

膀胱癌細胞への *in vivo* における Interferon- γ 遺伝子導入による遺伝子治療

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*, 上田 朋宏**, 日裏 勝***, 吉田 修

京都大学薬学部薬剤学教室 (主任: 橋田 充教授)

川 端 健 二

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

国立京都病院臨床研究部 (主任: 葛谷英嗣部長)

高 見 昌 史

GENE THERAPY BY *IN VIVO* INTERFERON- γ GENE TRANSFER TO MURINE BLADDER TUMOR

Takayuki HASHIMURA, Tomohiro UEDA, Masaru HIURA and Osamu YOSHIDA

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

Kenji KAWABATA

From the Department of Drug Delivery Research, the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Yoshihiko WATANABE

From the Department of Molecular Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Masashi TAKAMI

From the Department of Clinical Research, Kyoto National Hospital

For the clinical application of the cytokine gene therapy, the antitumor effects of systemic administration of Interferon- γ (IFN- γ) and those of *in vivo* direct IFN- γ gene transfer to the tumors of mouse bladder carcinoma (MBT2) were compared. After the subcutaneous inoculation of MBT2 cells into mice, 10^2 , 10^3 or 10^4 units of IFN- γ were injected intraperitoneally (IP) or subcutaneously (SC). Neither IP nor SC injection of IFN- γ resulted in tumor suppression or prolonged the survival time of tumor-bearing mice. The effect of *in vivo* direct IFN- γ gene transfer by a retrovirus vector to MBT2 tumors was also evaluated. After the subcutaneous inoculation of MBT2 cells into mice, a virus culture supernatant containing IFN- γ gene was injected into the same tumor site once a day for 3 days. In 50% of the mice in the treatment groups with IFN- γ gene induction, no tumor formation was observed. Tumor-free survival and actuarial survival in the treatment groups were significantly longer than those in the control group. These results showed the possibility of *in vivo* direct IFN- γ gene transfer into tumors and were encouraging for the execution of tumor cell-targeted IFN- γ gene therapy against human bladder cancer.

(Acta Urol. Jpn. 43: 809-813, 1997)

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

結 言

癌に対する免疫療法はインターフェロン- α (IFN- α), インターフェロン- γ (IFN- γ), IL-2 その他各種

の BRM が使用されているが, それらの有効率は20~40%にとどまり, 臨床的には決して満足できる効果は得られていない^{1,2)}

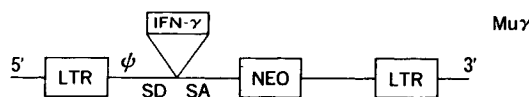
この現状を打破する目的で抗腫瘍効果の高いサイトカイン遺伝子を種々の細胞に導入して, 殺細胞効果を高めたり, 患者の免疫能を高めようとする遺伝子治療が注目されている. 我々はそのようなサイトカインの一つである IFN- γ に着目し, 膀胱癌をターゲットと

