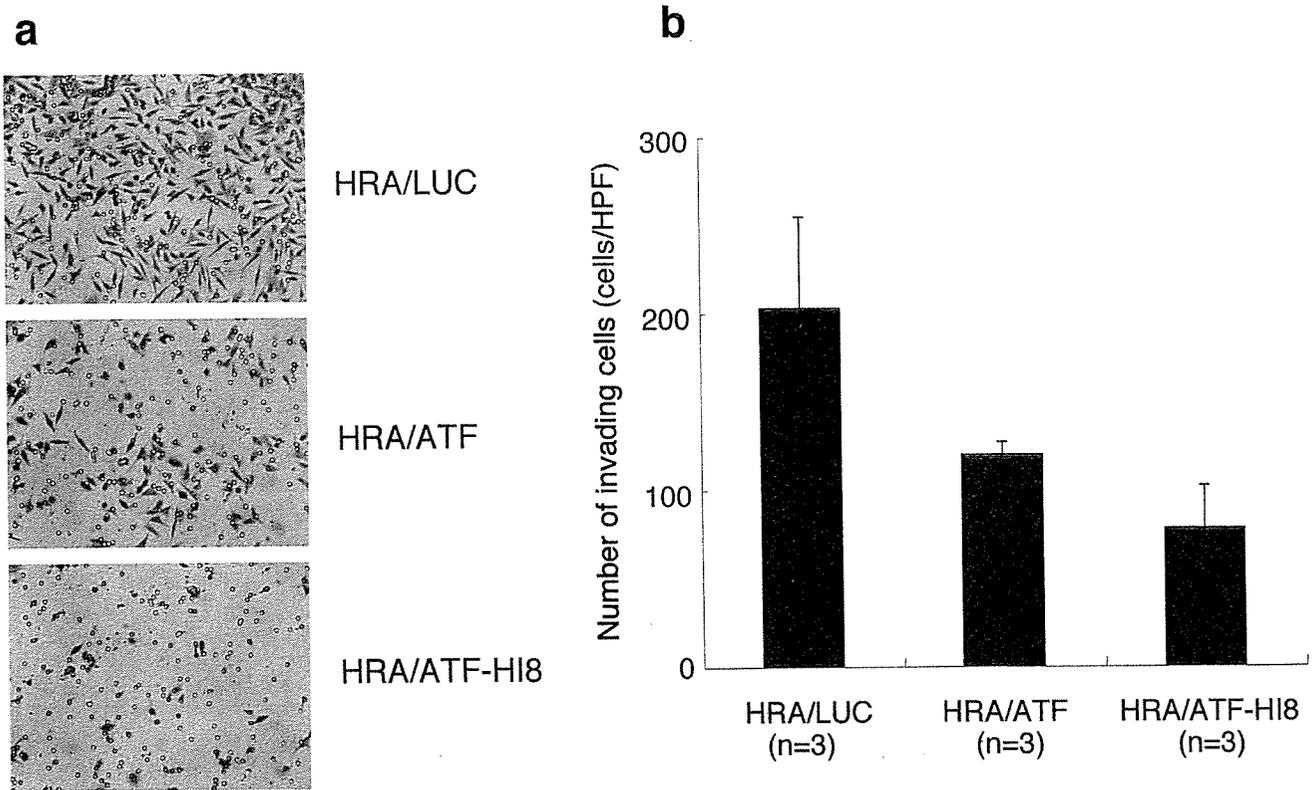


FIGURE 4 – Cell invasion of HRA/ATF-HI8, HRA/ATF and HRA/LUC in the *in vitro* invasion assay. (a) Light micrograph of cells invading through the filter onto its undersurface. (b) The number of HRA/ATF-HI8 cells invading was 77 ± 24 /HPF, which was significantly lower than that of HRA/LUC cells (202 ± 52 /HPF, $p < 0.02$). There was no significant difference between HRA/ATF (119 ± 7 /HPF) and HRA/LUC.

