

膀胱癌細胞への IFN- γ 遺伝子導入による癌免疫療法

京都大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 吉田 修教授)

橋村 孝幸, 日裏 勝, 吉田 修

京都大学医学部免疫学教室 (主任: 湊 長博教授)

寺村 康史, 栗林 景容

京都大学薬学部微生物薬品学教室 (主任: 河合明彦教授)

渡 部 好 彦

CANCER IMMUNOTHERAPY BY MURINE BLADDER CANCER CELLS TRANSFECTED WITH MOUSE INTERFERON- γ GENE

Takayuki Hashimura, Masaru Hiura and Osamu Yoshida

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University

Yasufumi Teramura and Kagemasa Kuribayashi

From the Department of Immunology, Faculty of Medicine, Kyoto University

Yoshihiko Watanabe

From the Department of Molecular Microbiology, Faculty of Medicine, Kyoto University

We established constitutively an interferon- γ (IFN- γ) producing cell line (MBT2/ γ) from a mouse bladder cancer cell line (MBT2) by retroviral transfer of a mouse IFN- γ cDNA. Although the in vitro cell growth of these cells was unaffected by the IFN- γ production, their subcutaneous tumor growth in syngeneic C3H/He mice was different; MBT2/ γ tumor growth was more strongly suppressed (3/20) than that of MBT2 (10/10). MBT2/ γ tumor growth was observed in nude mice (6/6). The mice immunized with MBT2/ γ were resistant to tumor growth of the parental cells (7/9; 77%), but permitted the growth of another kind of C3H/He tumor line. These findings indicate that the reduced tumorigenicity of the IFN- γ producing line was due to the augmented specific antitumor immunity, probably as a result of the immunomodulatory effects of the IFN- γ derived from the tumor. (Acta Urol. Jpn. 39: 1205-1208, 1993)

Key words: IFN- γ , Gene therapy, Bladder cancer, MBT2, Immunotherapy

緒 言

近年、抗腫瘍効果の高いサイトカイン遺伝子を種々の細胞に導入して、殺細胞効果を高めたり患者の免疫能を高めようとする遺伝子治療が注目されてきた¹⁾。インターフェロン- γ (IFN- γ) もそのようなサイトカインの一つであるが^{2,3)}、IFN- γ 全身投与では生体内での半減期が短く有効な濃度がえられないという問題点がある。それならば逆に、ターゲットである癌細胞が IFN- γ を産生する様に改造して生体内に戻し、局所的に持続的に IFN- γ が産生されれば、サイトカイン本来の機能が果たせるのではないかと考えられる。その結果 IFN- γ 産生癌細胞は、生体内でサイトカインネットワーク、免疫担当細胞に影響を与えて腫

瘍に対し特異的な免疫能を賦活すると考えられる。つまり、IFN- γ 産生癌細胞が抗腫瘍ワクチンとして機能すると予想される。

今回は、遺伝子導入により IFN- γ 産生細胞になったマウス膀胱癌細胞株 (MBT2/ γ) を用いて以下のことを明らかにした。1) In Vitro での増殖能、2) 正常マウスに移植した場合の腫瘍形成の有無、3) MBT2/ γ 移植で腫瘍形成のなかったマウスは、親株 MBT2 に対しても腫瘍を拒絶するか? 4) MBT2/ γ 移植で腫瘍形成のなかったマウスは、抗癌剤耐性 MBT2 に対しても腫瘍を拒絶するか?

材料と方法

細胞株: IFN- γ の遺伝子を導入する親株として、

C3H/He マウス由来の膀胱癌株 MBT2 (移行上皮癌)を用いた。MBT2 は10% Fetal calf serum の RPMI 培養液で培養した。MBT2 を cis-platin 含有培養液の中で、約1年培養して adriamycin (ADR) 耐性膀胱腫瘍細胞株 MBT2/ADR を樹立した。この抗癌剤の耐性株は、もとの親株に対して、IC50 で約5倍の ADR 耐性を獲得していた。

