

学位論文題名

Intraperitoneal injection of adenovirus expressing antisense
K-ras RNA suppresses peritoneal dissemination of hamster
syngeneic pancreatic cancer without systemic toxicity

(アンチセンス *K-ras* RNA 発現アデノウイルスの腹腔内投与による、
膵がん腹膜播種の抑制)

学位論文内容の要旨

【目的と背景】

膵がんは大きさの大小問わず周辺組織への高い浸潤性を有し、現在治療困難ながんの一つであり、新しい治療法の開発が急務である。*K-ras* 遺伝子はがん遺伝子の一つで第 12 染色体短腕上に位置し、GTPase 活性をもつ GTP・GDP 結合蛋白である p21 をコードしている。膵がんでは、*K-ras* 遺伝子の点突然変異が約 80% の高率で認められ、その発生やがん形質の発現に深く関与していると考えられている。これまでに、ヒト野生型 *K-ras* 遺伝子に対するアンチセンス RNA 発現ベクターにより、膵がんの増殖を抑制できるという報告があり、*K-ras* 遺伝子が膵がんに対する遺伝子治療の標的として効果的であることが示されている。従来報告ではリポソームを用いて遺伝子導入を行ってきたが、遺伝子導入効率の高いアデノウイルスベクターを用いることにより、臨床応用可能な治療効果が期待できる。本実験では、膵がんの二つの腹膜播種モデルを用いてアンチセンス *K-ras* 発現アデノウイルスベクターの抗腫瘍効果と安全性について検討した。

【方法と結果】

四種類のヒト膵がん細胞株 (AsPC-1、Panc-1、MIAPaCa-2、BxPC-3) およびハムスター膵がん細胞株 (PGHAM-1) を用いた。AsPC-1、Panc-1、MIAPaCa-2、PGHAM-1 は *K-ras* 遺伝子の点突然変異を有するが、BxPC-3 は野生型 *K-ras* 遺伝子を有する。ヒト型、ハムスター型両者とも CAG プロモーター下流に *K-ras* 遺伝子のエクソン 1 と 2 およびエクソン 3 の一部の cDNA フラグメント (347bp) を組み込んだアデノウイルスベクターを使用した。

in vitro においてヒト型アンチセンス *K-ras* アデノウイルスのヒト膵がん細胞に対する効果の検討では、アンチセンス *K-ras* アデノウイルスを感染した場合、*K-ras* 遺伝子の点突然変異を有するヒト膵がん細胞株では *K-ras* p21 蛋白質の発現が明らかに抑制され、細胞増殖を効率よく抑制した。また、Annexin V を用いた検討ではアデノウイルスの用量依存的にアポトーシスが誘導された。次に、ヌードマウスの腹腔内に AsPC-1 を移植後、アンチセンス *K-ras* アデノウイルスを腹腔内注入し、ヒト型アンチセンス *K-ras* アデノウイルス

スの *in vivo* での抗腫瘍効果について検討した。アンチセンス導入群ではコントロール群と比べ腹腔内の腫瘍形成は抑制されていた。また、治療したマウスに RNA 発現によると思われる異常所見は認めなかった。