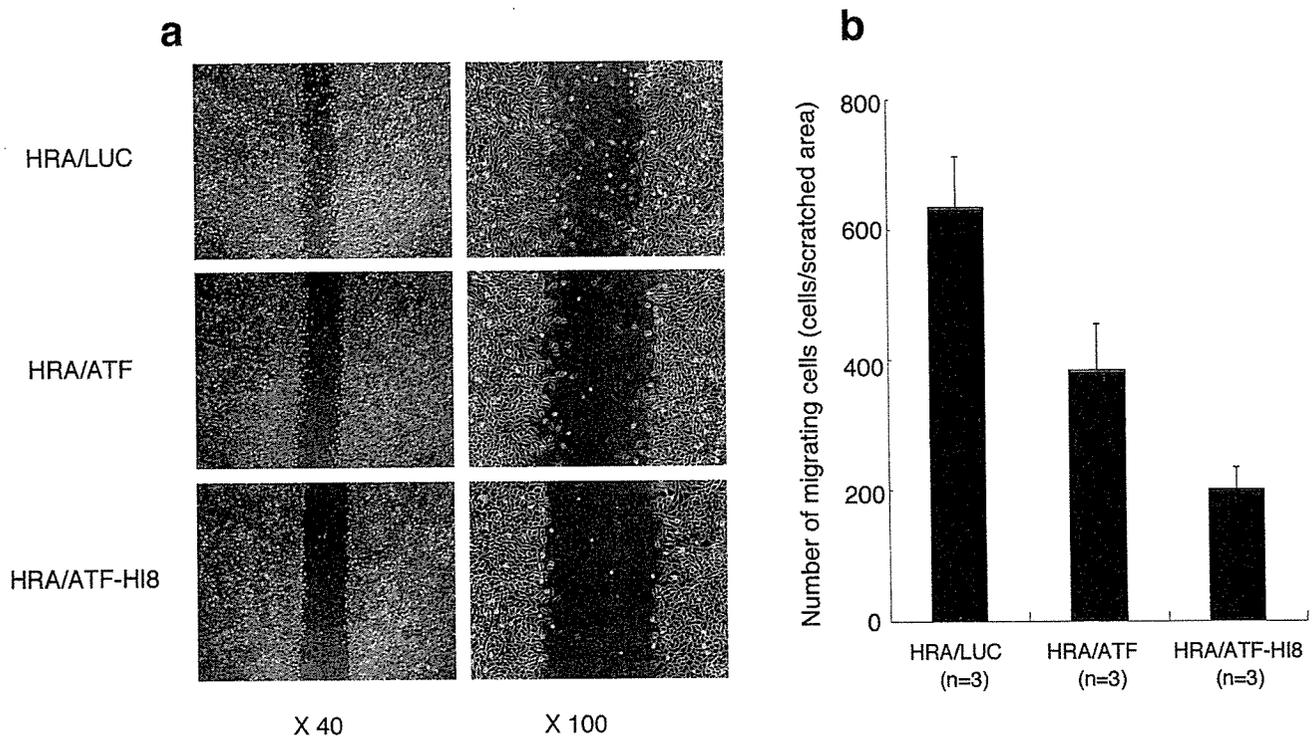


FIGURE 5 – Cell migration of HRA/ATF-HI8, HRA/ATF and HRA/LUC in the *in vitro* scratch wound healing assay. (a) Light micrograph of migrating cells. (b) The number of HRA/ATF-HI8 cells migrating 8 hr after scratching was 198 ± 33 /scratched area, which was significantly lower than those of HRA/ATF (381 ± 72 /scratched area, $p < 0.05$) and HRA/LUC cells (632 ± 78 /scratched area, $p < 0.001$). The cell number of HRA/ATF was significantly lower than that of HRA/LUC ($p < 0.01$).

