

アデノ随伴ウィルスベクターを用いた局所前立腺癌遺伝子治療の可能性：マスピンの長期発現により腫瘍増殖が効率的に抑制された

渡部昌実

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 泌尿器病態学

キーワード：アデノ随伴ウィルス，マスピン，遺伝子治療，前立腺癌，アポトーシス

はじめに

前立腺癌は米国男性において最も罹患頻度の高い癌であり、癌関連死としては2番目に位置する疾病である¹⁾。近年、日本人男性においてその発生率が上昇傾向にあるとされ、高齢男性患者の泌尿器科診療の際には常に留意を要する疾患となっている。前立腺癌の治療法には、根治的前立腺摘出術、抗男性ホルモン療法、放射線療法などがあり、比較的良好な治療成績が得られている。しかしながら、一部の症例では予後不良な転機をたどり、これら治療抵抗性前立腺癌に対する新しい治療法の開発は臨床の場において至急の課題となっている。マスピンは、乳癌と前立腺癌細胞株での発現が抑制されていることにより見つかったアポトーシス、癌細胞浸潤および血管新生に関わる癌抑制遺伝子であるが²⁻⁵⁾、ヒト前立腺癌臨床検体においてもマスピンタンパク質の発現が有意に減少していることが報告されている⁶⁾。今回、ヒト前立腺癌マウス皮下腫瘍モ

デルを用い、アデノ随伴ウィルス（Adeno-Associated Virus；AAV）ベクターを用いたヒトのマスピン遺伝子導入による癌増殖の抑制効果について検討した⁷⁾。

アデノ随伴ウィルス（AAV）ベクター

AAVベクターを用いた遺伝子治療の可能性を模索する研究は2000年ごろより活発に行われるようになり、血友病Bやパーキンソン病などの様々な疾患において臨床研究が始まっている⁸⁾。AAVベクター使用の利点としては、非病原性のAAVに由来するベクターは安全性が高いと考えられること、また、筋細胞、肝細胞や神経細胞などの非分裂性の細胞に効率良くまた長期間に渡って目的とする遺伝子発現が可能であることなどが挙げられる⁹⁾。ヒトの細胞に感染しうるAAVの型として1型～8型が知られており⁹⁾、これらのAAV各型とヒト標的細胞の関係が注目されてきている。すなわち、標的組織・細胞によって各型のAAVベクターの遺伝子導入効率が異なることが判明し、標的細胞の種類に応じて異なった型のAAVベクターを使い分けるといった考え方が出てきている⁹⁾。今後、これらの組み合わせについての研究が加速し、様々な標的細胞に適した型のAAVベクターが判明するもの

平成19年1月受理
〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1
電話：086-235-7287 FAX：086-231-3986

プロフィール



1996年岡山大学医学部卒業。2000年3月医学博士取得（岡山大学）。岡山大学泌尿器病態学講座では2001年3月より自殺遺伝子を用いた前立腺癌遺伝子治療の臨床研究を開始しています。当時から、種々の遺伝子治療に用いられるベクターは主にアデノウィルスベクターでしたが、私は近年その安全性、良好な導入効率および遺伝子の長期発現で注目されているアデノ随伴ウィルスベクターに着目し、本研究を開始致しました。本論文は、泌尿器科難治性疾患の一つである前立腺癌において、世界に先駆けてマスピン遺伝子を用いたアデノ随伴ウィルスベクター遺伝子治療の可能性を示したものであり、将来の臨床応用の基盤となりうる知見に富んでいると考えます。今後も、マスピンを含め様々な遺伝子を用いた治療の基礎的研究および臨床応用に携わっていきたく存じます。

と思われる。

AAV ベクターを用いた研究では AAV-2 型ベクターに関するものがその大半であり、このベクターを用いることにより非分裂細胞に効率よく遺伝子導入できることが知られている。したがって、癌細胞などの分裂が盛んな細胞で AAV-2 型ベクターを治療目的に使用した報告はほとんどなく、実際に、癌に対する基礎的・臨床的遺伝子治療研究ではアデノウイルスベクターが良く用いられている。本研究では、AAV-2 型ベクターがヒト前立腺癌由来の LNCaP や DU145 細胞において比較的高い導入効率を有することを証明し、前立腺癌の遺伝子治療に AAV-2 型ベクターが有用である可能性を示した⁷⁾。