遺伝子導入:レトロウイルスベクターとしてマウス白血球ウイルス (MuLV) を用いて IFN- γ の遺伝子を組み込み、ベクター DNA をパッケージング細胞 ψ 2 を用いて、ウイルス感染により MBT2 に導入した²⁾。遺伝子導入細胞は、G418 選択を行い、G418 耐性 IFN- γ 産生 MBT2 細胞 (MBT2/ γ) をえた。MBT2/ γ は2回クローニングして、in vitro で細胞倍加時間を求め、また IFN- γ の産生を確認した。

In vitro における細胞増殖: 5×10^3 個の MBT2, MBT-2/ γ をおのおの5% CO₂, 37°C で培養し2日毎4回、トリプシン処理して細胞浮遊液を作製して細胞数を数えた。培養皿はおのおの3枚ずつ用いた。

IFN 活性の測定: IFN 活性はL細胞の水疱性口内炎ウイルスによる細胞変性 (CPE: Cytopathic effect) の阻止率を測定することにより活性を求めた⁴⁾。

実験動物: C3H/He マウス, 8~10週齢の雄を用いた。ヌードマウスも8~10週齢の C3H/He マウスを用いた。細胞を移植する場合は 0.1 ml の PBS の細胞浮遊液をマウスの背部へ皮下注射した。

In vivo における腫瘍増殖: 1.5×10^5 , 5×10^5 , 1.5×10^6 の MBT2, MBT-2/ γ をおのおのマウスに移植して経時的に腫瘍を計測した。腫瘍体積は、 $\pi/6 \times (\text{長径}) \times (\text{短径}) \times (\text{高さ})$ で算出した。

ヌードマウスへは 1.5×10^5 個の MBT-2/ γ を6匹に移植した。

1.5×10^5 個の MBT-2/ γ を移植後5週間しても、腫瘍を作らなかったマウスには、反対側の背部に同数の MBT2 を移植して腫瘍形成の有無を観察した。

結 果

1. In vitro における細胞増殖と IFN 活性

MBT2/ γ は in vitro で IFN- γ を産生し (14 U/ml), cell cycle time は、MBT2: 24時間, MBT2/ γ : 28時間であり、有意の差はなかった (Table 1)。

2. In vivo における腫瘍増殖

1) MBT2 と MBT-2/ γ の腫瘍形成能の違い

1.5×10^5 個の MBT2 細胞を、マウスに皮下注射すると100% (10/10) 腫瘍を形成した。一方、 1.5×10^5 個の MBT2/ γ をマウスに皮下注射した場合は、15% (3/

Table 1. Characteristics of MBT2 and MBT2/ γ

	Cell cycle	IF- γ production	Tumor formation	
			C3H	Nude mice
MBT2	24 hr	—	10/10	NE*
MBT2/ γ	28 hr	14 U/ml	3/20	6/6

* Not examined

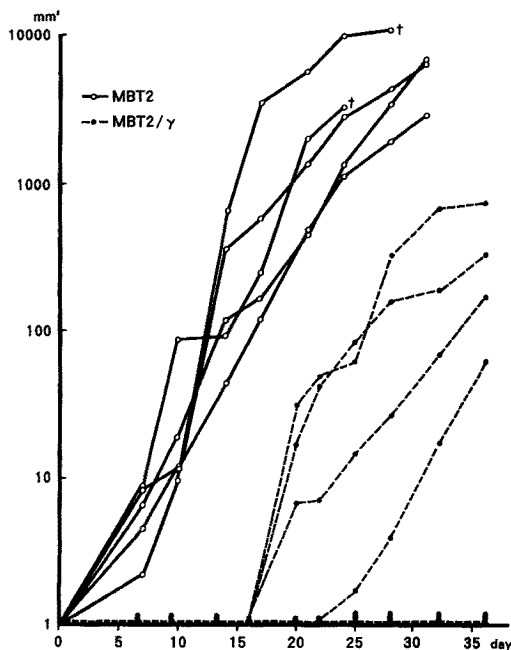


Fig. 1. Tumor growth curves of MBT2 and MBT2/ γ in mice injected 1.5×10^6 cells.

