

計畫編號：DOH89-TD-1133

行政院衛生署八十八年下半年及八十九年度
科技研究發展計畫

利用腺病毒載體攜帶血管靜止蛋白和干擾素 γ 基因治療肺癌

研 究 報 告

執行機構：成大醫學院病理科

計畫主持人：王乃三

研究人員：王乃三、蕭璦莉、吳昭良、蘇五洲、賴吾為、
林芝芸

執行期間：88 年 7 月 1 日至 89 年 12 月 31 日

目 錄

	頁 碼
目錄	1
壹、目次	
一、中文摘要	2
二、英文摘要	4
三、前言	6
四、材料與方法	8
五、結果	13
六、討論	16
七、結論與建議	19
八、參考文獻	20
貳、圖次	
圖一	22
圖二	23
圖三	24
圖四	25
參、表次	
表一	26
	共 26 頁

中文摘要

肺癌為全世界包括台灣地區最嚴重的癌症死亡原因之一，肺癌治療 5 年的存活率只有 10-15%，其預後相當差。國人的肺癌，尤其是女性肺癌，臨床表現以週邊型居多，往往早期便有遠處轉移，而且往往合併有惡性肋膜積水，因此肺癌合併惡性肋膜積水是台灣一個獨特且嚴重的疾病，研究它的成因以及治療方法極為重要，我們希望基因治療來治療此種無法開刀的肺癌病人。在動物實驗顯示以直接注射或用基因治療方式在腫瘤局部產生細胞激素，可以研發強的抗腫瘤免疫作用，有時甚至可以消除已長大的腫塊。由肋膜內點滴法、打入介白素-2，干擾素- γ ，或干擾素- α 蛋白質，對肺癌合併惡性肋膜積水症狀有所改善，顯示免疫基因療法之可行性。腫瘤的生長與轉移均需要靠血管新生的過程才能完成，因此抑制腫瘤的血管新生已經成為治療癌症的策略之一。血管靜止蛋白 (angiostatin) 是 plasminogen 中的 kringle 片段，具有抑制新血管生成的能力。因為腫瘤比起正常上皮細胞有顯著血管新生的現象，因此抑制血管新生的因子，可成為有效治療肺癌的物質。本研究的目的是利用小鼠 Lewis 肺癌細胞株在 C57BL/6 小鼠試驗重組腺病毒攜帶血管靜止蛋白或干擾素- γ 基因之抗腫瘤反應及其作用機制。我們構築了攜帶血管靜止蛋白與干擾素- γ 基因的腺病毒載體，並產生重組腺病毒，將之大量繁殖並定其效價；利用聚合酶連鎖反應與西方點墨法證明血管靜止蛋白基因與蛋白質均在重組腺病毒中存在與表現。攜帶血管靜止蛋白之重組腺病毒可抑制內皮細胞增生與遊走的能力；而在體內試驗中，亦會阻斷雞胚胎絨毛膜上的血管新生。應用在小鼠肺癌的基因治療上，結果顯示帶有血管靜止蛋白基因的重組腺病毒具有部分抑制小鼠肺癌的生長，但帶有干擾素- γ 基因的重組腺病毒則無抑制腫瘤生長的效果。未來我們擬純化病毒，以獲得高效價病

毒，希望改善療效。合併血管靜止蛋白或干擾素- γ 基因之治療、化療、手術或其他基因治療，亦是值得繼續研究的方向。

關鍵詞：基因治療；肺癌；血管靜止蛋白；干擾素- γ ；抗新血管生成；肋膜積水

英文摘要

Lung cancer is the most important cause of cancer death in the world and in Taiwan. In Taiwan adenocarcinoma is the most common type of lung cancer that tends to localize in the periphery of the lung and invade through the pleura to cause pleural effusion at an early stage. Since potentially curative treatments are unavailable, the prognosis of those lung cancer patients with malignant pleural effusion is extremely poor. The pleural involvement of lung cancer is, therefore, a grave problem in Taiwan and studies to dissolve this problem are of urgent importance.

Neovascularization is one of the early and critical steps in tumor growth, invasion, and metastasis. Inhibition of angiogenesis, therefore, is one of the most promising new strategies in cancer therapy. Angiostatin is a potent, naturally occurring inhibitor of angiogenesis and tumor metastasis. On the other hand, intrapleural instillations of recombinant interferon- γ (IFN- γ) have shown some promising results in lung cancer patients with pleural effusion. The anti-tumor effects of IFN- γ may be through its combined immunomodulatory, anti-angiogenic and anti-proliferative activities.

