

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861928

研究課題名(和文) 口腔悪性腫瘍治療効果の向上を目的とした Bax mRNA 導入遺伝子治療の開発

研究課題名(英文) Development of Bax mRNA gene therapy that was for the purpose of improving oral malignant tumor therapeutic effect

研究代表者

奥村 健哉 (Okumura, Kenya)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50582079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円

研究成果の概要(和文)：われわれは口腔悪性腫瘍を対象に新たな方法としてBax mRNA lipofection法を用いた遺伝子治療の研究を行っている(Baxは腫瘍抑制因子として機能し、mRNAはplasmidよりも効率的に遺伝子導入される)。本研究ではヒト下顎骨肉腫(HOSM-1細胞)およびヒト扁平上皮癌(KB細胞)に対して、liposomeを用いてBax mRNAをヌードマウス移植腫瘍へ投与し、局所投与と全身投与での抗腫瘍効果について比較、検討した。

下顎骨肉腫および扁平上皮癌ともに、Bax mRNA療法はplasmidを使用したBax遺伝子療法よりも高い抗腫瘍効果が得られ、静脈内投与が最も有効であった。

研究成果の概要(英文)：Gene transfer by mRNA lipofection is more efficient than plasmid DNA lipofection. We study the gene therapy using a new method, Bax mRNA lipofection for oral malignant tumors (Bax is a pro-apoptotic molecule that functions as a tumor suppressor.). In this study, we examined the antitumor effect in nude mice transplanted tumors of the Bax mRNA transfected using a cationic liposome against human mandibular osteosarcoma (HOSM-1 cells) and human squamous cell carcinoma (KB cells), and studied its antitumor effects comparing the differences between local administration and systemic administration. In both mandibular osteosarcoma and human squamous cell carcinoma, Bax mRNA therapy using liposomes has more anti-tumor effects than Bax gene therapy using a plasmid, and intravenous administration was the most effective route of administration in this study.

研究分野：口腔外科学

キーワード：遺伝子治療 口腔がん Bax mRNA Liposome

1. 研究開始当初の背景

(1) 今日、癌に対する遺伝子治療の研究はさまざまな分野で行われているが、口腔領域についての研究報告例はほとんどみられず、特に口腔原発の悪性黒色腫、骨肉腫に関しては知る限りでは皆無である。また、口腔領域の癌は解剖学的に切除後の機能障害が大きく、遺伝子治療の臨床応用が待たれている。

(2) Bax 遺伝子治療の研究に至った経緯

Bax はミトコンドリアから cytochrome c を細胞質内へ放出させ、Caspase-3 の活性化を経て apoptosis を誘導することが明らかとなっている。また、liposome はウイルスベクターに比べ免疫反応、バイオハザードの問題が少ないことから、安全でかつ反復投与も可能で、有用なベクターであると考えられる。そこで、独自に教室で樹立した口腔由来の悪性腫瘍に対して cationic liposome をキャリアーとする Bax 遺伝子治療の研究を行ってきた。骨肉腫 (HOSM-1 細胞) に対しては *in vitro*、*in vivo* ともに抗腫瘍効果が得られた (Int J Oncol 2005; 27: 433-8, Oncol Rep 2007; 17: 769-73.) が、悪性黒色腫細胞 (HMG 細胞) に対しては著明な効果が得られなかった。

(3) Bax mRNA 遺伝子治療の研究に至った経緯

前述した Bax 遺伝子治療では十分な効果が得られなかった要因の一つに導入効率が低いことが考えられた。しかし、通常用いる plasmid DNA に替えて mRNA を導入すると導入効率が向上することが報告されている (Mol Cell Biol 2001; 21: 5200-13, RNA 2001; 7: 1486-95)。

この報告をもとに、Bax mRNA を作成し、悪性黒色腫細胞株 (HMG) に対し Bax mRNA の導入を行った。その結果、plasmid の約 2 倍の導入効果が得られ、*in vitro* および *in vivo* において、抗腫瘍効果は従来の Bax plasmid の 1.5 倍以上に向上した (J Gene Med 2008; 10: 910-7)。

さらに口腔由来の悪性腫瘍細胞株である扁平上皮癌 (KB)、骨肉腫 (HOSM-1、HOSM-2)、悪性黒色腫 (MMN9、PMP) に対して *in vitro* での抗腫瘍効果について検討してきた。その結果すべての細胞株で従来の plasmid を用いた遺伝子治療より遺伝子導入効率や Bax タンパク発現は向上し、apoptosis の発現は 1.5 倍以上の効果が得られた。

そこで plasmid では十分な導入効果が得られなかった骨肉腫や悪性黒色腫を含むさまざまな悪性腫瘍細胞においても、Bax mRNA を導入させることにより高い抗腫瘍効果が期待できる。

