

学 位 論 文 題 名

Pigment epithelium-derived factor gene therapy  
inhibits human pancreatic cancer in mice

(Pigment epithelium-derived factor を用いた遺伝子治療はマウス  
移植ヒト膵癌の増殖を抑制する)

学位論文内容の要旨

背景と目的

膵がんは全体の5年生存率が0.4~4%と予後不良な疾患である。外科的切除は予後を向上させるが、大部分の症例は局所再発、肝転移などによって、術後に1~2年以内で再発死する。

多くの実験データおよび臨床データから、腫瘍の増大が血管新生誘導能に依存することが報告されている。腫瘍が増大する際には、生理的な抑制環境から新しい血管新生を誘導する機能を獲得する必要がある。

Pigment epithelium-derived factor (PEDF) は、胎児の網膜色素上皮細胞の培養上清において、最初に同定された。これは50kDaの分子量による分泌型グリコプロテインである。近年、PEDFが眼球の血管新生に対する強力な抑制因子であることがわかり、それは角膜組織の無血管状態を維持していると考えられている。PEDFの血管新生阻害機能は、他の内因性の血管新生阻害因子であるアンジオスタチン、トロンボスポンジン1、およびエンドスタチンよりも強力である。これまでに、私たちは免疫組織化学的にPEDFの発現をスクリーニングし、PEDF発現の低下が肝転移と予後不良のリスク増大に相関することを示した。この背景に基づいて、PEDF発現の低下が、膵癌の転移能獲得に寄与する可能性があるかと仮定し、ヒトのPEDF過剰発現膵腺癌細胞株の*in vitro*、*in vivo*での増殖能を検討した。

方 法

はじめにヒト胎児膵由来非癌細胞株2株およびヒト膵癌細胞株8株のPEDF発現スクリーニングをRT-PCR、ウエスタンブロットを用いて行った。その後PEDF遺伝子を脾臓cDNAライブラリーよりクローニングし、PEDF発現レンチウイルスベクター(LV-PEDF)とコントロールとしてGFP発現レンチウイルスベクター(LV-GFP)を作製した。このウイルスを膵癌細胞株PCI24、PCI43P5に感染させ、薬剤選択を行うことによりPEDF過剰発現膵癌細胞株(PCI24-PEDF、PCI43P5-PEDF)とコントロール株(PCI24-GFP、PCI43P5-GFP)を樹立した。過剰発現株の上清およびLysateのPEDFタンパクの発現をウエスタンブロットにて確認し、親株、コントロール株およびPEDF過剰発現膵癌細胞株の上清を回収し血管内皮細胞(HUVECs)に対する増殖、浸潤能抑制実験を行った。

次に*in vivo*の実験としてPEDF過剰発現膵癌細胞株とコントロール株をヌードマウスの皮下と腹腔内に移植し皮下モデル、腹膜播種モデルを作製した。皮下モデルは体積を、腹膜播種モデルは腸間膜内の腫瘍個数を計測した。ウイルスを用いた治療実験としてマウス皮下

に膵癌細胞株を移植し腫瘍径が 3-5mm になったところで PEDF 発現レンチウイルスとコントロールウイルスを腫瘍内に注射し増殖を抑制できるかを検討した。また、その腫瘍を摘出し遺伝子導入の確認と微小血管密度の計算を行うため免疫染色を施行した。最後に 2004 年に当科で手術を施行した膵癌患者の血清 PEDF 濃度を ELISA 法で測定し正常人と比較した。

