

論文の内容の要旨

論文題目 SUPPRESSION OF CARCINOMATOUS ASCITES BY
AAV VECTOR-MEDIATED EXPRESSION OF sFLT-1 IN
NUDE MICE BEARING OVARIAN CANCER

和訳 AAV ベクターを用いた sFLT-1 遺伝子導入による卵巣癌由来
ヌードマウス腹水貯留の抑制

指導教官 武谷雄二教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 荷見よう子

【緒言】 卵巣癌の主な進展様式の一つは腹腔内播腫であり、その進行に伴い腹水貯留を来す。卵巣癌患者の半数以上は進行期で診断され、腹水貯留を伴うことが多い。腹水貯留は全身状態を悪化させるため、腫瘍の大きさ及び腹水の貯留はともに生存率と逆相関することが知られており、卵巣癌の治療において腹水貯留の抑制は原発巣の治療と同様に重要な課題である。そこで、本研究では、腹水貯留の抑制に遺伝子治療を応用することを目的として動物実験モデルを用いた基礎実験を行った。

腫瘍血管新生は腫瘍の増大に必須であり、悪性腫瘍の腹水貯留に関与しているとされている。いくつかの腹水産生腫瘍において腹壁における著名な血管新生が観察されており、血管新生阻害物質の投与による血管増生の阻害により腹水量の減少が報告されている。腹膜の微小血管の透過性亢進もまた悪性腫瘍の腹水貯留に関与していることが観察されている。

腫瘍に関連した血管透過性亢進は様々なサイトカインにより惹起されうる。そのひとつが血管内皮増殖因子 (VEGF) である。VEGF は強力な血管透過性亢進作用と血管内皮細胞増殖作用を持ち、腹水産生腫瘍の血管新生と腹水貯留に深く関与していると考えられている。VEGF の作用は血管内皮細胞に特異的に発現されているチロシンキナーゼレセプターである Flt-1 受容体と KDR 受容体を介している。最近、ヒトの上皮性卵巣癌組織における VEGF の過剰発現や血清 VEGF 濃度の上昇と生存率低下との間の相関が報告されており、VEGF が腫瘍血管新生、転移、腹水貯留において重要な役割を果たすことから魅力的な治療標的であると考えられる。

VEGFによる腫瘍血管新生と血管透過性亢進作用を阻害する治療戦略のひとつとして血管床における可溶性 Flt-1 受容体の発現がある。可溶性 Flt-1 受容体 (sFlt-1) は内因性の VEGF 阻害因子であり、Flt-1 受容体の細胞外ドメインのみの変異体である。細胞外ドメインのみのため Flt-1 受容体と同程度の親和性で VEGF と結合し競合的に VEGF の作用を阻害する。2 量体を形成する VEGF 受容体にも結合し下流のシグナル伝達の活性化を阻害する。

腫瘍細胞への遺伝子導入による sFlt-1 発現は腫瘍血管新生と腹水貯留を抑制することが期待される。遺伝子導入には線維芽細胞や筋細胞と同様に上皮性細胞へ効率良く遺伝子導入を行うアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターが適していると考えられる。本研究では RMG-1 ヒト卵巣癌細胞に AAV ベクターを用いて sFlt-1 遺伝子を導入し、sFlt-1 発現による効果を *in vitro* での血管内皮細胞増殖能とマウス卵巣癌腹水貯留モデルにおいて検討した。

【方法】

・ AAV ベクターの作成

AAV ベクタープラスミドはマウス sFlt-1 cDNA もしくは neomycin 耐性遺伝子とその両端の 145bp の AAV inverted terminal repeats (ITRs) から成る。ヘルパープラスミド pIM45 は AAV ベクターの複製と 캡シド形成に必要な rep、cap 遺伝子を含む。pladeno-1 はアデノウイルスの E2A、E4、VA 遺伝子を含む。293 ヒト胎児腎細胞にリン酸カルシウム法でベクタープラスミド、ヘルパープラスミド pIM45、pladeno-1 のトランスフェクションを行い 72 時間培養後細胞を回収し、凍結・融解をくりかえした後細胞抽出液を得、遠心により上清の AAV ベクターを回収した。

・ sFlt-1 遺伝子導入細胞作成

1×10^5 / cell の sFlt-1 および Neo AAV ベクターあるいは Neo AAV ベクターのみを用いて RMG-1 細胞に遺伝子導入を行い $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ G418 による選択をおこないクローンを得た。細胞抽出液を用いウサギ抗 sFlt-1 ポリクローナル抗体でウエスタンブロッティングを行い sFlt-1 発現クローンを得た。

・ VEGF 定量

3×10^6 個の RMG-1 細胞を 7ml の RPMI1640/1%FBS で 96 時間培養し培養上清を回収した。ヒト VEGF 測定用 ELISA キットで培養上清中の VEGF 濃度を定量した。

・ In Vitro における sFlt-1 発現細胞増殖能

1×10^5 個の Neo 発現細胞あるいは sFlt-1 発現細胞を撒き 48-, 72-, 96-時間後に細胞数を計数した。

・ 血管内皮細胞増殖アッセイ

7ml の無血清 RPMI1640 で 3×10^6 個の Neo 発現細胞あるいは sFlt-1 発現細胞を 72 時間培養し培養上清を回収した。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) 2×10^4 個を撒き EBM-2 培養液/5%FBS/25%培養上清/20ng/ml VEGF で培養し、5 日後細胞数を計数した。