In conclusion, we constructed a chimeric gene that expresses and secretes ATF-H18 and showed that *ATF-H18* overexpression inhibited the invasion and migration of ovarian cancer cells. These

findings may lead to the development of gene therapy with the *ATF-H18* gene targeting peritoneal invasion and disseminated metastasis of ovarian cancer.

References

- Kobayashi H, Fujie M, Shinohara H, Ohi H, Sugimura M, Terao T. Effect of urinary trypsin inhibitor on the invasion of reconstituted basement membranes by ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 1994;57:378–84.
- Kobayashi H, Shinohara H, Takeuchi K, Itoh M, Fujie M, Saitoh M, Terao T. Inhibition of the soluble and the tumor cell receptor-bound plasmin by urinary trypsin inhibitor and subsequent effects on tumor cell invasion and metastasis. *Cancer Res* 1994;54:844–9.
- Kobayashi H, Shinohara H, Ohi H, Sugimura M, Terao T, Fujie M. Urinary trypsin inhibitor (UTI) and fragments derived from UTI by limited proteolysis efficiently inhibit tumor cell invasion. *Clin Exp Metastasis* 1994;12:117–28.
- Kobayashi H, Gotoh J, Fujie M, Terao T. Characterization of the cellular binding site for the urinary trypsin inhibitor. *J Biol Chem* 1994;269:20642–7.
- Kobayashi H, Gotoh J, Kanayama N, Hirashima Y, Terao T, Sugino D. Inhibition of tumor cell invasion through matrigel by a peptide derived from the domain II region in urinary trypsin inhibitor. *Cancer Res* 1995;55:1847–52.
- Kobayashi H, Gotoh J, Hirashima Y, Fujie M, Sugino D, Terao T. Inhibitory effect of a conjugate between human urokinase and urinary trypsin inhibitor on tumor cell invasion in vitro. *J Biol Chem* 1995;270:8361–6.
- Kobayashi H, Sugino D, She MY, Ohi H, Hirashima Y, Shinohara H, Fujie M, Shibata K, Terao T. A bifunctional hybrid molecule of the amino-terminal fragment of urokinase and domain II of bikunin efficiently inhibits tumor cell invasion and metastasis. *Eur J Biochem* 1998;253:817–26.
- Sugino D, Okushima M, Kobayashi H, Terao T. Production of a hybrid protein consisting of the N-terminal fragment of urokinase and the C-terminal domain of urinary trypsin inhibitor in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem* 1998;27:145–52.
- Suzuki M, Kobayashi H, Tanaka Y, Hirashima Y, Kanayama N, Takei Y, Saga Y, Suzuki M, Itoh H, Terao T. Suppression of invasion and peritoneal carcinomatosis of ovarian cancer cell line by overexpression of bikunin. *Int J Cancer* 2003;104:289–302.
- Urabe M, Hasumi Y, Ogasawara Y, Matsushita T, Kamoshita N, Nomoto A, Colosi P, Kurtzman GJ, Tobita K, Ozawa K. A novel dicistronic AAV vector using a short IRES segment derived from hepatitis C virus genome. *Gene* 1997;200:157–62.
- Kikuchi Y, Kizawa I, Oomari K, Miyauchi M, Kita T, Sugita M, Tenjin Y, Kato K. Establishment of a human ovarian cancer cell line capable of forming ascites in nude mice and effects of tranexamic acid on cell proliferation and ascites formation. *Cancer Res* 1987;47:592–6.
- Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R. Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell* 1978;14:725–31.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- Kobayashi H, Gotoh J, Fujie M, Shinohara H, Moniwa N, Terao T. Inhibition of metastasis of Lewis lung carcinoma by a synthetic peptide within growth factor-like domain of urokinase in the experimental and spontaneous metastasis model. *Int J Cancer* 1994;57:727–33.