癌抑制タンパク質マスピ

マスピンは1994年に Zou らによって報告された分子量42 kDa のセリンプロテアーゼインヒビターである²⁾。乳腺上皮の細胞より分離されたので、その命名には mammary serine protease inhibitor の頭文字、マスピ (MASPIN) が用いられた。マスピンは、乳腺、前立腺、腎臓、脾臓、小腸など多くのヒト正常組織での発現が報告されており¹⁰⁾、生理学的作用としては細胞外マトリックスの増強作用が挙げられる¹¹⁾。この作用は、セリンプロテアーゼである組織型およびウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター活性をマスピンが阻害することにより生じることが知られている¹²⁾。生物学的作用としては、癌細胞のアポトーシス誘導、浸潤抑制や、血管新生抑制が報告されており²⁻⁵⁾、治療としての腫瘍増殖抑制の観点からマスピンは魅力的なタンパク質であると考えられてきた。本研究では、in vivo でのマスピン遺伝子導入によるマスピンタンパク質の腫瘍内発現が、前立腺癌増殖抑制効果を有することを証明した⁷⁾。

研究結果

1. ヒト前立腺癌細胞における AAV-2 型ベクターを用いた遺伝子導入効率

ヒト前立腺癌細胞株の LNCaP, DU145, PC 3 細胞および子宮頸癌由来の HeLa 細胞において、GFP 遺伝子をコードした AAV-2 型ベクターを用いて in vitro で遺伝子導入効率を測定した。LNCaP および DU145 細胞において PC 3 細胞と比べ高い導入効率が認められた (表 1)。LNCaP 細胞については、一般的に AAV

-2 型ベクターによる導入効率が高いとされる HeLa 細胞よりも更に高い GFP 遺伝子導入効率が観察された。

2. AAV-マスピン腫瘍内投与によるアポトーシス細胞の増加

ヌードマウス皮下に形成された大きさ約 5 mm の LNCaP 細胞由来腫瘍に、ヒトのマスピン遺伝子をコードした AAV-2 型ベクター (AAV-マスピン), AAV-LacZ または PBS を局所注入し、腫瘍内マスピンタンパク質発現、アポトーシス誘導について解析した。ウェスタンブロット法により腫瘍内マスピンの発現を解析したところ、AAV-マスピンの局所注入後10日目から少なくとも56日目までの発現が確認された (data not shown)。TUNEL 法にて腫瘍内でアポトーシスの誘導された細胞を検出したところ、AAV-マスピン投与群の腫瘍においてコントロール群と比べ有意に多い頻度でアポトーシス細胞が観察された (図 1)。

3. マスピン強発現細胞におけるアポトーシス誘導

マスピンタンパク質強発現細胞においてアポトーシスが誘導されていることを証明するために、AAV-マスピンを注入した LNCaP 腫瘍組織をマスピンの免疫染色と TUNEL 法で 2 重染色し、そのコントロールとして AAV-GFP を注入した腫瘍組織を TUNEL 法で染色した。ベクター注入後10, 28, 56日のいずれにおいても、マスピンタンパク質陽性の細胞におけるアポトーシスの頻度はおよそ 7%であったのに対し、GFP 陽性細胞では 1%未満であり、マスピンタンパク質陽性の細胞においてアポトーシス発生の頻度が有意に上昇していた (図 2)。

4. AAV-マスピン投与による腫瘍内血管頻度の減少

AAV-マスピン投与10, 28, 56日後に LNCaP 腫瘍内の CD31陽性血管の頻度を免疫染色で解析したところ、投与28, 56日後において AAV-マスピン投与群で

表 1 ヒト前立腺癌細胞における AAV-2 型ベクターを用いた GFP 遺伝子導入効率

	AAV % transduction		
	MOI-10 ²	MOI-10 ³	MOI-10 ⁴
LNCaP	34 (25-41)	74 (59-87)	93 (89-96)
DU145	10 (6-13)	19 (13-30)	45 (29-67)
PC 3	0 (0-0)	0 (0-0)	6 (3-10)
HeLa	21 (13-33)	49 (35-68)	72 (58-89)