ベクターに組み込んだヒト型 K-ras 遺伝子 cDNA 断片はマウスと 16 カ所の相違があるため、ヒト野生型 K-ras 遺伝子のアンチセンス RNA 発現の毒性に関しては、マウスの系では過小評価する必要がある。そこで、化学発がんにより誘導されたハムスターの膀胱がん細胞 (PGHAM-1) を移植して作製した腹膜播種モデルにおいて、ハムスター型アンチセンス K-ras アデノウイルスを用いて治療効果および安全性に関して検討を行った。まず、*in vitro* ではハムスター型アンチセンス K-ras アデノウイルスを MOI 30 にて PGHAM-1 に感染させたところ明らかに細胞増殖を抑制し、容量依存的にアポトーシスを誘導できた。また、ハムスター型アンチセンス K-ras と 12 塩基の相違があるヒト型アンチセンス K-ras アデノウイルスでも PGHAM-1 の増殖を抑制することが可能であった。*in vivo* において、まずハムスター腹膜播種モデルにおいて lacZ 遺伝子発現アデノウイルスベクターを腹腔内注入し遺伝子導入効率を検討した。X-gal 染色陽性細胞は膀胱および腸間膜上の播種巣で特に観察され、また、膀胱実質内でも観察されたこと、肝実質、肺ではごくわずかであったことから、腹膜播種に対する遺伝子導入方法として腹腔内注入は有効であることが示唆された。次に、ハムスター膀胱がん腹膜播種モデルにおいてアンチセンス K-ras アデノウイルスの腹腔内投与による抗腫瘍効果について検討した。コントロールウイルス群では腹水貯留を伴う著明な腫瘍塊の形成が認められたが、ハムスター型およびヒト型アンチセンス K-ras アデノウイルス注入群では血清生化学所見および病理学的所見に著明な変化を来すことなく、効率良く腹膜播種を抑制することができた。さらに、ハムスターの系において、アンチセンス K-ras RNA の毒性を検討するために、アデノウイルスの用量を $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ pfu に分けた検討でも、血清生化学所見には明らかな異常は認められず、アンチセンス K-ras 関連の毒性は少ないことが示唆された。

【考察】

本研究はアンチセンス K-ras RNA 発現アデノウイルスベクターが膀胱がん腹膜播種に対し安全かつ有効な治療法であることを、同種モデルにおいて示した最初の報告である。

本研究の腫瘍特異性が高い要因としては、細胞の生存・増殖を K-ras 遺伝子の活性化に依存する程度が膀胱がん細胞と正常細胞で異なること、肝などの正常臓器は腹膜に覆われており、その腹膜中皮細胞がベクターによる遺伝子導入の大きな障壁であること、などが考えられた。実際本実験において肝、肺などの正常細胞は腫瘍細胞より導入遺伝子の発現が少なかった。これまでのプラスミドベクターを用いた検討ではアンチセンス K-ras RNA 自体の効果が不明であったが、本研究ではアンチセンス K-ras アデノウイルスが用量依存的にアポトーシスを誘導することを示した。これはアデノウイルスベクターによる高効率の遺伝子導入システムによりそのようなアポトーシスの誘導を同定できた可能性がある。活性化 Ras により phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-K) を介して、AKT が活性化することが知られている。K-ras を抑えることによりこの経路が抑制されてアポトーシスが誘導されると考えられるが、その詳しい機序は明らかではない。

腹膜播種は膀胱がんにおける末期状態であり、従来の治療法は一般的には困難である。しかし、播種早期であれば本研究のように腫瘍抑制効果が期待できる。さらに、キャプシド蛋白質改

変組織特異的アデノウイルスベクターを開発しようという試みがあり、ベクターの組織特異性を高めることと、血管新生阻害やアンチセンス K-ras RNA のような生理学的な組織特異性を合わせることにより、膵がん腹膜播種に対する遺伝子治療において治療域の増大や安全性を高めることが可能と考えられる。

【結語】

本研究は、アデノウイルスを用いてアンチセンス K-ras を膵がん細胞に導入する治療戦略の有用性と安全性を示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 武 蔵 学
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

Intraperitoneal injection of adenovirus expressing antisense K-*ras* RNA suppresses peritoneal dissemination of hamster syngeneic pancreatic cancer without systemic toxicity

(アンチセンス K-*ras* RNA 発現アデノウイルスの腹腔内投与による、
膵がん腹膜播種の抑制)

膵がんでは、K-*ras* 遺伝子の点突然変異が約 80%の高率で認められ、その発生やがん形質の発現に深く関与していると考えられている。これまでに、ヒト野生型 K-*ras* 遺伝子に対するアンチセンス RNA 発現ベクターにより、膵がんの増殖を抑制できるという報告がある。従来のリポソームと比べ遺伝子導入効率の高いアデノウイルスベクターを用いることにより、臨床応用可能な治療効果が期待できる。今回申請者は、膵がんの二つの腹膜播種モデルを用いてアンチセンス K-*ras* 発現アデノウイルスベクターの抗腫瘍効果と安全性について検討した。

