

# 低酸素適応応答を利用する癌治療法と血管閉塞性疾患治療法の開発

小林 正伸 [北海道大学遺伝子病制御研究所／助教授]

小林 隆彦 [北海道大学医学部附属病院総合診療部／講師]

近藤 健 [北海道大学大学院医学研究科／助手]

進藤 正信 [北海道大学大学院歯学研究科／助教授]

陳 健 [北海道大学／非常勤研究員]

趙 溫利 [北海道大学／非常勤研究員]

## 背景・目的

膵癌は5年生存率5%程度と難治癌の代表的存在である。膵癌はhypovascularであり、生体内では低酸素環境下で増殖する。(図1)

この膵癌の低酸素適応応答が難治性である一つの理由と考えられるが、膵癌といえども酸素生物であるという限界を乗り越えることはできず、血管新生や嫌気性代謝などの低酸素適応応答によって適応している。

本研究は、第一に膵癌において大量に産生されている血管新生因子アドレノメジュリンを阻害するアドレノメジュリンアンタゴニスト発現ベクターの筋肉内投与による治療法を開発する。第二に低酸素下で発現亢進するPX蛋白の抗アポトーシス作用を抑制し、細胞死を誘導する膵癌治療法を開発する。

## 内容・方法

### 1) アドレノメジュリンアンタゴニストに関して

アドレノメジュリンアンタゴニストペプチドの腫瘍内投与についてはすでに報告している。今回は、アドレノメジュリンアンタゴニスト発現ベクターを非ウイルスベクターにて作成し、この発現ベクターを腫瘍内、および筋肉内に投与して抗腫瘍効果を検討した。また、抗腫瘍効果のメカニズム解析のために、病理組織標本を作製して血管内非細胞の存在を検討した。また、副作用に付いては採血をして腎機能肝機能をチェックした。

### 2) PXに関して

dominant negative PX導入株とsiRNAにてPX蛋白を消去したときの抗癌剤感受性の回復があるのかどうかを検討した。さらにdominant negative PXをTet-on systemにて導入した細胞株を樹立し、テトラサイクリン投与後に生体内増殖がどうなるのかを検討した。

## 結果・成果

### 1) アドレノメジュリンアンタゴニスト

血管新生は、VEGFをはじめとした多くの因子の共同作業によっておこなわれるものと想像されている。しかしながらその

詳細な機構は不明である。とりわけ毛細血管のような細い血管から太い血管が形成される機構についてはEphrinの関与が指摘されている以外ほとんど不明である。これまでの研究でVEGF knock-out miceでは血管新生が阻害されていることから、VEGFが少なくとも胎生期の血管新生に必須であることが判明している。しかしながら、ヒト腫瘍への抗VEGF抗体が効かないなど、腫瘍における血管新生におけるVEGFの役割も不明確であるし、腫瘍血管新生がどのように制御されているのかは不明である。図に腫瘍血管の血管造影影像を示すが、多くの新生血管が認められるのがわかる。しかしながらこれらの血管は、血流が遅くなっているために造影されるので、決して血流量が多いわけではない。むしろ血流が遅いがゆえに時間あたりの血液供給量は血管新生において最もクリティカルな段階は血球が通過しないような細い血管から血球が通過できるような機能的血管へ成熟する段階であると考えられる。われわれは、低酸素下で誘導される血管新生因子を網羅的に同定するために低酸素誘導遺伝子をDNA microarray法にて探索した。その結果、adrenomedullinがその候補であることを見出した。(図2)

さらにアドレノメジュリンアンタゴニストの腫瘍内投与によって膵癌の退縮が得られた。(図3)

その機序を検討したところ、アドレノメジュリンアンタゴニスト投与群にて内径の太い血管の新生が抑制されていることを見出した。(図4)