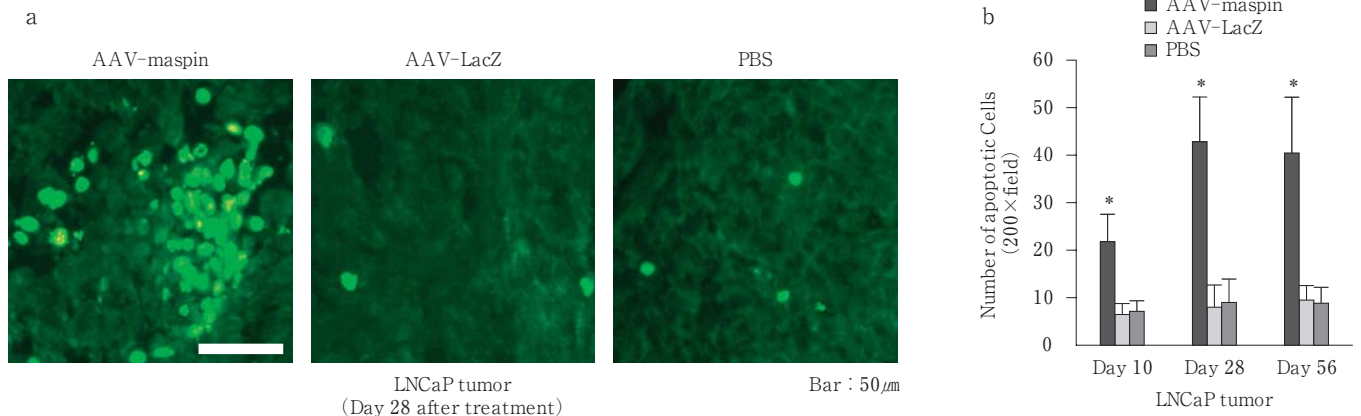


図1 AAV-マスピン腫瘍内投与によるアポトーシス細胞の増加
ヌードマウス皮下に形成された大きさ約5mmのLNCaP細胞由来腫瘍に、AAV-マスピン、AAV-LacZまたはPBSを局所注入し、アポトーシスの誘導された細胞をTUNEL法で標識した(a)。それぞれの腫瘍組織で、経時的にアポトーシスの誘導された細胞を定量した(b)。* : $p < 0.05$

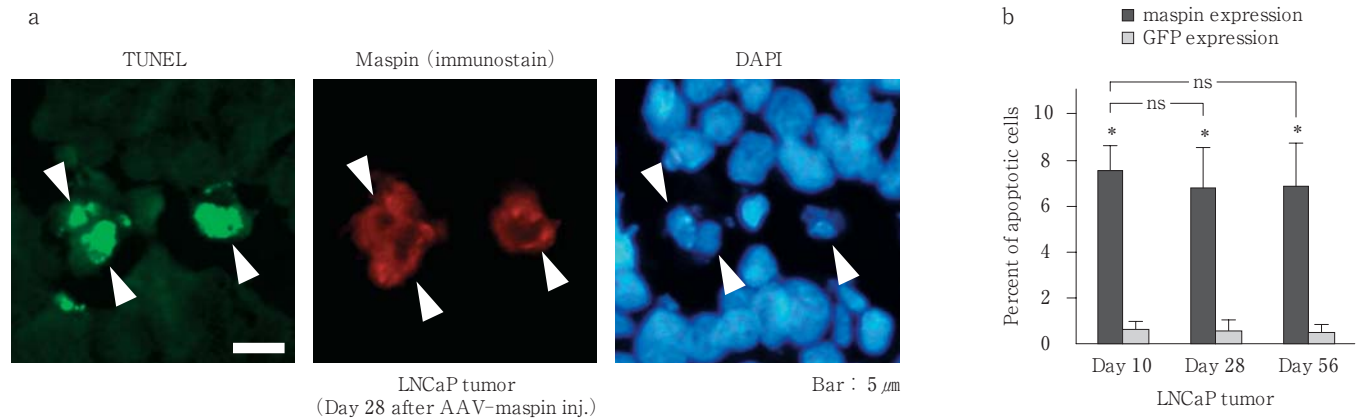


図2 マスピン強発現細胞におけるアポトーシス誘導
AAV-マスピンを注入したLNCaP腫瘍組織をマスピンの免疫染色とTUNEL法で染色した(a)。そのコントロールとしてAAV-GFPを注入した腫瘍組織をTUNEL法で染色し、マスピンまたはGFP発現細胞におけるアポトーシスの発生頻度を解析した(b)。* : $p < 0.05$