- Kobayashi H, Moniwa N, Sugimura M, Shinohara H, Ohi H, Terao T. Effects of membrane-associated cathepsin B on the activation of receptor-bound prourokinase and subsequent invasion of reconstituted basement membranes. *Biochim Biophys Acta* 1993;1178:55–62.
- Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998;280:1614–7.
- Mohanam S, Chandrasekar N, Yanamandra N, Khawar S, Mirza F, Dinh DH, Olivero WC, Rao JS. Modulation of invasive properties of human glioblastoma cells stably expressing amino-terminal fragment of urokinase-type plasminogen activator. *Oncogene* 2002;21:7824–30.
- Dear AE, Medcalf RL. The urokinase-type-plasminogen-activator receptor (CD87) is a pleiotropic molecule. *Eur J Biochem* 1998;252:185–93.
- Li H, Lu H, Griscelli F, Opolon P, Sun LQ, Ragot T, Legrand Y, Belin D, Soria J, Soria C, Perricaudet M, Yeh P. Adenovirus-mediated delivery of a uPA/uPAR antagonist suppresses angiogenesis-dependent tumor growth and dissemination in mice. *Gene Ther* 1998;5:1105–13.
- Li H, Griscelli F, Lindenmeyer F, Opolon P, Sun LQ, Connault E, Soria J, Soria C, Perricaudet M, Yeh P, Lu H. Systemic delivery of antiangiogenic adenovirus AdmATF induces liver resistance to metastasis and prolongs survival of mice. *Hum Gene Ther* 1999;10:3045–53.
- Lamfers ML, Grimbergen JM, Aalders MC, Havenga MJ, de Vries MR, Huisman LG, van Hinsbergh VW, QuaxPH. Gene transfer of urokinase-type plasminogen activator receptor-targeted matrix metalloproteinase inhibitor TIMP-1.ATF suppresses neointima formation more efficiently than tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Circ Res* 2002;91:945–52.
- QuaxPH, Lamfers ML, Lardenoye JH, Grimbergen JM, de Vries MR, Slomp J, de Ruijter MC, Kockx MM, Verheijen JH, van Hinsbergh VW. Adenoviral expression of a urokinase receptor-targeted protease inhibitor inhibits neointima formation in murine and human blood vessels. *Circulation* 2001;103:562–9.
- Lamfers ML, Wijnberg MJ, Grimbergen JM, Huisman LG, Aalders MC, Cohen FN, Verheijen JH, van Hinsbergh VW, QuaxPH. Adenoviral gene transfer of a u-PA receptor-binding plasmin inhibitor and green fluorescent protein: inhibition of migration and visualization of expression. *Thromb Haemost* 2000;84:460–7.
- Saga Y, Mizukami H, Suzuki M, Urabe M, Kume A, Nakamura T, Sato I, Ozawa K. Expression of HGF/NK4 in ovarian cancer cells suppresses intraperitoneal dissemination and extends host survival. *Gene Ther* 2001;8:1450–5.
- Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, Glader B, Chew AJ, Tai SJ, Herzog RW, Arruda V, Johnson F, et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* 2000;24:257–61.
- Ma HI, Guo P, Li J, Lin SZ, Chiang YH, Xiao X, Cheng SY. Suppression of intracranial human glioma growth after intramuscular administration of an adeno-associated viral vector expressing angiostatin. *Cancer Res* 2002;62:756–63.
- Davidoff AM, Nathwani AC, Spurbeck WW, Ng CY, Zhou J, Vanin EF. rAAV-mediated long-term liver-generated expression of an angiogenesis inhibitor can restrict renal tumor growth in mice. *Cancer Res* 2002;62:3077–83.
- Shimpo M, Ikeda U, Maeda Y, Takahashi M, Miyashita H, Mizukami H, Urabe M, Kume A, Takizawa T, Shibuya M, Ozawa K, Shimada K. AAV-mediated VEGF gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model. *Cardiovasc Res* 2002;53:993–1001.