* 現: 国立姫路病院泌尿器科

** 現: 公立甲賀病院泌尿器科

*** 現: 日本赤十字和歌山医療センター泌尿器科

(1) pZIP. NEO. SV(X)1



(2) WBK

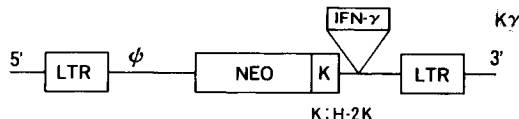


Fig. 1. Retroviral Vector

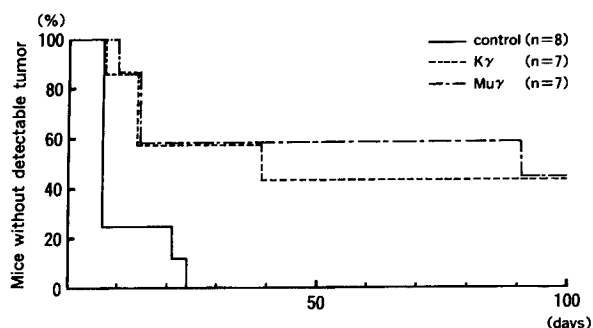
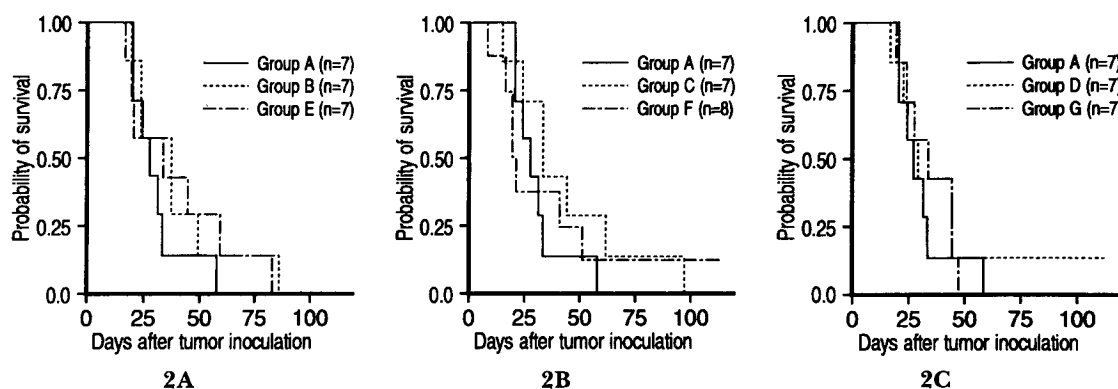
Fig. 3 Tumor-free rate after IFN- γ gene transfer by retrovirus vector K γ or Mu γ to MBT2 tumor ($p < 0.05$)Fig. 2. Survival curves of mice bearing MBT2 tumor treated with IFN- γ IP or SC injection

Fig. 2A; A (Control): PBS SC, B: IFN- γ 10^2 unit SC, E: IFN- γ 10^2 unit IP
 Fig. 2B; A (Control): PBS SC, C: IFN- γ 10^3 unit SC, F: IFN- γ 10^3 unit IP
 Fig. 2C; A (Control): PBS SC, D: IFN- γ 10^4 unit SC, G: IFN- γ 10^4 unit IP

した遺伝子治療の研究を行ってきた^{3,4)}

今回、マウス膀胱癌細胞株 MBT2 移植腫瘍に対して IFN- γ の全身投与では無効だが、IFN- γ 遺伝子を腫瘍へ導入すると抗腫瘍効果がえられたので報告する。

材料と方法

細胞株

化学発癌により樹立された、C3H/He マウス膀胱癌細胞株 MBT2 (移行上皮癌) を用いた。

レトロウイルスベクター (Fig. 1)。

レトロウイルスベクターとしてマウス白血病ウイルス (MuLV) を骨格にしたマウス IFN- γ 、ネオマイシン耐性の遺伝子を組み込んだベクター (Mu γ)、あるいは、マウス class I MHC をプロモーターとして挿入したベクター (K γ) を使用した⁵⁾

遺伝子導入

レトロウイルスをベクターにして 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 ϕ 2 を用いて、MBT2 に導入し、G418 選択を行い、G418 耐性 IFN- γ 産生 MBT2 細胞 (MBT2/ γ) を得

た。MBT2/ γ は 2 回クローニングして、*in vitro* で IFN- γ の産生を確認した。

フローサイトメトリーによるクラス I MHC 抗原の発現

MBT2 の細胞表面のクラス I MHC 抗原の発現を FACSscan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) を用いて解析した。レトロウイルスをベクターにして MBT2 に IFN- γ の遺伝子を導入した細胞、およびリポフェクションを用いて MBT2 に IFN- γ の遺伝子を導入した細胞の MHC class I 抗原の発現を、親株の MBT2 のものと比較した。各々の細胞浮遊液をラット抗マウス MHC class I 抗体 (M1/42) とともに培養した。その後、FITC でラベルした兔抗ラット IgG 抗体とともに培養して、結合したクラス I MHC 抗体を FACSscan で解析した。

実験動物

C3H/He マウス、7~8 週令の雄を用いた。移植する MBT2 は $1.5-5 \times 10^5/0.1$ ml の細胞浮遊液をマウスの背部へ皮下注射した。腫瘍体積は、経時的に計測し体積は $\pi/6$ (長径) $\times$ (短径) $\times$ (高さ) で算出した。