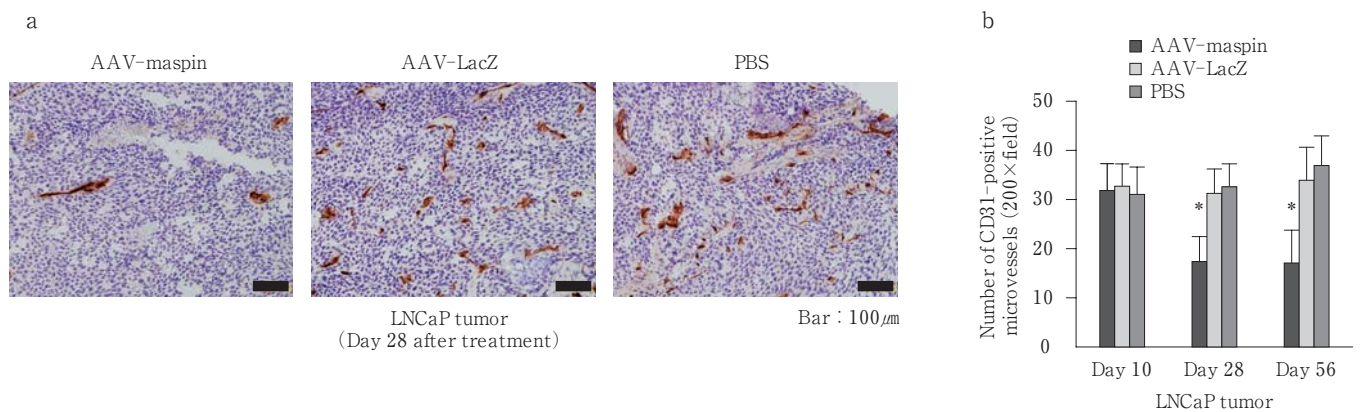


図3 AAV-マスピン投与による腫瘍内血管頻度の減少
LNCaP細胞由来腫瘍に、AAV-マスピン、AAV-LacZまたはPBSを局所注入し、腫瘍内血管をCD31の免疫染色で標識した(a)。それぞれの腫瘍組織で、経時的にCD31陽性血管の頻度を定量した(b)。* : $p < 0.05$