2. 研究の目的

口腔悪性腫瘍細胞 (骨肉腫および扁平上皮癌) に対して Liposome-Bax mRNA の *in vivo* での投与を局所投与または全身投与にわけ

て行い、抗腫瘍効果の高い投与方法について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 使用した細胞株はこれまで *in vitro* の実験で用いたヒト下顎骨骨肉腫細胞 (HOSM-1 細胞) およびヒト扁平上皮癌細胞 (KB 細胞) を用いた。ヌードマウスへ HOSM-1 細胞または KB 細胞を移植し、局所投与と全身投与 (静脈内投与および皮下投与) での抗腫瘍効果について比較検討した。

(2) Bax mRNA の作製

Bax plasmid (EGFP cDNA を pcDNA3.1(+) plasmid (invitrogen 社) に挿入) から mMESSAGE mMACHINETM T7 Ultra Kit (Ambion 社) を用いて Bax mRNA を作製した。

(3) 導入ベクターである Cationic Liposome は DOPE と DOTAP によりロータリーエバポレーターを用いて作成した。

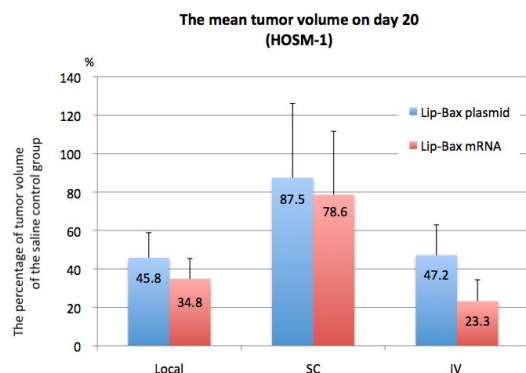
(4) 腫瘍増殖抑制効果についてはヌードマウスの背部皮下に腫瘍細胞を移植、腫瘍径 5mm となった時点を Day0 として、Liposome-Bax mRNA もしくは Bax plasmid の投与を開始した。投与方法は、Bax mRNA もしくは Bax plasmid を腫瘍周囲へ局所注射 (10 µg × 5 回) した群、皮下注射もしくは静脈内注射により全身投与 (50 µg × 1 回) を行った群に分け、Day20 に腫瘍体積を測定した。

(5) Bax タンパクの発現については同様に投与後、24 時間後に腫瘍を摘出し、免疫染色を行った。

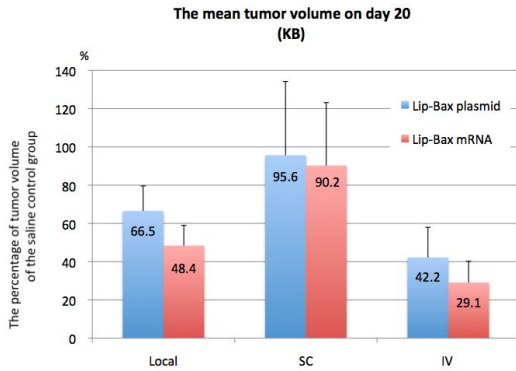
(6) アポトーシスの発現についても同様に投与後 24 時間後に腫瘍を摘出し TUNEL 染色を行った。

4. 研究成果

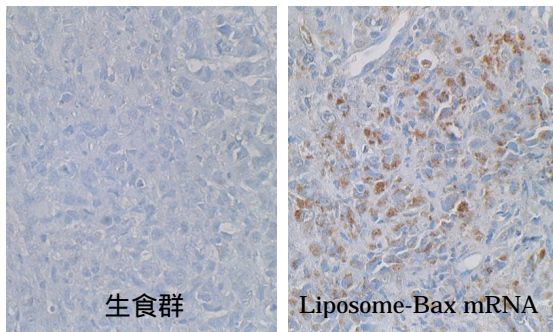
(1) ヒト下顎骨骨肉腫細胞 (HOSM-1 細胞) における Day20 での生食群に対する腫瘍体積は、局所投与では Bax plasmid 群 45.8% であったのに対し、Bax mRNA 群 34.8% であった。皮下注射では Bax plasmid 群 87.5%、Bax mRNA 群 78.6% であった。静脈内投与では Bax plasmid 群 47.2% に対し、Bax mRNA 群 23.3% であった。



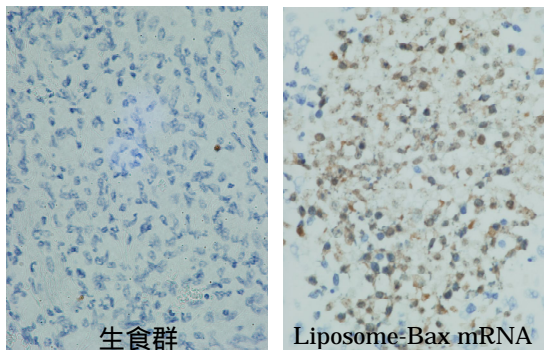
(2) ヒト扁平上皮癌細胞 (KB 細胞) における Day20 での生食群に対する腫瘍体積は、局所投与では Bax plasmid 群 66.5%であったのに対し、Bax mRNA 群 48.4%であった。皮下注射では Bax plasmid 群、Bax mRNA 群ともに増殖抑制効果は得られなかった。静脈内注射では Bax plasmid 群が 42.2%であったのに対し、Bax mRNA 群は 29.1%であった。