RESEARCH ARTICLE

Adeno-associated virus vector-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice

T Yoshioka^{1,2,3}, T Okada², Y Maeda¹, U Ikeda³, M Shimpo¹, T Nomoto², K Takeuchi⁴, M Nonaka-Sarukawa¹, T Ito¹, M Takahashi³, T Matsushita², H Mizukami², Y Hanazono², A Kume², S Ookawara⁴, M Kawano⁵, S Ishibashi⁶, K Shimada¹ and K Ozawa²

¹Division of Cardiovascular Medicine, Jichi Medical School, Tochigi, Japan; ²Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School, Tochigi, Japan; ³Department of Organ Regeneration, Shinshu University Graduate School of Medicine, Matsumoto, Japan; ⁴Department of Anatomy, Jichi Medical School, Tochigi, Japan; ⁵Department of Laboratory Medicine, Jichi Medical School, Tochigi, Japan; and ⁶Division of Endocrine and Metabolism, Jichi Medical School, Tochigi, Japan

Inflammation is a major contributor to atherosclerosis by its effects on arterial wall biology and lipoprotein metabolism. Interleukin-10 (IL-10) is an anti-inflammatory cytokine that may modulate the atherosclerotic disease process. We investigated the effects of adeno-associated virus (AAV) vector-mediated gene transfer of IL-10 on atherogenesis in apolipoprotein E (ApoE)-deficient mice. A murine myoblast cell line, C2C12, transduced with AAV encoding murine IL-10 (AAV2-mIL10) secreted substantial amounts of IL-10 into conditioned medium. The production of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by the murine macrophage cell line, J774, was significantly inhibited by conditioned medium from AAV2-mIL10-transduced C2C12 cells. ApoE-deficient mice were injected with AAV5-mIL10 into their anterior tibial muscle at 8 weeks of age. The expression of MCP-1 in the vascular wall of the ascending aorta and serum MCP-1

concentration were decreased in AAV5-mIL10-transduced mice compared with AAV5-LacZ-transduced mice. Oil red-O staining of the ascending aorta revealed that IL-10 gene transfer resulted in a 31% reduction in plaque surface area. Serum cholesterol concentrations were also significantly reduced in AAV5-mIL10-transduced mice. To understand the cholesterol-lowering mechanism of IL-10, we measured the cellular cholesterol level in HepG2 cells, resulting in its significant decrease by the addition of IL-10 in a dose-dependent manner. Furthermore, IL-10 suppressed HMG-CoA reductase expression in the HepG2 cells. These observations suggest that intramuscular injection of AAV5-mIL10 into ApoE-deficient mice inhibits atherogenesis through anti-inflammatory and cholesterol-lowering effects. Gene Therapy (2004) 11, 1772–1779. doi:10.1038/sj.gt.3302348; Published online 21 October 2004

Keywords: IL-10; AAV; atherosclerosis; cholesterol

Introduction

The inflammatory reaction involves complex interactions between inflammatory cells (lymphocytes and macrophages) and vascular endothelial and smooth muscle cells. The disturbance of vascular wall integrity and homeostasis by inflammation is thought to be a major contributor to atherosclerosis. Therefore, an anti-inflammatory strategy may be a promising approach to prevent and treat atherosclerotic disease. Another critical feature of atherogenesis is lipid accumulation. Several large-scale clinical trials have demonstrated that lipid reduction therapy involving HMG-CoA reductase inhibitor (statin) is useful for atherosclerotic disorders, such as ischemic heart disease.^{1,2} Recent studies have indicated that statins have pleiotropic effects on the atherogenic process, including an anti-inflammatory effect.³ On the

other hand, proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1, and IL-6, have profound effects on lipid metabolism.⁴ These findings suggest that there are complex interactions between inflammation and lipid metabolism.