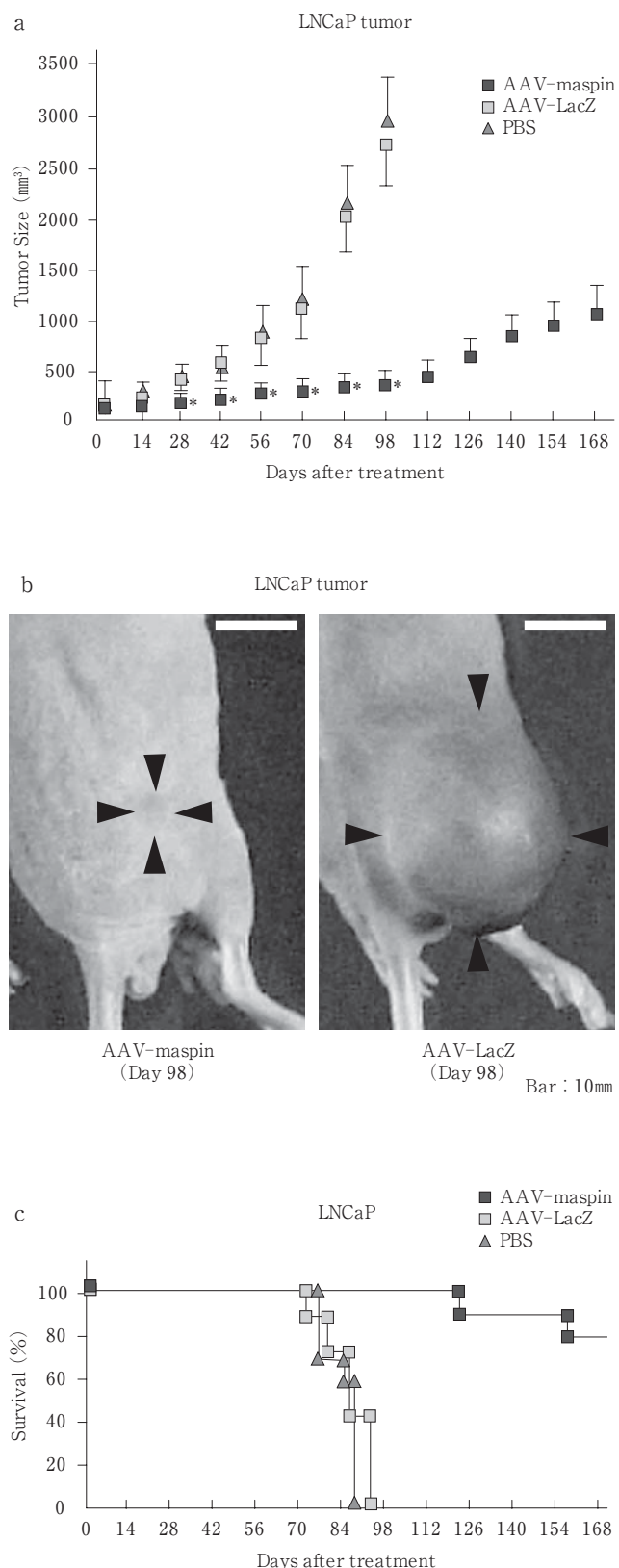


図4 AAV-マスピン投与による腫瘍増殖の抑制 (a, b) と生存率の改善 (c). *: $p < 0.05$

は AAV-LacZ 投与群と比べ腫瘍内の血管頻度の減少を認めた (図 3)。

5. AAV-マスピン投与による腫瘍増殖の抑制と生存率の改善

腫瘍増殖抑制効果については, AAV-マスピン投与群において注入後28日目より AAV-LacZ 投与群と比べ有意な腫瘍増大抑制が認められた (図 4 a, b). AAV-マスピン投与後の生存率について解析したところ, コントロール群と比べ有意な生存率の上昇が認められた (図 4 c)。

結 論

ヒト前立腺癌由来 LNCaP 細胞のマウス腫瘍モデルにおいて, 一回の AAV-マスピン局注による遺伝子導入で, マスピンの長期間の遺伝子発現が持続し腫瘍増殖の抑制が可能であった. その腫瘍増殖抑制のメカニズムとして, マスピントタンパク質発現によるアポトーシス誘導および腫瘍内血管新生抑制作用が重要と考えられた. ヒト前立腺癌に対し, AAV-マスピンを用いた局所遺伝子治療が有用である可能性が示唆された。

文 献

- 1) Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ : Cancer statistics, 2005. CA Cancer J Clin (2005) **55**, 10-30.
- 2) Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, Thor A, Neveu M, Sheng S, Rafidi K, Seftor E, Sager R : Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. Science (1994) **263**, 526-529.
- 3) Sheng S, Carey J, Seftor EA, Dias L, Hendrix MJ, Sager R : Maspin acts at the cell membrane to inhibit invasion and motility of mammary and prostatic cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA (1996) **93**, 11669-11674.
- 4) Zhang M, Volpert O, Shi YH, Bouck N : Maspin is an angiogenesis inhibitor. Nat Med (2000) **6**, 196-199.
- 5) Shi HY, Liang R, Templeton NS, Zhang M : Inhibition of breast tumor progression by systemic delivery of the maspin gene in a syngeneic tumor model. Mol Ther (2002) **5**, 755-761.
- 6) Machtens S, Serth J, Bokemeyer C, Bathke W, Minssen A, Kollmannsberger C, Hartmann J, Knuchel R, Kondo M, Jonas U, Kuczyk M : Expression of the p53 and Maspin protein in primary prostate cancer : correlation with clinical features. Int J Cancer (2001) **95**, 337-342.
- 7) Watanabe M, Nasu Y, Kashiwakura Y, Kusumi N, Tamayose K, Nagai A, Sasano T, Shimada T, Daida H, Kumon H : Adeno-associated virus 2-mediated

- intratumoral prostate cancer gene therapy : long-term maspin expression efficiently suppresses tumor growth. Hum Gene Ther (2005) **16**, 699-710.
- 8) Warrington KH Jr, Herzog RW : Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer. Hum Genet (2006) **119**, 571-603.
 - 9) Li C, Bowles DE, van Dyke T, Samulski RJ : Adeno-associated virus vectors : potential applications for cancer gene therapy. Cancer Gene Ther (2005) **12**, 913-925.
 - 10) Pemberton PA, Tipton AR, Pavloff N, Smith J, Erickson JR, Mouchaback ZM, Kiefer MC : Maspin is an intracellular serpin that partitions into secretory vesicles and is present at the cell surface. J Histochem Cytochem (1997) **45**, 1697-1706.
 - 11) Cher ML, Biliran HR Jr, Bhagat S, Meng Y, Che M, Lockett J, Abrams J, Fridman R, Zachareas M, Sheng S : Maspin expression inhibits osteolysis, tumor growth, and angiogenesis in a model of prostate cancer bone metastasis. Proc Natl Acad Sci USA (2003) **100**, 7847-7852.
 - 12) McGowen R, Biliran H Jr, Sager R, Sheng S : The surface of prostate carcinoma DU145 cells mediates the inhibition of urokinase-type plasminogen activator by maspin. Cancer Res (2000) **60**, 4771-4778.