これらの結果は、アドレノメジュリンアンタゴニスト(AMA)がまさにこのクリティカルな細い血管が太くなるという血管新生の段階に関与する可能性を示唆している。しかもアドレノメジュリン(AM)の発現が低酸素下でのみ誘導されることが知られており、アドレノメジュリンの機能抑制は腫瘍組織のような低酸素環境下にある組織以外では何もない。つまりAMAによる血管新生阻害は、何らの副作用も示すことのない治療法となる可能性がある。しかも、現在開発している遺伝子治療法は非ウイルス由来のNaked DNAを用いてAMAというペプチドを產生させることだけで癌を治療しようとするため、導入効率やウイルス由来ベクターの危険性を考慮する必要もない。現在までにAMAペプチド発現ベクターの腫瘍内注入、筋肉内注入によってSCIDマウスにおけるヒト膵癌の退縮を誘導できることを見出している。

これらの結果は、AMAペプチド発現ベクターを筋肉内に注射するだけで癌治療が可能となることを示唆している。しかも、原発巣ばかりか転移巣の治療にも応用可能であることを示している。

さらに、アドレノメジュリンアンタゴニスト発現ベクターを非ウイルスベクターにて作成し、発現ベクターを腫瘍内、および筋肉内に投与して抗腫瘍効果を検討した。また、抗腫瘍効果

のメカニズム解析のために、病理組織標本を作製して血管内非細胞の存在を検討した。また、副作用について採血をして腎機能肝機能をチェックした。

その結果、アドレノメジュリンアンタゴニスト発現ベクターの腫瘍内1回投与でも筋肉内1回投与でも、完全に腫瘍細胞株の退縮が認められた。(図5)

1回の腫瘍内投与後の病理学的所見では、血管内皮細胞が完全に消失していた。(図6)

さらに、腫瘍内投与が困難であることを考慮して、腫瘍部位から離れた筋肉内に発現ベクターを1回投与した。その結果も同様に完全に腫瘍増殖を抑制できた。(図7)

病理組織学的には、アドレノメジュリンアンタゴニスト発現ベクターを投与した群では腫瘍内の血管内皮細胞が完全に消失していた。一方コントロールベクター投与群では多数の血管内皮細胞が観察された。(図8)

腎機能と肝機能に関してはコントロールとの差を認めなかった。この結果は、筋肉内への非ウイルスベクターに組み込んだアドレノメジュリンアンタゴニストの注射によって遠隔部位の腫瘍を治療できる可能性を示しており、実際のヒトへの応用も充分に可能と考えられる。

## 2) PXに関して

dominant negative PX導入株とsiRNAにてPX蛋白を消去したときの抗癌剤感受性の回復があるかどうかを検討した。その結果、dominant negative PX導入株においては低酸素下でも正常酸素分圧下でも同様のパーセントの細胞が死亡することを見出した。(図9)

またsiRNAにてPX蛋白を消去したときにも同様に低酸素下でも正常酸素分圧下でも同様のパーセントの細胞が死亡することを見出した。(図10)

これらの事実は、PXが低酸素下で誘導される抗癌剤耐性の責任遺伝子であり、PXの機能を阻害すれば抗癌剤耐性を解除できる可能性を示している。さらにdominant negative PX導入株とdominant negative PXをTet-on systemにて導入した細胞株の造腫瘍性を検討したところ、dominant negative PX導入株は造腫瘍性を失っていた。(図11)

dominant negative PXをTet-on systemにて導入した細胞株をまず樹立した。(図12)

こうした導入株をSCIDマウスに移植してテトラサイクリンを投与後の細胞増殖を観察すると、以下のようにテトラサイクリン投与後に増殖抑制が認められた。(図13)

これらの事実は、PX遺伝子が抗癌剤耐性に関与する遺伝子であるばかりか、生体内増殖にも必須の遺伝子である可能性を示唆している。今後はこの阻害方法を見出せれば、癌の治療薬の開発につながる。

## 4. 今後の展望

今年中に、アドレノメジュリンアンタゴニスト発現ベクターの安全性を確認する前臨床試験を予定しており、近い将来に臨床応用へ向けて準備していきたいと考えている。またPXに関しては、阻害剤と活性化剤の探索を進めており、阻害剤や活性化剤が見つかれば、同様に安全性試験などを経て、臨床への応用を考えたい。