## 結 果

1. PEDF 発現スクリーニング： PEDF の mRNA は膵由来非癌細胞株 2/2 株、膵癌細胞株 5/8 株に発現していた。PEDF タンパクは膵由来非癌細胞株 2/2 株、膵癌細胞株 2/8 株の上清で検出された。このことから正常膵組織では PEDF が発現し、癌化すると PEDF の発現が低下する可能性が示唆された。
2. PEDF タンパクの血管内皮に対する影響： 上清中に過剰に PEDF が存在した状態では血管内皮細胞の増殖能、遊走能は有意に抑制された。同条件で膵癌細胞そのものの増殖には影響を及ぼさなかった。よって PEDF は膵癌細胞への直接の増殖抑制効果は無く血管内皮細胞を介して膵癌に影響を与えていると考えられた。
3. 過剰発現株移植実験： 皮下移植モデルにおいて PEDF 過剰発現細胞群 (PCI24-PEDF、PCI43P5-PEDF) はコントロール群に対し有意に増殖が低下していた。PEDF 過剰発現細胞群は腹膜播種モデルにおいて有意に腸間膜の腫瘍個数が少なかった。
4. 遺伝子治療実験：皮下腫瘍治療実験において PEDF 発現レンチウイルス投与群はコントロール群に比べ有意に腫瘍増殖が抑制された。ウイルス投与により明らかな副作用は認められなかった。
5. 微小血管密度： ウイルス投与後の腫瘍を摘出し GFP 抗体での免疫染色を行ったところ GFP の発現が認められ、遺伝子の導入が確認された。CD34 抗体で腫瘍血管内皮を染色し、微小血管密度を計算したところ PEDF 群はコントロール群に比べ有意に腫瘍内微小血管密度が減少していた。
6. ヒト血清 PEDF 濃度： 膵癌患者 (n=11) と正常人 (n=8) の血清 PEDF 濃度を ELISA 法で測定したところ膵癌患者は正常人に比べ有意に血清 PEDF 濃度が減少していた。

## 考察

本研究において、レンチウイルスベクターによる PEDF 遺伝子導入がヌードマウスに移植されたヒトの膵腺癌腫瘍の増殖を劇的に抑制することが証明された。膵臓組織では、正常の組織がそれ自体を維持するために PEDF 発現を必要とする。このことから PEDF の発現低下は癌細胞の形成に至る細胞の異常や悪性化の誘因となる可能性がある。実際に、PEDF ノックアウトマウスでは、前立腺と膵臓が増大しており、さらに微小血管密度の増大と上皮細胞の過形成を伴っていた。これより、PEDF の分泌が膵腺癌で低下していると予想し、膵臓腺癌患者での血清 PEDF タンパク濃度を検討した。PEDF は健常人の血清では十分な量が検出され、膵腺癌患者の血清では減少していることが判明した。この結果からも、PEDF 膵癌患者における重要な因子であり、本疾患が悪性度の強い疾患であることを示唆している。

本論文に示されるデータはレンチウイルスベクターを用いて PEDF の血管新生阻害活性が膵腺癌に対し腫瘍血管新生と増殖抑制に応用した初めての報告である。腫瘍増殖の抑制には長期間の血管新生阻害因子発現が必須である。レンチウイルスベクターは、導入遺伝子がゲノムに組み込まれる機能によって、遺伝子の長期発現と分泌タンパクの有効濃度の維持を可能にする。したがって、レンチウイルスベクターによる血管新生阻害因子の遺伝子導入は、癌遺伝子治療のための有望なアプローチとなり得る。

結論として、PEDF は腫瘍血管新生を抑制する生物学的効果を持つことを示唆するとともに、PEDF 遺伝子治療は膵腺癌の治療に対する新しいアプローチとなる可能性がある。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛  
副 査 教 授 秋 田 弘 俊  
副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

## Pigment epithelium-derived factor gene therapy inhibits human pancreatic cancer in mice

(Pigment epithelium-derived factor を用いた遺伝子治療はマウス  
移植ヒト膵癌の増殖を抑制する)

Pigment epithelium-derived factor ( PEDF ) は、網膜に発現し神経保護作用があることが知られていたが、近年 PEDF が血管新生に対する強力な抑制因子であることがわかった。これまでに、申請者らは免疫組織化学的に PEDF の発現をスクリーニングし、PEDF 発現の低下が肝転移と予後不良のリスク増大に相関することを示した。本研究においては、ヒトの PEDF 過剰発現膵癌細胞株の *in vitro*、*in vivo* での増殖能を検討した。

はじめにヒト胎児膵由来非癌細胞株およびヒト膵癌細胞株の PEDF 発現スクリーニングを行った。その後 PEDF 発現レンチウイルスベクターを作製した。PEDF 過剰発現膵癌細胞株を樹立し、血管内皮細胞に対する増殖、浸潤能抑制実験を行った。PEDF 過剰発現膵癌細胞株をヌードマウスの皮下と腹腔内に移植し皮下モデル、腹膜播種モデルを作製した。ウイルスを用いた治療実験としてマウス皮下に膵癌細胞株を移植し、PEDF 発現レンチウイルスを腫瘍内に注射し増殖を抑制できるかを検討した。最後に膵癌患者の血清 PEDF 濃度を測定し健常人と比較した。