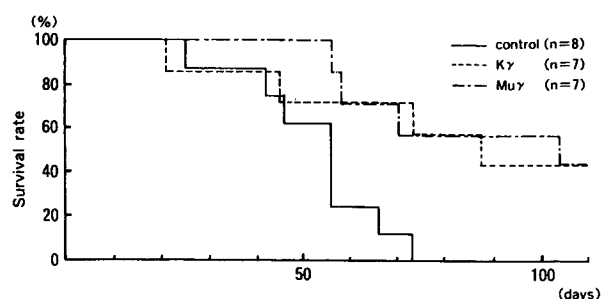


Fig. 4 Survival curves of mice bearing MBT2 tumor treated with IFN- γ gene transfer by retrovirus vector K γ or Mu γ ($p < 0.05$)

マウス膀胱癌 MBT2 に対する IFN- γ の全身投与の効果の実験

7週令の雄 C3H/He マウスに day 1 に 5×10^5 の MBT2 の細胞浮遊液をマウスの背部へ皮下注した。Day 8 に腫瘍形成の認められたマウスを一群 7 匹として、A～G 群まで 7 群作成した。Day 10, 12, 14 に以下のように PBS または IFN- γ を皮下注 (SC) または腹腔内 (IP) に投与した。A 群 (対照群): PBS SC, B 群: IFN- γ 10^2 unit SC, C 群: IFN- γ 10^3 unit SC, D 群: IFN- γ 10^4 unit SC, E 群: IFN- γ 10^2 unit IP, F 群: IFN- γ 10^3 unit IP, G 群: IFN- γ 10^4 unit IP。腫瘍体積は、週 2 回計測し腫瘍成長曲線を求めた。生存の有無は毎日確認して、実測生存率を求めた。

マウス膀胱癌 MBT2 に対する IFN- γ 遺伝子 *in vivo* 直接導入による抗腫瘍効果の実験

7週令の雄 C3H/He マウスに day 0 に 1.5×10^5 の MBT2 の細胞浮遊液をマウスの背部へ皮下注した。対照群 ($n = 8$) には day 1, 2, 3, 4 に PBS を MBT2 注入部位に皮下注した。K γ 群 ($n = 7$), Mu γ 群 ($n = 7$) には day 1, 2, 3, 4 に各々 K γ , Mu γ の virus supernatant 0.1 ml を MBT2 注入部位に皮下注した。この方法により *in vitro* で IFN- γ 遺伝子を、K γ 群, Mu γ 群のマウス膀胱腫瘍に直接導入をこころみた。経時的に腫瘍体積を測定し、生存の有無を確認して、実測生存率を求めた。

結 果

マウス膀胱癌 MBT2 移植腫瘍に対する IFN- γ の全身投与の抗腫瘍効果

腫瘍の増殖速度は IFN- γ 皮下注群 (B, C, D) も腹腔内投与群 (E, F, G) も対照群 (A) と比較して、有意差は認められなかった。各群の生存曲線を検討したが、皮下注群も腹腔内投与群も対照群と比較して、生存期間の延長は認められなかった (Fig. 2A, 2B, 2C)。MBT2 に対する IFN- γ の全身投与の有意な抗

腫瘍効果は認められなかった。

マウス膀胱癌 MBT2 移植腫瘍に対する IFN- γ 遺伝子 *in vivo* 直接導入による抗腫瘍効果

IFN- γ 遺伝子がマウス膀胱腫瘍 MBT2 に導入された K γ 群, Mu γ 群の腫瘍増殖曲線は、対照群と比較して抑制された。腫瘍形成率は対照群: 8/8 (100%), K γ 群: 4/7 (57%), Mu γ 群: 3/7 (43%) であり Mu γ 群では対照群に比較し、有意に腫瘍形成率は減少した ($P < 0.05$)。腫瘍形成の時期も K γ 群, Mu γ 群では対照群に比較して有意に遅延した (Fig. 3)。実測生存期間も K γ 群, Mu γ 群ともに生存期間の延長が認められ、特に Mu γ 群では有意に生存期間が延長した ($P < 0.05$) (Fig. 4)。IFN- γ 遺伝子が導入されたことにより抗腫瘍効果が得られたと考えられた。