### 腫瘍の血管造影

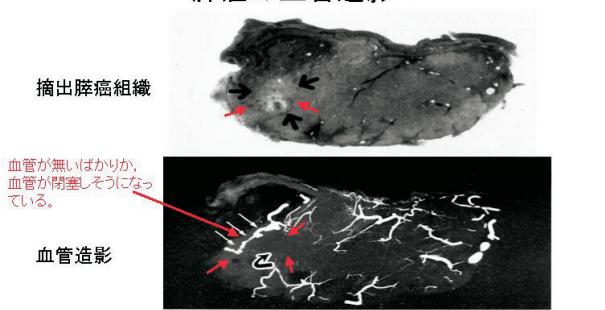
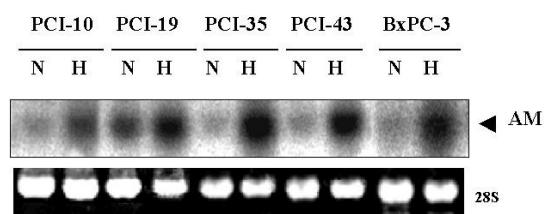


図1 腫瘍の血管造影

### 低酸素下でのadrenomedullin (AM) mRNA発現の亢進



N: normoxia, 正常酸素分圧  
H: hypoxia, 低酸素(1%)

図2 アドレノメジュリン mRNA発現

### SCID マウスでの腫瘍細胞増殖に対するアドレノメジュリンアンタゴニスト(AMA)ペプチドの効果

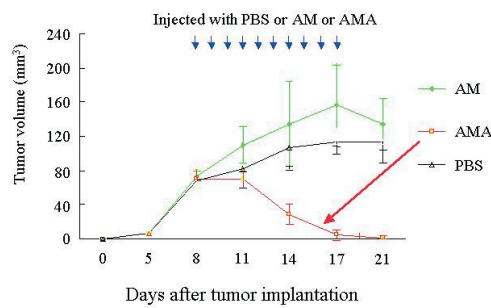
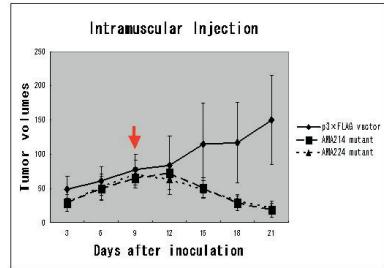


図3 アドレノメジュリンアンタゴニストペプチドの抗腫瘍効果

AMA発現ベクターを筋肉内に投与して背部皮下腫瘍に効く？



この研究成果は、腫瘍や肺癌の治療に、癌組織に直接遺伝子を注射する必要がないことを意味しており、大腿部などに筋肉内注射すれば、原発巣も直せる。さらに、手術後に肝転移や肺転移で死亡する進行癌患者の転移予防に使用可能であることを示唆している。

特許出願済み

図7 発現ベクターの大腿部筋肉内投与後の腫瘍増殖

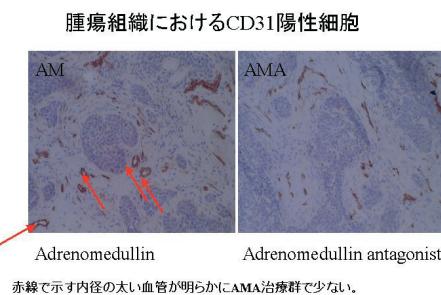
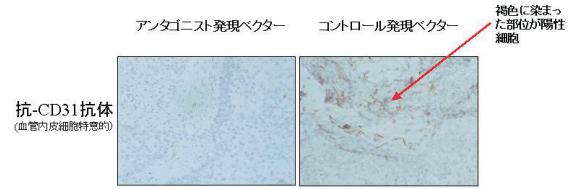