IL-10, which is secreted by a wide variety of cells such as lymphocytes and macrophages, is a key inhibitor in a number of inflammatory responses,⁵ including the production of proinflammatory cytokines and chemokines and the expression of endothelial adhesion molecules. IL-10 expression has been identified in early and advanced atherosclerotic plaques^{6,7} and is thought to have potential antiatherogenic effects. Indeed, recent studies have shown that IL-10-transgenic mice fed a high-fat diet exhibit a decrease in atherogenesis.⁸ Conversely, IL-10-deficient mice were found to suffer from more severe atherosclerosis, and the atherogenic tendency of these mice was ameliorated by the plasmid-mediated introduction of IL-10.⁹ IL-10 is thought to have a protective role in human atherosclerotic disease as well.^{10,11}

Despite the tremendous interest in the effects of cytokines on inflammation and lipoprotein metabolism, there have been few studies that have examined the

Correspondence: Dr K Ozawa, Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School, 3311-1 Yakushiji, Minami-kawachi, Tochigi 329-0498, Japan

Received 9 November 2003; accepted 12 June 2004; published online 21 October 2004

influence of IL-10 on these processes *in vivo*.^{12,13} As atherogenesis is a chronic process, the long-term expression of IL-10 is required in order to assess its effects on this disease. In this study, we have used adeno-associated virus (AAV) vectors for IL-10 gene transfer to investigate the antiatherosclerotic effects of IL-10 *in vivo*, because these vectors can transduce skeletal muscle and permit the sustained expression and systemic delivery of therapeutic proteins following a single intramuscular administration.¹⁴

Results

IL-10 expression in C2C12 cells

We first verified the integrity of our vectors *in vitro*. Differentiated C2C12 cells, murine myoblasts, were transduced with AAV encoding murine IL-10 (AAV2-mIL10) at various dosages and cultured for 48 h. The concentration of IL-10 in the conditioned medium was found to increase in a vector dose-dependent manner (Figure 1a). Western blot analysis demonstrated the presence of an 18-kDa product, the size expected for murine IL-10, in the conditioned medium of AAV2-mIL10-transduced C2C12 cells, but not in the conditioned medium of AAV2-LacZ-transduced cells (Figure 1b).

To evaluate the biological activity of secreted IL-10, we examined the influence of conditioned medium from AAV2-mIL10-transduced C2C12 cells on cytokine production by J774 cells, murine macrophages. As shown in Figure 1c, treatment with lipopolysaccharide (LPS) increased the production of the cytokines, IL-6, TNF- α , and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), from J774 cells. These increases were significantly inhibited by the addition of conditioned medium from AAV2-mIL10-transduced C2C12 cells, and the production of these cytokines was completely restored in the presence of anti-mIL-10 antibody (1 μ g/ml). Unstimulated J774 cells did not exhibit any change in cytokine expression when exposed to the conditioned medium.

IL-10 expression in apolipoprotein E-deficient mice

We next injected AAV2-mIL10 and AAV5-mIL10 into the anterior tibial muscle of apolipoprotein E (ApoE)-deficient mice. The serum concentration of IL-10 increased in a vector dose-dependent manner, and the efficacy of transduction was higher in AAV5-mIL10-treated mice than in AAV2-mIL10-treated mice at the same vector dose (1×10^{13} genome copies/body) (Figure 2). When 1×10^{12} genome copies/body of AAV5-mIL10 were injected, the serum IL-10 levels (1.2–4.9 ng/ml) were maintained at a higher than physiological range (up to 160 pg/ml) for 8 weeks. Moreover, the serum IL-10 levels at 14 months were 398.3 ± 146.6 pg/ml.

