

腎癌に対する Interferon- β /Liposome 製剤を用いた遺伝子治療の開発

水谷 陽一¹, 中西 弘之¹, 三木 恒治¹
水野 正明², 吉田 純²

¹京都府立医科大学泌尿器科, ²名古屋大学医学部脳神経外科

GENE THERAPY USING CATIONIC MULTILAMELLAR LIPOSOMES CONTAINING HUMAN INTERFERON- β GENE AGAINST RENAL CELL CARCINOMA

Yoichi MIZUTANI¹, Hiroyuki NAKANISHI¹, Tsuneharu MIKI¹,
Masaaki MIZUNO² and Jun YOSHIDA²

¹The Department of Urology, Kyoto Prefectural University of Medicine

²The Department of Neurosurgery, Nagoya University, Graduate School of Medicine

The anticancer activity of cationic multilamellar liposomes containing human IFN- β gene (IAB-1) against renal cell carcinoma (RCC) was examined. Concentrations of IFN- β protein were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. The cytotoxic activity of IAB-1 against RCC cells and normal renal proximal tubule endothelial cells (RPTEC5899) was examined by the microculture tetrazolium dye assay. For the in vivo study, the NC65 RCC cell line was inoculated into severe combined immunodeficiency mouse. The RCC cells treated with IAB-1 secreted significant amounts of IFN- β protein. Significant in vitro cytotoxic activity of IAB-1 against RCC cells was observed. In contrast, treatment of RCC cells with recombinant IFN- β protein resulted in less cytotoxicity. No significant cytotoxicity was seen in RPTEC5899 cells. Apoptosis was observed in RCC cells treated with IAB-1. The size of NC65 RCC cancers transfected with IAB-1 in mice was significantly smaller than that receiving injection of empty liposomes or recombinant IFN- β protein. These findings show that IAB-1 may have significant antitumor activity against RCC, and suggest its potential clinical application for gene therapy against RCC.

(Hinyokika Kyo 51 : 71-73, 2005)

Key words: Renal cell carcinoma, IFN- β , Cationic liposome, IAB-1, Gene therapy

緒 言

腎癌の約10~15%は初診時に転移が認められ、転移のない症例でもその約20~30%は根治的腎摘除術後に転移をきたす¹⁾ この転移性腎癌に対して化学療法、放射線療法は効果がなく、免疫療法が主に行われているが、その奏効率は約15~20%程度と満足できるものではない^{2,3)} このように腎癌の治療における最も重要な課題の1つは転移性腎癌の治療にあるといえる。Interferon- β (IFN- β)/liposome 遺伝子治療製剤である IAB-1 は malignant glioma に対して名古屋大学において開発された^{4,5)} すでに名古屋大学医学部脳神経外科において臨床研究が開始されており、その有用性が報告されている。そこで今回、この IAB-1 の腎癌に対する有効性について検討した^{6,7)}

対象と方法

ヒト腎癌細胞株 (NC65, ACHN), および2種類

の腎癌初期培養細胞 (RCC1, RCC2) を標的細胞として用いた^{8,9)} IFN- β /liposome 遺伝子治療製剤である IAB-1 は名古屋大学医学部脳神経外科において製造され、供与された^{10,11)} その liposome は, trimethyl ammonioacetyl-didodecyl-D-glutamine chloride, dilauroyl phosphatidylcholine, dioleoyl phosphatidylethanolamine が 1 : 2 : 2 で構成された cationic liposome である。

細胞培養上清中の IFN- β の濃度は enzyme-linked immunosorbent assay にて測定した。in vitro における直接細胞障害活性は 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide assay にて検討した。アポトーシスは terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP nick end labeling (TUNEL) method にて検出した。また, interferon-stimulated response element (ISRE) の活性を mercury pathway profiling system を用いて, 種々の遺伝子発現を macroarray, western blotting にて測定

した。

In vivo モデルとして, severe combined immuno-deficient mouse (SCID) マウスに NC65 腎癌細胞を皮下移植し, IAB-1 をマイクロポンプにて投与した。

結 果

IAB-1 により in vitro にて腎癌細胞に対して IFN- β 遺伝子導入を行うと, その細胞培養上清中には有意な IFN- β の分泌が認められた。また, IAB-1 処理により, 腎癌細胞に対して細胞障害活性が認められた。この IAB-1 による細胞障害活性は, IFN- β 蛋白よりも有意に強く認められた。また, この活性は, 濃度依存性であり, 第1日目より認められた (Fig. 1)。IAB-1 により正常腎細胞に対しても IFN- β 遺伝子導入は可能であったが, 細胞障害活性は示さなかった。TUNEL 染色にて, IAB-1 の細胞障害作用はアポトーシス誘導によることが示唆された。