図4 アドレノメジュリンアンタゴニスト投与後の血管

アドレノメジュリンアンタゴニストは、本当に血管の新生を抑制するの？



アンタゴニスト発現ベクター筋肉内投与群で血管新生が完全に阻害されていた。

図8 腫瘍内の血管内皮細胞

### AMA発現ベクターの腫瘍内投与による抗腫瘍効果

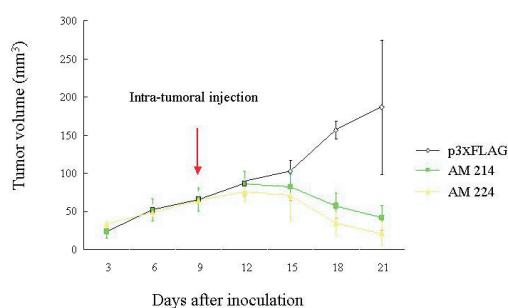
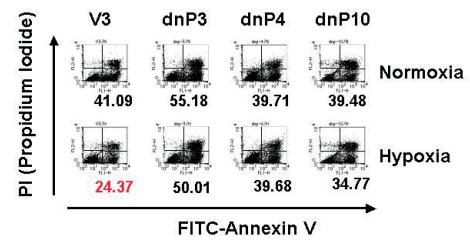


図5 発現ベクターの腫瘍内投与後の腫瘍増殖

Dominant negative-PX導入株の抗癌剤感受性は回復？



Vector controlでは低酸素下で細胞死が半分、しかしdnPX導入株ではほぼ同様に細胞死する。

PXは低酸素下での抗がん剤耐性に関与する！！

図9 Dominant negative PX導入株のCDDP感受性

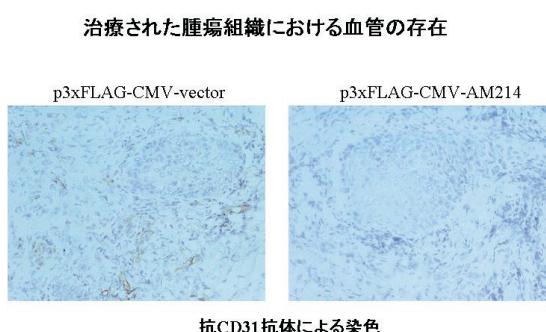
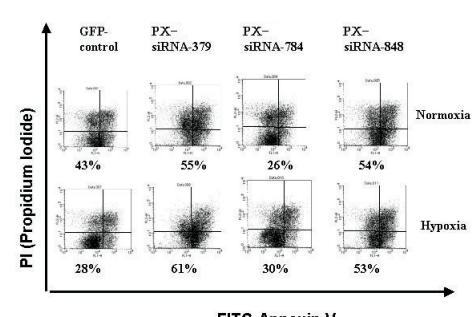


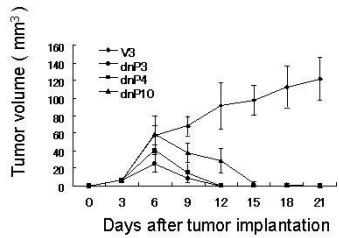
図6 腫瘍ない投与後の病理所見



PXの機能が阻害されると感受性が回復する。

図10 siRNAによるPX発現抑制後のCDDP感受性

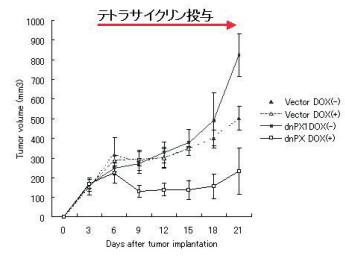
Dn-PX導入株の生体内での抗癌剤感受性は回復する？



抗がん剤耐性を検討するために腫瘍を形成させたが、Dominant negative-PX導入株は造腫瘍性も失っていた。

図11 dominant negative PX導入株の造腫瘍性

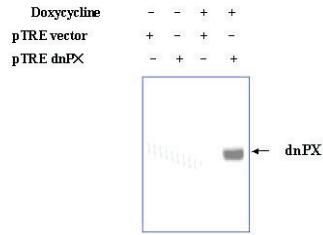
dnPXの抗腫瘍効果



テトラサイクリン投与後に腫瘍増殖が有意に抑制された。完全に退縮しない理由は、クローニングせずに行ったため。

図13 Tet-on dominant negative PX導入株の増殖図

テットオンシステムを利用したdnPXの子宮ガンにおける効果



ドキシサイクリンという抗生物質の存在時のみdnPXが発現する

図12 Tet-on dominant negative PX導入株の樹立