IFN- γ 遺伝子導入によるクラス IMHC 抗原の発現の変化

フローサイトメトリーによる MBT2 細胞表面のクラス IMHC 抗原の発現の変化を Fig. 5A, 5B, に示した。リポフェクチン (Fig. 5A) およびレトロウイルス (Fig. 5B) を用いて MBT2 に IFN- γ の遺伝子を導入した細胞の MHC class I 抗原の発現は、親株 MBT2 のものと比較し有意に発現量が増加していた。

考 察

IFN- γ は細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 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, 腫瘍のクラス IMHC 抗原提示能の増強により, 抗腫瘍免疫を惹起するといわれている。この様に多彩な機能を持つ IFN- γ も、臨床的に全身投与を行ったときには、周知のとおり高い有効率は期待できない。その理由の一つは、サイトカインは一般的に生体内での半減期が短く全身投与では有効な濃度が得られないということが考えられる。

腫瘍局所でサイトカインの機能を果たすためには、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、局所的に持続的に IFN- γ が産生されればよいと思われる。その結果、CTL のキラー活性が増強されたり、標的腫瘍細胞のクラス IMHC 抗原の発現が増強され CTL の標的認識を高めて、CTL は腫瘍攻撃の能力をもち抗腫瘍効果が得られる。

実際に我々の研究でも^{3,4)}、MBT2 に IFN- γ 遺伝子を導入した MBT2/ γ ではクラス IMHC 抗原の発現が増強されていた。また MBT2/ γ を腫瘍ワクチンとして免疫したマウスは、親株の MBT2 移植は拒絶するが、他の腫瘍株 (線維肉腫 C3H8.2) は移植可能なので、腫瘍特異的な抗腫瘍免疫が得られたと考えられた。しかもこの抗腫瘍免疫は CD8 抗体が作用すると働かないことより、CD8 陽性 T 細胞が主体となっていることが示された。

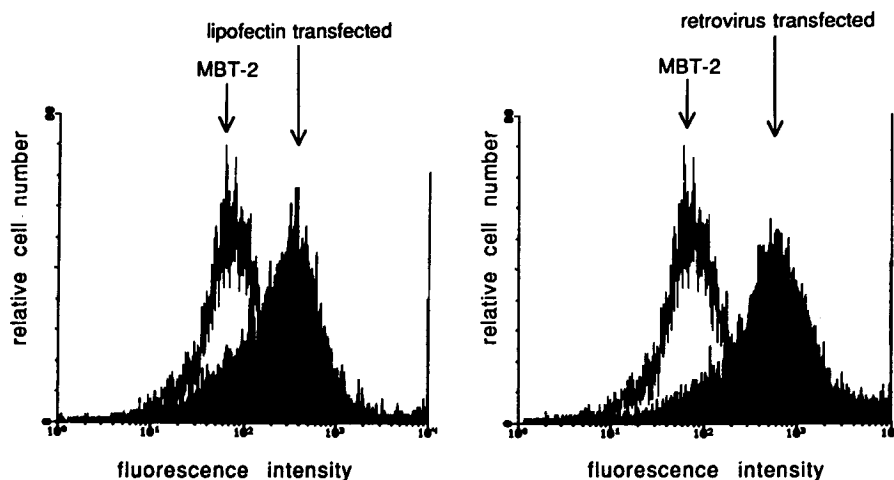


Fig. 5 MHC class I expression in gene transfected MBT-2

Fig. 5A: Lipofection transfection

Fig. 5B: Retroviral transfection

IFN- γ 遺伝子に限らず IL-2, IL-4, GM-CSF, 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, 抗腫瘍効果のあることが示されている^{6,7)}

どのサイトカイン遺伝子をどの腫瘍に導入すれば, よりよい抗腫瘍効果が得られるかは, 腫瘍の性格, 個体の反応性によって異なると思われる. 臨床の場合では, 高い抗腫瘍免疫が得られるサイトカイン遺伝子を調べて導入することが理想的であろう.