Effect of IL-10 on MCP-1 expression

We then investigated the anti-inflammatory effects of IL-10 in ApoE-deficient mice by focusing on the expression of MCP-1, a potent chemokine implicated in atherogenesis. ApoE-deficient mice transduced with AAV5-mIL10 at 4 weeks old were evaluated at 8 weeks old. Few atherosclerotic lesions were detected by oil red-O staining at this time point. An immunohistochemical analysis of MCP-1 in the aortic sinus of ApoE-deficient mice revealed that MCP-1 expression was modestly

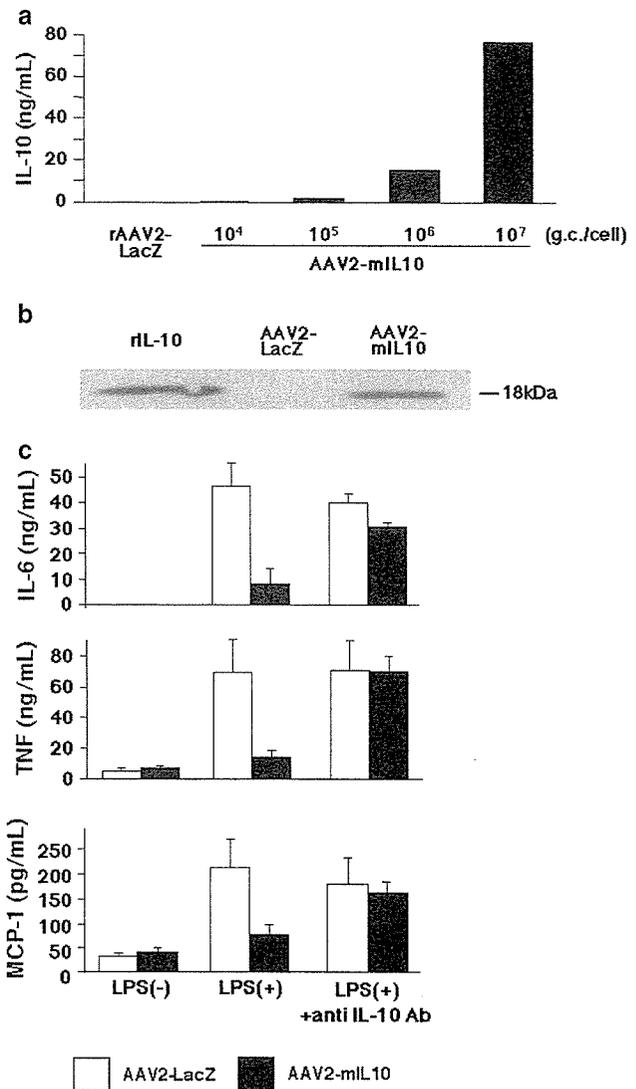


Figure 1 Transduction of the IL-10 gene into C2C12 cells with AAV2-mIL10. (a) Concentration of IL-10 in the conditioned medium of AAV2-mIL10-transduced C2C12 cells. The IL-10 concentration was measured by ELISA 48 h after transduction with the indicated number of genome copies per cell (g.c./cell). (b) Western blotting with an anti-IL-10 antibody was performed after immunoprecipitation of the conditioned medium of AAV2-mIL10- and AAV2-LacZ-transduced C2C12 cells. Recombinant mouse IL-10 (rIL-10) was used as a positive control. (c) LPS-stimulated J774 cells were incubated with the conditioned medium of AAV2-mIL10- (solid bars) or AAV2-LacZ (open bars)-transduced C2C12 cells for 24 h in the presence or absence of anti-IL-10 antibody (1 μ g/ml). IL-6, TNF- α , and MCP-1 concentrations were analyzed by ELISA. Data are means \pm s.e.m. (n = 4).

suppressed in AAV5-mIL10-transduced mice, whereas it was clearly observed in the vascular wall of AAV5-LacZ-transduced mice (Figure 3a). Moreover, 8 weeks after gene transfer, the serum concentration of MCP-1 in AAV5-mIL10-transduced mice was significantly reduced compared with that in AAV5-LacZ-transduced mice (Figure 3b).

Effects of IL-10 on atherogenesis

We evaluated the lesion area in ApoE-deficient mice fed an atherogenic diet 8 weeks after gene transfer. As shown in Figure 4, the aortic sinus of mice transduced with AAV5-mIL10 revealed a significant decrease in oil