20) しか腫瘍を形成しなかった。しかし、MBT2/ γ をヌードマウスに移植すると100% (6/6) 腫瘍を形成した (Table 1)。

2) MBT-2/ γ の移植する細胞数と腫瘍形成率

マウスに皮下注射する MBT2/ γ の細胞数を、 1.5×10^5 , 5×10^5 , 1.5×10^6 個と増やすと腫瘍形成率は、0/8, 4/9, 4/9 と増加した。しかし腫瘍の大きさは MBT2 に比較すると小さかった。

MBT2 を 1.5×10^5 , 5×10^5 , 1.5×10^6 個皮下注射した場合はすべて100% (6/6) 腫瘍を形成した (Table 2, Fig. 1)。

3. 親株 MBT2 に対する免疫能の獲得

MBT2/ γ を拒絶したマウス (9/12) は、親株の MBT2 を移植しても78% (7/9) 腫瘍を拒絶した。さらに MBT2/ γ , MBT2 を拒絶したマウスに MBT2 を移植しても100% (4/4) 腫瘍は拒絶された (Fig. 2)。

4. 抗癌剤耐性株 MBT2/ADR に対する免疫能の獲得

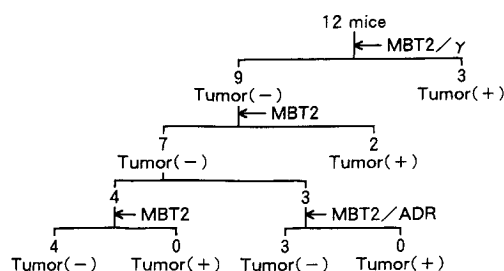


Fig. 2. Challenge with MBT2 of mice immunized by MBT2/ γ .

Table 2. MBT2 and MBT2/ γ tumor formation in mice

	No. of cells injected		
	1.5×10^5	5×10^5	1.5×10^6
MBT2	6/6	6/6	6/6
MBT2/ γ	0/8	4/9	4/9

Table 3. Challenge with MBT2 or MBT2/ADR of mice immunized by MBT2/ γ

Challenged tumor	Tumor formation
MBT2	2/9 (22%)
MBT2/ADR	0/8 (0%)

Normal mice control	
MBT2/ADR	6/6 (100%)

1.5×10^6 個の MBT2/ADR を、マウスに皮下注射すると 100% (6/6) 腫瘍を形成した。しかし MBT2/ γ を拒絶したマウスでは、MBT2/ADR を移植しても腫瘍は形成されなかった (0/8)。また MBT2/ γ , MBT2 を拒絶したマウスに MBT2/ADR を移植してもすべて腫瘍は拒絶された (3/3) (Table 3)。

考 察

本研究において、1) IFN- γ 遺伝子をマウス膀胱癌細胞株に導入し、その免疫原性の増強の程度、造腫瘍性の低下をマウスの系で明らかにし、2) 同様のアプローチが、制癌剤耐性の克服に利用可能であり、さらに、3) IFN- γ 遺伝子を導入された腫瘍細胞は抗腫瘍ワクチンの作用を有することが示された。

IFN- γ は細胞傷害性 T 細胞の誘導、NK 細胞の活性化、マクロファージの腫瘍傷害活性の増強、腫瘍の MHC I, MHC II 抗原提示能の増強により、IFN- α/β よりも抗癌効果は強いとされている⁵⁾。

IFN- γ 遺伝子にかぎらず IL-2, IL-4, IFN- α 等のサイトカイン遺伝子を種々のマウス腫瘍細胞に導入し、抗腫瘍ワクチン効果のあることが示されてい

る⁶⁻⁸⁾。これらの報告からいえることは、腫瘍細胞から産生されるサイトカイン量が高くなくても、ワクチン効果が期待できることである。サイトカインは局所的に少量できわめて高い生物活性を発揮できる物質であると考えられているので、サイトカイン遺伝子導入はその生物活性を短期的なものから、長期持続的なものに変換したと思われる。

癌細胞にサイトカイン遺伝子を導入して惹起された免疫応答が腫瘍特異的か否かは文献的に二つの報告がある^{2,9)}。われわれの、MBT2 に IFN- γ 遺伝子を導入した系では、親株の MBT2 移植は拒絶するが他の腫瘍株 (線維肉腫 C3H 8.2) は移植可能なので、腫瘍特異的な抗腫瘍免疫がえられたと考えられる (unpublished data)。