In this study, we explored novel strategies of gene therapies of lung cancers. Lewis lung carcinoma, a spontaneously occurring, poorly immunogenic, tumor derived from C57BL/6 mouse, was used to test the efficacy of recombinant adenoviruses carrying angiostatin and IFN- γ genes. We generated recombinant adenoviruses expressing angiostatin and IFN- γ . The angiostatin cDNA and protein were detected in the viral particles by PCR and western blot analysis, respectively. The proliferation and migration of endothelial cells towards angiogenic factors were inhibited by the viruses. Furthermore, *in vivo* they blocked neovascularization in chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). These recombinant adenoviruses were used

for murine lung cancer therapy. The results showed that recombinant adenoviruses expressing angiostatin partially suppressed tumor growth, whereas those expressing IFN- γ had no effect. To explore the possible additive or synergistic effects, we will analyze the findings of combined gene therapy and chemotherapy, and compare them with that of single modality therapy. The information obtained from studying this murine model will be useful in the planning of clinical trials.

Keywords : gene therapy; lung cancer; angiostatin; interferon- γ ; anti-angiogenesis; pleural effusion

前言

目前肺癌已成為全世界，包括台灣地區，最嚴重的癌症死亡原因之一。以台灣而言，在國人癌症死亡原因中，肺癌僅次於肝癌，居第二位；而在女性方面，最近肺癌已高居癌症死亡原因之首位。肺癌病人在被診斷時，能夠接受開刀治療的只有大約 20%，其中又只有一半可以開刀完全切除腫瘤；而整體肺癌治療 5 年的存活率只有 10-15%。因其預後相當差。國人的肺癌，尤其是女性肺癌，與西方國家比較，具有一些不同的特徵，包括：(1) 肺癌死亡率增加之速度為全世界最快，(2) 女性肺癌死亡率特高，男女比例為 2：1，(3) 肺癌之細胞形態以腺癌為主，尤其是女性肺癌，高達 60% 為腺癌，男性也有 35%，(4) 肺癌臨床表現以週邊型居多，往往早期便有遠處轉移，而且往往合併有惡性肋膜積水，因此肺癌合併惡性肋膜積水是台灣一個獨特且嚴重的疾病，研究它的成因以及治療方法極為重要，我們希望基因治療來治療此種無法開刀的肺癌病人。在動物實驗顯示以直接注射或用基因治療方式在腫瘤局部產生細胞激素，可以研發強的抗腫瘤免疫作用，有時甚至可以消除已長大的腫塊。由肋膜內點滴法、打入介白素-2，干擾素- γ ，或干擾素- α 蛋白質，對肺癌合併惡性肋膜積水症狀有所改善，顯示免疫基因療法之可行性。使用腺病毒當作基因療法傳遞基因之載體的優點包括穩定，可作為生體內直接基因傳遞，且已作為傳遞基因至肺常用之載體，因此直接將攜帶細胞激素基因之腺病毒直接打入肋膜或腫塊內，對於肺癌病人，尤其是合併惡性肋膜積水，為一可行之基因治療方式。在一個早期階段為什麼一些肺腺癌入侵肋膜原因仍未知，然而新血管生成反應決定早期重要的腫瘤成長、侵犯和轉移，取決於血管發生誘導物與抑制劑在微環境中的平衡。新血管生成抑制為近日發展相當有潛力的癌症治療策略，血管靜止蛋白 (angiostatin) 原先由接種 Lewis lung carcinoma 小鼠血清和尿液

分離出一個有效力的抑制新血管生成和腫瘤轉移，小鼠長期以血管靜止蛋白全身系統處置，可以壓制多種腫瘤成長。

干擾素- γ 調節免疫一些方面的反應，包含：自然的殺手(NK)細胞與毒殺T淋巴球(CTL)、主要組織抗原和巨噬細胞的腫瘤細胞毒殺。干擾素- γ 同時也具有抑制細胞分裂及抑制新血管生成，雖然詳細作用機轉不是完全清楚，但抑制細胞分裂及抑制新血管生成的活性是協同的。我們希望發展基因療法新策略治療肺癌合併惡性肋膜積水，本計劃擬利用小鼠 Lewis 肺癌細胞株在 C57BL/6 小鼠試驗重組腺病毒攜帶基因，包括干擾素- γ 及血管靜止蛋白，抗腫瘤之反應及免疫機制。同時也探究可能的添加或者協同作用，我們將分析協同基因療法與化學療法，和比較他們相互之關係。