*in vitro*において、ヒト型アンチセンス K-*ras* アデノウイルスをヒト膵がん細胞に感染した場合、K-*ras* 遺伝子の点突然変異を有するヒト膵がん細胞株では K-*ras* p21 蛋白質の発現が明らかに抑制され、細胞増殖を効率よく抑制した。また、マウス腹膜播種モデルでもアンチセンス導入群では腹腔内腫瘍形成は著明に抑制されていた。さらにアンチセンス RNA 発現の毒性を正確に評価するためハムスターの同系の腹膜播種モデルを用い治療効果および安全性に関して検討を行った。*in vitro*ではハムスター型およびヒト型アンチセンス K-*ras* アデノウイルスのハムスター膵がん細胞株への感染で明らかに細胞増殖を抑制した。また、*in vivo*での遺伝子導入効率は膵および腸間膜上の播種巣で高いことから、腹膜播種に対する遺伝子導入方法として腹腔内注入は有効であることが示唆され、さらに、ハムスター膵がん腹膜播種モデルにおいてアンチセンス K-*ras* アデノウイルス注入群では血清生化学所見および病理学的所見に著明な変化を来すことなく、効率良く腹膜播種を抑制することから、アンチセンス K-*ras* 関連の毒性は少ないことが示唆された。

公開発表にあたって、副査の近藤教授から、アデノウイルスベクターの長所・短所、術後

の癒着等により腹腔内投与が難しい場合など実際の臨床での投与方法についての質問があった。これに対して申請者は、アデノウイルスベクターが非分裂期の細胞を含めた広範囲の細胞に高効率で遺伝子導入が可能であるが、免疫原性の問題や肝等の正常細胞への集積という点から今後組織特異的なベクターの開発が必要と考えられること、今回の想定したモデルとしては播種早期の段階を考えており、術前および術後に腹腔内投与し腹膜播種巣の増大を抑制することが可能と考えられることを解答した。次に副査の浅香教授より K-ras を標的とするだけで効果は十分かについて、細胞株間での増殖抑制効果の差について、アンチセンス K-ras の主な作用機序に関して、siRNA 等の可能性に関しての質問があった。これに対し申請者は、近年、がん細胞は数多くの遺伝子異常を有するものの、その生存・増殖をある特定のがん遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の抑制に強く依存していることがいわれており、膵がんにおいてはそれが K-ras 遺伝子の活性化と考えられるため標的としては有望と考えられること、細胞株間での効果の差に関してはアデノウイルスの感染効率、K-ras に生存・増殖を依存している割合が異なることを理由に挙げた。また、今回のアンチセンス K-ras の作用機序としてはアポトーシスが一部関与している可能性があることを解答した。さらにハムスターの系においてヒト型アンチセンス K-ras も増殖抑制効果があったことから、siRNA のような短い配列を用いても効果が出る可能性を述べた。最後に主査の武蔵教授から、ハムスターモデルにおける造血・血球系への影響について、K-ras を抑えることで、他の ras への影響およびその下流の遺伝子の変化に関して、K-ras に対する新規分子標的治療薬との比較に関しての質問があった。これに対し申請者は、遺伝子導入早期では血球系にも異常所見は認めなかったが、2週間以上の長期観察も今後必要になると考えられること、マイクロアレイ解析にて Raf 系の遺伝子は抑制されているが H-ras, N-ras には異常を認めなかったことを解答した。新規分子標的治療薬との比較はしていないが、マイクロアレイ解析にてアンチセンス K-ras アデノウイルスの感染で、約 30 倍 K-ras 遺伝子の発現を抑えることから効果的には十分と考えられること、早期播種の状態であればアデノウイルスベクターの腹腔内投与は有効な投与方法であり有望な治療法と考えられることを解答した。

本研究は、アデノウイルスを用いてアンチセンス K-ras を膵がん細胞に導入する治療戦略の有用性と安全性を示したことで高く評価され、今後の膵がんに対する遺伝子治療として臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。