NC65 腎癌細胞の IAB-1 処理により I 型 IFN signal pathway 中の STAT1, STAT2, p48 の発現に変化は認められなかったが, ISRE の活性は増強され

た。また, NC65 腎癌細胞を IAB-1 で培養することにより, macroarray にて c-myc 遺伝子の発現の増強が認められた。

Trans-well system assay では, IAB-1 の細胞障害活性は IFN- β 蛋白と同程度まで減弱した。IFN- β 中和抗体を添加しても, IAB-1 遺伝子導入による細胞障害活性は阻止できなかった。共焦点顕微鏡にて, IFN- β 蛋白処理時には細胞膜上には観察されなかった IFN- β receptor が, IAB-1 処理後には腎癌細胞質内にも局在し, IFN- β 蛋白と co-localization しているように観察された。

SCID マウス皮下に NC65 腎癌細胞株を移植し, その形成された腫瘍に対して微量注入ポンプにて IAB-1 を直接注入したところ, IFN- β 蛋白投与よりも有意な抗腫瘍効果が認められた。この効果は, 投与量依存性に認められた。IAB-1 (30 μ l) を週3回, 2週間投与と, 週2回, 3週間投与との抗腫瘍効果の差は認められなかった (Fig. 2)。また, この IAB-1 による腎癌に対する in vivo 抗腫瘍効果は 5-fluorouracil により増強された。

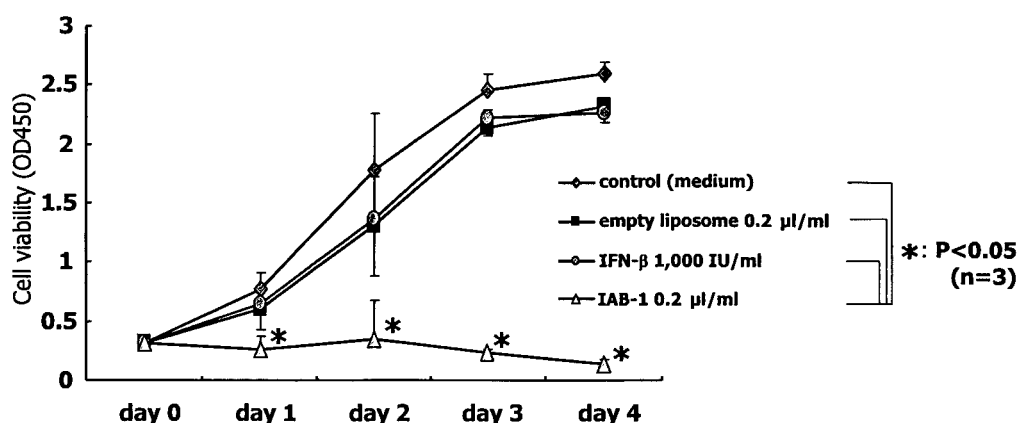


Fig. 1. Cell viability of IAB-1 transfected NC65 cells.

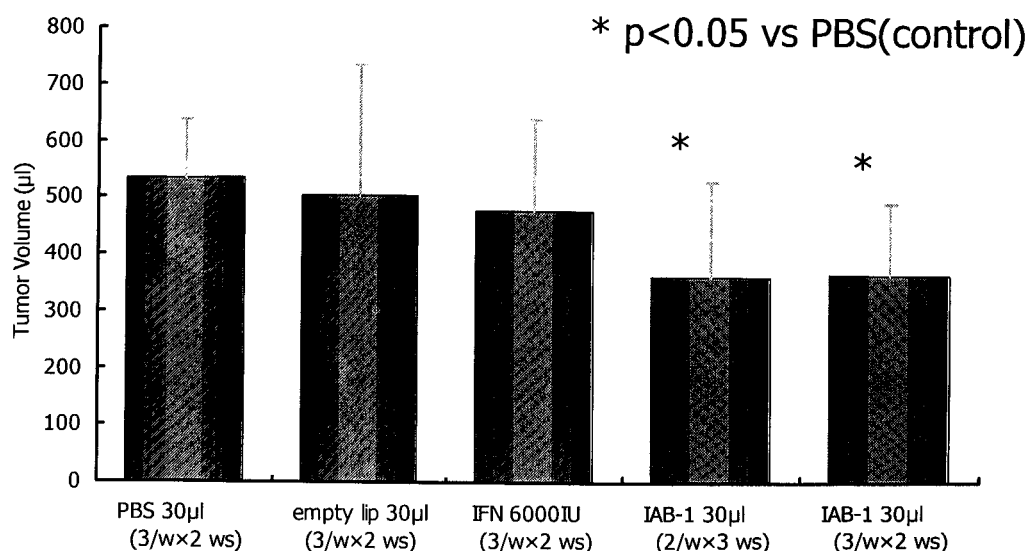


Fig. 2. In vivo effect of treatment schedule on IAB-1 antitumor activity.