瞭解肺癌合併惡性肋膜積水之分子生物、細胞生物以及腫瘤免疫及細胞激素基因治療之作用機制有助於我們找到治療之對象基因。我們希望這些研究有助於對此種台灣獨特癌症致病機制之瞭解，也可因此發展一些新的基因治療策略；而利用腺病毒攜帶細胞激素基因作肋膜內注射之療法，也可由動物實驗之成果應用到先期臨床試驗上，期望能對肺癌合併惡性肋膜積水之病人控制及治療有所助益。

材料與方法

構築攜帶 AST (k1-5) 和干擾素- γ cDNA 的腺病毒載體

Ad5L 為一帶有人類腺病毒第五型 (human adenovirus type 5) 部份基因及抗 ampicillin 基因的質體，外來基因則嵌入在其 E1 基因處。AST (k1-5) 為 plasminogen 其內的一段基因，因此由 ATCC 購得之 pRR1/plasminogen 質體，設計 primer，利用 PCR 的方法夾出 AST (k1-5) cDNA。primer 的設計是從 plasminogen kringle domain 1 第一個胺基酸開始設計，並在其前面加上起始密碼 ATG，與一個限制酶 *HindIII* 的位置；而另一條 primer 的設計則是從 plasminogen kringle domain 5 最後一個胺基酸再加上一個停止密碼 TAA，與一個限制酶 *NotI* 的位置。用 PCR 的方法所夾出的 DNA 片段大小約為 1.4 kb，再利用電泳的方法將此片段回收，並用限制酶 *HindIII* 與 *NotI* 切其兩端與 pAd5L 載體，用 DNA 接合酶將 AST (k1-5) cDNA 接到 pAd5L 載體上，即 pAd5L/AST (k1-5)，簡稱為 pAd5L/AST。攜帶干擾素- γ cDNA 的腺病毒載體 pAd5L/IFN- γ 亦利用類似上述方法構築，在我們先前的研究已經得到。

製造重組腺病毒

因 Ad5L 質體中的腺病毒基因並不完整，所以必須藉由另一載體來提供其他的基因。pJM17 是一個含有完整人類腺病毒第五型基因組的載體 (McGrory *et al.*, 1997)，但在複製所需的 E1 基因處，均插入一外來基因，pBR322，使病毒無法複製，所以必須藉由包裝細胞提供病毒的 E1 基因蛋白。利用抽大量質體的方法抽取大量的 pAd5L/AST、pAd5L/IFN- γ 與 pJM17 質體 DNA。分別將 pAd5L/AST、pJM17 與 pAd5L/IFN- γ 、pJM17 利用電穿孔法送到 293 細胞中。經由同源性重組 (homologous recombination)，始能

產生具感染力的重組病毒。我們所選用的包裝細胞為人類 293 細胞株。293 細胞源自於人類胚胎腎臟上皮細胞，由人類腺病毒第五型部份 DNA 所轉形而來 (Graham, *et al.*, 1977)。此細胞株能提供腺病毒複製所必需的 E1 基因產物，進而使病毒複製，產生所要的重組病毒。觀察 293 細胞的 CPE (cytopathic effect) 變化，待約 30~50%細胞有 CPE 的現象時，其內即含有重組腺病毒，用刮勺刮下培養皿上的細胞，將其與培養液在 4°C，離心 3000 rpm，吸取上清液繼續感染細胞以製造出更多的重組腺病毒 Ad/AST 與 Ad/IFN- γ 。

重組腺病毒的定量 (titration)：

將 293 細胞 (2×10^5 cells/well) 置於 24 孔培養皿中培養，待細胞長至九分滿後，以十倍序列稀釋的病毒懸浮液做感染 (200 μ l /well)。置於培養箱中 2 小時後，吸掉病毒液，加入 1.5 ml 溫的 methyl cellulose overlay 繼續培養。約十天後，吸掉培養液，每孔加入 200 μ l 的染劑 (crystal violet, 0.05% ; formalin, 10%) 染 20 分鐘後，以自來水將多餘的染劑洗淨，計算所形成病毒斑的數目，並換算成病毒原液 1ml 所含之病毒斑數目，即得 plaque-forming unit (PFU/ml)。