(3) HOSM-1 での Bax タンパク発現についてはウエスタン・ブロッティングにより比較したが、コントロール群でも発現しており、有意な差はみられなかった。しかし、免疫染色を行ったところ、局所投与と静脈内注射において Bax mRNA 群、Bax plasmid 群ともに生食群に比較し発現の増強を認めた。しかし、Bax mRNA 群、Bax plasmid 群の両者に有意差はみられなかった。また、皮下注射群では生食群との差もみられなかった。

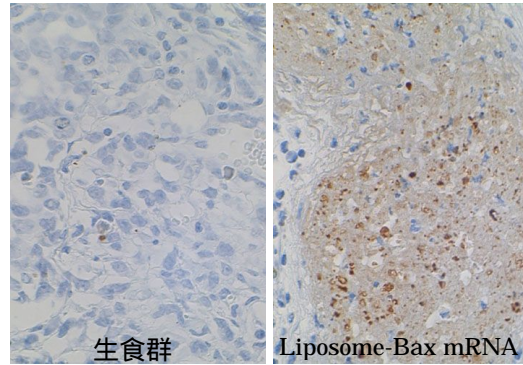


(4) KB での Bax タンパク発現についても同様に局所投与と静脈内注射において Bax mRNA 群、Bax plasmid 群ともに生食群に比較し発現の増強を認めたが、両者に有意差はみられ

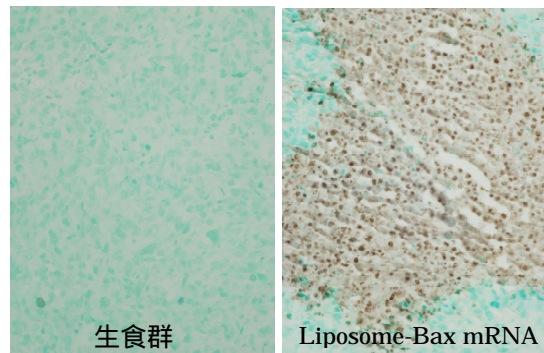


なかった。また、皮下注射群では生食群との差もみられなかった。

(5) HOSM-1 での TUNEL 染色では局所投与と静脈内注射において Bax mRNA 群、Bax plasmid 群ともに生食群に比較し TUNEL 陽性細胞 (apoptosis の発現) の増強を認めたが、両者に有意差はみられなかった。また、皮下注射群では生食群との差もみられなかった。



(6) KB での TUNEL 染色でも同様に局所投与と静脈内注射において Bax mRNA 群、Bax plasmid 群ともに生食群に比較し TUNEL 陽性細胞の増強を認めたが、両者に有意差はみられなかった。また、皮下注射群では生食群との差もみられなかった。



今回の結果から Liposome-Bax mRNA 療法は従来の plasmid を用いた方法より効果が高く、投与経路では静脈内投与で最も高い腫瘍増殖抑制効果が得られていた。しかし、投与回数、投与量についてはさらなる検討が必要であり、全身投与を行った際に全身への遺伝子発現を確認する必要がある。また、多くの化学療法感受性と Bax/Bcl2 比との関連は明らかとなっており (BMC Cancer. 2010 10:554)、癌化学療法との併用効果についても検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

発表者: Kenya Okumura(代表), Koji Hori, Jouji Nomura, Naoya Arai、発表標題: Antitumor Activity of Cationic Liposome-mediated Bax mRNA Transfer in HOSM-1 mandibular osteosarcoma cells: A comparative study of local administration and systemic administration、学会名: 96th AAOMS Annual Meeting、発表年月日: 2014 年 9 月 8 日~9 月 13 日、発表場所: Hawaii Convention Center 「Honolulu (USA)」

発表者: 奥村 健哉(代表) 乾 眞登可、井上 仁、留奥 曜、松谷 博人、中村 真之介、渡邊 由裕、新井 直也、発表標題: Cationic Liposome を用いた Bax mRNA 投与による抗腫瘍効果 - 下顎骨骨肉腫 HOSM-1 細胞移植マウスを用いた局所投与と全身投与での比較-、学会名: 第 59 回 日本口腔外科学会総会、発表年月日: 2014 年 10 月 17 日~10 月 19 日、発表場所: 幕張メッセ、国際会議場(千葉県、千葉市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 健哉 (OKUMURA, Kenya)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 50582079