考 察

本研究により, 腎癌に対して IAB-1 は IFN- β 蛋白よりも強い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった. その理由の1つとして, IFN- β 蛋白は腎癌に対してアポトーシスを誘導しなかったが, IAB-1 は腎癌に対してアポトーシスを誘導したことがあげられる. NC65 腎癌細胞の IAB-1 処理により IFN- β 蛋白処理より ISRE の活性が増強された. また, NC65 腎癌細胞を IAB-1 で培養することにより, c-myc の発現の増強が認められた. ISRE は Fas などのアポトーシスを誘導する分子の発現増強作用が報告されており, IAB-1 によるアポトーシスの誘導はこの ISRE の活性化と c-myc 遺伝子の発現増強によるものであると考えられた.

IFN signal pathway は一般に細胞表面上で IFN- β が IFN- β receptor に結合することにより開始されるとされている. 今回の結果によると, IFN- β 中和抗体を添加しても, IAB-1 遺伝子導入による細胞障害活性は阻止できず, 共焦点顕微鏡にて, IFN- β 蛋白処理時には細胞膜上にしか観察されなかった IFN- β receptor が, IAB-1 処理後には腎癌細胞質内にも局在し, IFN- β 蛋白と co-localization しているように観察されているので, IAB-1 により IFN- β 遺伝子導入を行うと, 従来の IFN signal pathway の概念とは異なった細胞内での IFN signal pathway も誘導され, IFN- β 蛋白よりも IAB-1 が強い抗腫瘍効果を示したと考えられた.

今回は IAB-1 の腎癌に対する直接細胞障害作用についてのみ検討した. IFN は本来免疫賦活作用も有しているので, 今後, IAB-1 の免疫賦活作用について検討する必要がある.

結 語

IAB-1 は IFN- β 蛋白よりも有意に強い細胞障害活性を有し, 正常細胞を障害しないことから, 腎癌に対する IAB-1 遺伝子治療製剤を用いたアポトーシス誘導による分子標的治療の可能性が示唆された.

参 考 文 献

- 1) Motzer RJ, Bander NH and Nanus DM: Renal-cell

- carcinoma. *N Engl J Med* **335**: 865-875, 1996
- 2) Rinehart JJ, Young D, Laforge J, et al.: Phase I/II trial of interferon-beta-serine in patients with renal cell carcinoma: immunological and biological effects. *Cancer Res* **47**: 2481-2485, 1987
- 3) Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, et al.: Interferon- α as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* **20**: 289-296, 2002
- 4) Natsume A, Mizuno M, Ryuke Y, et al.: Antitumor effect and cellular immunity activation by murine interferon-beta gene transfer against intracerebral glioma in mouse. *Gene Ther* **6**: 1626-1633, 1999
- 5) Mizuno M, Yoshida J, Sugita K, et al.: Growth inhibition of glioma cells transfected with the human beta-interferon gene by liposomes coupled with a monoclonal antibody. *Cancer Res* **50**: 7826-7829, 1990
- 6) Nakanishi H, Mizutani Y, Kawauchi A, et al.: Significant antitumoral activity of cationic multilamellar liposomes containing human interferon- β gene against human renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **9**: 1129-1135, 2003
- 7) 水谷陽一, 中西弘之, 中尾昌宏, はか: 多重膜リポソームを用いた IFN- β 遺伝子導入による腎細胞癌に対する遺伝子治療. 腎癌研究会会報 **26**: 25-26, 2004
- 8) Mizutani Y, Bonavida B, Koishihara Y, et al.: Sensitization of human renal cell carcinoma cells to cis-diamminedichloroplatinum (II) by anti-interleukin 6 monoclonal antibody or anti-interleukin 6 receptor monoclonal antibody. *Cancer Res* **55**: 590-596, 1995
- 9) Wu XX, Mizutani Y, Kakehi Y, et al.: Enhancement of Fas-mediated apoptosis in renal cell carcinoma cells by adriamycin. *Cancer Res* **60**: 2912-2918, 2000
- 10) Yoshida J, Mizuno M and Yagi K: Cytotoxicity of human beta-interferon produced in human glioma cells transfected with its gene by means of liposomes. *Biochem Int* **8**: 1055-1061, 1992
- 11) Yoshida J, Mizuno M and Yagi K: Efficient transfection of human interferon-beta gene to human glioma cells by means of cationic multilamellar liposomes coupled with a monoclonal antibody. *J Neurooncol* **19**: 269-274, 1994

(Received on February 13, 2004)

(Accepted on March 1, 2004)