・ RMG-1 細胞腹腔内移植

4 週齢雌性 BALB/c ノードマウスに 2×10^7 個/匹の Neo 発現細胞 (5 匹) あるいは sFlt-1 発現 RMG-1 細胞 (5 匹) を腹腔内移植した。5 週後に腹水貯留量、腹水中の腫瘍細胞数、赤血球数を定量した。また腹腔内の播腫巣数及び播腫巣径を計

数した。新たにヌードマウスに 2×10^7 個/匹の Neo 発現細胞（6 匹）あるいは sFlt-1 発現 RMG-1 細胞（6 匹）を腹腔内移植し生存期間を観察した。

・統計

血管内皮細胞増殖アッセイの結果に対しては Student's t test による検定、In vivo 実験の結果に対しては Wilcoxon 順位和検定、生存期間の比較については Wilcoxon 検定を行った。P<0.05 を有為な差とした。

【結果】 1. RMG-1 細胞の VEGF 産生能につき検討した。RMG-1 細胞の培養上清内の VEGF 濃度を ELISA にて定量したところ平均 458pg/ml であった。sFlt-1 AAV ベクターを用いた RMG-1 細胞への遺伝子導入による sFlt-1 蛋白の発現を確認するために RMG-1 細胞へ sFlt-1 及び Neo AAV ベクターあるいは Neo AAV ベクターのみによる遺伝子導入を行い、sFlt-1 あるいは Neo 発現クローンを得た。これらのクローンの細胞抽出液及び培養上清を用いて蛋白発現につき検討した。抗 sFlt-1 抗体を用いた Western blotting において Neo 発現クローンでは sFlt-1 蛋白の発現を認めず、sFlt-1 発現クローンでは細胞抽出液、培養上清共に sFlt-1 蛋白の発現を認めた。

2. In vitro において Neo 発現クローンと sFlt-1 発現クローンに増殖能の差を認めなかった。これにより sFlt-1 発現は腫瘍細胞の細胞分裂に影響のないことが示された。

3. VEGF の血管内皮細胞増殖作用に対する sFlt-1 の阻害作用を検討した。25%の Neo 発現細胞培養上清存在下の 20ng/ml VEGF による増殖刺激で HUVEC は 5 日間で 70% の細胞数増加を示した。この血管内皮細胞に対する VEGF の細胞増殖作用は 25% の sFlt-1 発現細胞培養上清存在下では完全に阻害された。

4. In vivo における sFlt-1 持続発現による腫瘍形成及び腹水貯留に対する効果を検討した。ヌードマウスに 2×10^7 個/匹の Neo 発現細胞（5 匹）あるいは sFlt-1 発現 RMG-1 細胞（5 匹）を腹腔内移植したところ、5 週間後には sFlt-1 発現 RMG-1 細胞移植群において腹水貯留量、腹水中の腫瘍細胞数、赤血球数は有為に低値を示した。腹腔内播腫巣数は両群間で有為な差を認めなかったが、直径 2 mm 以上の腫瘍数は sFlt-1 発現 RMG-1 細胞移植群において有為に少なかった。これにより sFlt-1 持続発現は腹水貯留、血管透過性亢進による赤血球漏出および腫瘍増大を抑制することが示された。

5. ヌードマウスに 2×10^7 個/匹の Neo 発現細胞（6 匹）あるいは sFlt-1 発現 RMG-1 細胞（6 匹）を腹腔内移植し生存期間を検討した。sFlt-1 発現 RMG-1 細胞移植群の平均生存期間は 70 日であり、Neo 発現細胞移植群の 55 日に比し有為に長かった。

【考察】本研究ではマウス卵巣癌モデルを作成し、AAV ベクターを用いた遺伝子導入により選択的 VEGF 阻害因子である sFlt-1 を持続発現する腫瘍細胞を移植した。このモデルにおいて sFlt-1 発現 RMG-1 細胞を移植された群では生存期間の延長と腹水貯留量の低下が認められた。腹水中の漏出赤血球数が有為に減少したことから sFlt-1 の発現により VEGF の血管透過性亢進作用が抑制されたと考えられた。In vitro では VEGF に誘導された血管内皮細胞増殖の抑制が認められ sFlt-1 発現の血管新生阻害作用が示唆された。In vivo では腹腔内の播腫巣数に有為な差は認めなかったものの直径 2 mm 以上の腫瘍数は sFlt-1 発現細胞移植群で有為に少なかった。このことから sFlt-1 の発現により血管新生が阻害され、腫瘍が独自の血流供給を要す

る大きさ以上へ増大することを抑制しうることが示唆された。腫瘍細胞の腹腔内移植による腹水貯留モデルにおいて sFlt-1 の持続発現により対照群に比して有為な生存期間の延長が認められた。これには腹水貯留の抑制と播腫巣の増大抑制が関与すると考えられた。

VEGF 活性の効果的な抑制にはその阻害因子の持続的な発現を要する。sFlt-1 遺伝子導入による遺伝子治療は有力な候補と考えられる。この際、腹水産生悪性腫瘍に上皮由来のものも多く、上皮性癌細胞、線維芽細胞や筋細胞へも効率良く遺伝子導入のことができることから AAV ベクターが適している。導入遺伝子の長期発現を望める点も有利である。本研究においても AAV ベクターを用いた sFlt-1 遺伝子導入により卵巣癌細胞で機能的な sFlt-1 蛋白の発現が認められ、本法が腹水産生悪性腫瘍の有効な治療法となりうることが示唆された。