米国では NIH がいくつかの臨床試験に許可を与え、すでにメラノーマ、腎癌、神経芽細胞腫の末期癌患者を対象に遺伝子治療が始まっている¹⁾。癌細胞に IL-2 や TNF 遺伝子を導入し免疫原性を高めた腫瘍をワクチンとして患者に接種する方法や、TNF 遺伝子を導入して、抗腫瘍活性を増強した T リンパ球を患者に投与する方法が施行されている。免疫増強以外では単純ヘルペスウイルスの thymidine kinase 遺伝子を癌細胞に導入し、その後 ganciclovir を投与することによって thymidine kinase 遺伝子導入細胞の破壊をねらった臨床試験も許可されている。またアンチセンス ras と癌抑制遺伝子 p53 を癌細胞に導入し脱癌化をねらった試験もある。

国内ではヒト癌における遺伝子治療はまだ施行されていないが、厚生科学会議が平成 5 年 4 月 15 日に「遺伝子治療臨床研究に関するガイドライン」を決めたことにより、早晩臨床応用される運びとなった。このような機運のたかまりつつある状況で、泌尿器科癌における遺伝子治療の臨床応用のために、基礎科学者と臨床医の共同による基礎的なデータの蓄積と将来を見定めた実験計画とその実行が急務である。

結 語

1. レトロウイルスをベクターにして、マウス膀胱癌株 MBT2 に IFN- γ 遺伝子を導入し MBT2/ γ を樹立した。
2. MBT2/ γ はヌードマウスでは腫瘍を形成するが、C3H/He マウスでは腫瘍形成率は低下した。
3. MBT2/ γ を移植されても腫瘍を形成しなかったマウスでは、親株の MBT2 を移植しても着生せず、抗腫瘍免疫を獲得したと思われた。
4. MBT2/ γ は癌特異的な免疫原、抗腫瘍ワクチンと

して有効と思われた。

5. MBT2 に対して抗腫瘍免疫を獲得したマウスでは, MBT2/ADR (MBT2 の ADR 耐性株) を移植しても腫瘍は形成しなかった. 抗癌剤耐性の克服に, IFN- γ 遺伝子導入のアプローチは利用可能と考えられた.

本研究の一部は文部省科学研究費 (一般研究 C03670752, C05671313, B3454385) の援助によるものである.

文 献

- 1) Anderson WF: Human gene therapy. *Science* **256**: 808-813, 1992
- 2) Watanabe Y, Kuribayashi K, Miyatake S, et al.: Exogenous expression of mouse interferon γ cDNA in mouse neuroblastoma C1300 cells results in reduced tumorigenicity by augmented anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9456-9460, 1989
- 3) Porgador A, Bannerji R, Watanabe Y, et al.: Antimetastatic vaccination of tumor-bearing mice with two types of IFN- γ gene-inserted tumor cells. *J Immunol* **150**: 1458-1470, 1993
- 4) Watanabe Y and Kawada Y: A practical approach. In: *Lymphokines and interferons*.

Edited by Clemens MJ, Morris AJ and Gearing JM. pp. 1-14, IRL, Oxford, 1987

- 5) Trinchieri G and Perussia B: Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol Today* **6**: 131-136, 1985
- 6) Golumbek PT, Lazenby AJ, Levitsky HI, et al.: Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4. *Science* **254**: 713-716, 1991
- 7) Tepper RI, Pattengale PK and Leder P: Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. *Cell* **57**: 503-512, 1989
- 8) Gansbacher B, Zier K, Daniels B, et al.: Interleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity. *J Exp Med* **172**: 1217-1224, 1990
- 9) Esumi N, Hunt B, Itaya T, et al.: Reduced tumorigenicity of murine tumor cells secreting γ -interferon is due to nonspecific host responses and is unrelated to class I major histocompatibility complex expression. *Cancer Res* **51**: 1185-1189, 1991

(Received on October 19, 1993)

(Accepted on October 22, 1993)

(迅速掲載)