PEDF の mRNA レベルでの発現は膵由来非癌細胞株 2/2 株、膵癌細胞株 5/8 株に発現していた。PEDF タンパクは膵由来非癌細胞株 2/2 株、膵癌細胞株 2/8 株の上清で検出された。PEDF の存在下では血管内皮細胞の増殖能、遊走能は有意に抑制された。同条件で膵癌細胞そのものの増殖には影響を及ぼさなかった。皮下移植モデルにおいて PEDF 過剰発現細胞群 ( PCI24-PEDF、PCI43P5-PEDF ) はコントロール群に対し有意に増殖が低下していた。PEDF 過剰発現細胞群は腹膜播種モデルにおいて有意に腸間膜の腫瘍個数が減少していた。皮下腫瘍遺伝子治療実験において PEDF(+GFP)発現レンチウイルス投与群はコントロール群に比べ有意に腫瘍増殖が抑制された。ウイルス投与後の腫瘍を摘出し GFP 抗体での免疫染色を行っ

たところ GFP の発現が認められ、遺伝子の導入が確認された。CD34 抗体で腫瘍血管内皮を染色し、微小血管密度を計算したところ PEDF 群はコントロール群に比べ有意に腫瘍内微小血管密度が減少していた。膵癌患者と正常人の血清 PEDF 濃度を ELISA 法で測定したところ膵癌患者は正常人に比べ有意に血清 PEDF 濃度が減少していた。

本研究において、申請者はレンチウイルスベクターによる PEDF 遺伝子導入がヌードマウスに移植されたヒトの膵腺癌腫瘍の増殖を劇的に抑制することを証明した。膵臓組織で、正常の組織がそれ自体を維持するために PEDF 発現を必要とする。このことから PEDF の発現低下は癌細胞の形成に至る細胞の異常や悪性化の誘因となる可能性がある。実際に、PEDF ノックアウトマウスでは、前立腺と膵臓が増大しており、さらに微小血管密度の増大と上皮細胞の過形成を伴っている。これより、PEDF の分泌が膵腺癌で低下していると予想し、膵臓腺癌患者での血清 PEDF タンパク濃度を検討した。PEDF は健常人の血清では十分な量が検出され、膵腺癌患者の血清では減少していることが判明した。

本論文はレンチウイルスベクターを用いて PEDF の血管新生阻害活性を膵腺癌の腫瘍血管新生と増殖の抑制に応用した初めての報告である。腫瘍増殖の抑制には長期間の血管新生阻害因子発現が必須である。レンチウイルスベクターは、導入遺伝子がゲノムに組み込まれる機能によって、遺伝子の長期発現と分泌タンパクの有効濃度の維持を可能にする。したがって、レンチウイルスベクターによる血管新生阻害因子の遺伝子導入は、癌遺伝子治療のための有望なアプローチとなり得る。

結論として、PEDF が腫瘍血管新生に対して抑制効果を有し、PEDF 遺伝子治療は膵腺癌治療の新しいアプローチとなる可能性を示唆している。

口頭発表において、副査秋田弘俊教授より、①膵癌細胞株が PEDF を発現している意義について、②PEDF 発現膵癌細胞株の治療実験について、③今後の実験の展望について、続いて副査近藤 哲教授より、①膵癌以外の癌患者の血清 PEDF 濃度について、②レンチウイルス投与後の遺伝子発現の継代性について、③臨床応用された場合の投与方法について、主査今村雅寛教授より、①血清 PEDF が高値の患者に対する治療効果について、②他の血管新生阻害因子と PEDF の効果の比較について、③PEDF 発現スクリーニングにおけるウェスタンブロットと RT-PCR の結果の乖離について、最後にフロアの浅香正博教授より、投与方法に関しての質問があったが、いずれの質問に対しても、申請者は主旨をよく理解し自らの研究データと文献的考察を混ぜて適切な回答をした。

膵癌に対する PEDF を用いた血管新生阻害療法に関する本研究の意義は大きく、また PEDF の新しいバイオマーカーとしての臨床的有用性も高く、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せて審査員一同協議の結果、申請者が博士（医学）の学位授与に値するものと判定した。