膀胱癌は BCG 膀胱療法が有効であることから示唆されるように, 免疫療法が有効であることが認められている数少ないヒト癌の一つである. 内視鏡や膀胱による腫瘍へのターゲティングが容易であることも, サイトカイン遺伝子治療の候補と考えられる. サイトカイン遺伝子導入以外では, wild type p53 遺伝子を膀胱癌細胞株に導入することにより H-ras の発現が抑制されて腫瘍増殖の抑制が報告されている⁸⁾

また, ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼの遺伝子を導入したり⁹⁾, アデノウイルスをベクターとして遺伝子導入もこころみられている¹⁰⁾ 今後も安全性を確認しつつ遺伝子治療の臨床応用への道を開いていくことが責務である.

結 語

1) 遺伝子治療の基礎的実験として, マウス膀胱癌細胞株 MBT2 の移植腫瘍に対して, IFN- γ の全身投与と, 腫瘍への IFN- γ 遺伝子導入により抗腫瘍効果が異なるかを検討した.

2) マウス膀胱癌 MBT2 移植腫瘍に対して IFN- γ を皮下注あるいは腹腔内投与した. 腫瘍形成の抑制, 生存期間の延長は認められず, IFN- γ の全身投与の

有意な抗腫瘍効果は認められなかった.

3) マウス膀胱癌 MBT2 移植腫瘍に対して IFN- γ 遺伝子を腫瘍に導入した. 腫瘍形成の抑制, 生存期間の延長が認められ, IFN- γ 遺伝子の腫瘍細胞への導入により有意な抗腫瘍効果が認められた.

4) 抗腫瘍効果は, IFN- γ 遺伝子の癌細胞への導入により, 癌細胞表面のクラス II MHC 抗原の発現が増強され, 腫瘍特異的な抗腫瘍免疫が得られたためと考えられた.

文 献

- Hofmockel G, Langer W, Theiss M, et al.: Immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma using a regimen of interleukin-2, interferon- α and 5-fluorouracil. *J Urol* **156**: 18-21, 1996
- 高久史磨: 悪性腫瘍に対する遺伝子組換えヒトインターフェロン γ (s-6810) の治療効果. *癌と治療* **14**: 645-652, 1987
- Hiura M, Hashimura T, Watanabe Y, et al.: Induction of Specific Anti-tumor Immunity by Interferon- γ Gene-transferred Murine Bladder Carcinoma MBT-2. *Folia Biol* **40**: 49-61, 1994
- 橋村孝幸, 日裏 勝, 寺村康史ほか: 膀胱癌細胞への IFN- γ 遺伝子導入による癌免疫療法. *泌尿紀要* **39**: 1205-1208, 1993
- Watanabe Y, Kuribayashi K, Miyatake S, et al.: Exogenous expression of mouse interferon γ cDNA in mouse neuroblastoma C1300 cells in reduced tumorigenicity by augmented anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9456-9460, 1989
- Connor J, Bannerji R, Saito S, et al.: Regression of bladder tumors in mice treated with interleukin 2 gene-modified tumor cells. *J Exp Med* **177**: 1127-1134, 1993

- 7) Hock H, Dorsch M, Kunzendorf U, et al. : Mechanism of rejection induced by tumor cell-targeted gene transfer of interleukin 2, interleukin 4, interleukin 7, tumor necrosis factor, or interferon γ . *Proc Natl Acad Sci USA* **90** : 2774-2778, 1993
- 8) Li M, Gu FL, Li WB, et al. : Introduction of wild type p53 gene downregulates the expression of H-ras gene and suppresses the growth of bladder cancer cells. *Urol Res* **23** : 311-314, 1995
- 9) 清水宏之, 鈴木 聡, 山本史朗, ほか : Herpes simplex virus の thymidine kinase 遺伝子導入による膀胱癌遺伝子治療の検討. *日泌尿会誌* **86** : 470, 1995
- 10) Bernard DM JR, Kenneth ED, Marie EC, et al. : Adenoviral-mediated gene transfer to bladder in vivo. *J Urol* **152** : 506-509, 1994

(Received on August 21, 1997)

(Accepted on October 13, 1997)