哺乳動物細胞 DNA 的抽取

哺乳動物細胞 DNA 的抽取首先準備九分滿的細胞，細胞以 trypsin 打下之後，以 PBS 清洗一次，加入 1.5 ml tail buffer (0.3 M sodium-acetate、10 mM Tris-HCl、1mM EDTA、1% SDS) 將細胞打破，使細胞的 chromosome DNA 能夠被釋放出來。之後取出 750 μ l 萃取液至新的 1.5 ml 微量離心管，再加入 150 μ l 2 mg/ml protease K 於 37°C 作用，隔天加入 750 μ l PCA (phenol : chloroform : isoamylalcohol = 25 : 24 : 1)，混合均勻後，以 14000 $\times$ g 離心 10 分鐘，取上清液至新的 1.5 ml 微量離心管中，加入 750 μ l CA

(chloroform : isoamylalcohol = 24 : 1)，均勻混合後，同樣以 14000 x g 離心 10 分鐘後，取出上清液。重複同樣動作之後，將上層液體加入 1/30 體積的 0.3 M sodium acetate，之後再加入 775 μ l isopropanol，於 4°C 14000 x g 離心 10 分鐘後，以 75% 酒精清洗 chromosomal DNA 沈澱物。接著以真空幫浦將酒精抽乾，最後再以無菌水將 DNA 溶解，並將 DNA 儲存於 -20°C 下。

抽取病毒 DNA 的方法

取 200 μ l 高效價的病毒液，加入 20 μ l proteinase K (20 mg/ml) 在 55°C 水浴 1 小時，再用 100°C 的水煮 5 分鐘，然後再 13000 轉離心 30 秒將管壁上的水蒸氣離心下來。將離心下的病毒液加入 3 μ l NaOAc (3 M, pH 4.8)、66 μ l 100 % 酒精與 1 μ l glycogen (20 μ g/ μ l) 混合後置於 -70°C 中 10 分鐘，之後在 4°C、13000 轉，離心 10 分鐘。離心後，倒掉上清液加入 70 % 的酒精 200 μ l 清洗兩次，最後用 100 % 的酒精清洗一次，最後真空抽乾，以無菌水溶解質體 DNA，貯存在 -20°C。

聚合酶連鎖反應 (PCR)

為了證明所作出的重組腺病毒的確帶有 AST 的基因，可以利用 PCR 的方法證明此二基因存在病毒的 DNA 中。可以抽取病毒 DNA 或被病毒感染的細胞 DNA，將此兩種 DNA 當作 PCR 中的模板，利用 AST 的特異性引子 (primer) 進行 PCR。

西方點墨法 (Western blot)

為了證明所做出的 Ad/AST 與 Ad/TSP-1 是否能在細胞內表現出 AST 蛋白質，因此我們做了 Western blot 來證明。所用的樣本為病毒感染 293 細胞，產生 CPE 之後所收下來的病毒液，將病毒液內的蛋白質煮沸後便可作 Western blot。用來偵測 AST 蛋白質的一級抗體為 rabbit polyclonal anti-angiostatin antibody，由成大醫學院生化所林銘德教授所提供。

細胞增生分析 (Cell proliferation assay)

此方法是利用 WST-1 來作分析，其作用原理如下：淡紅色的 WST-1 經過活體細胞內的電子傳遞鏈作用，會被轉變成暗紅色的 formazan，再利用 ELISA reader 測其 OD450 的吸光值，由值的高低可以判斷活細胞的多少。利用 96 well-plate 做實驗，分成 medium、bFGF (10 ng)、Ad/AST 與 Ad/LacZ (作為對照組) 五組，加入 10^4 /well HMEC-1 細胞，每組做六個重複，並將 plate 放於 37°C 細胞培養箱中培養，隔天吸掉細胞的上清液，加入病毒液控制其 M.O.I.=100/well，最後將每個 well 中的體積補到 100 μ l/well，放於 37°C 細胞培養箱中培養。培養到第 3 天便取出 plate，於每個 well 中加入 10 μ l 的 WST-1 solution (Takara)，並用鋁箔紙包住避光，放於 37°C 細胞培養箱中培養 2 小時，而後取出在 OD450/595 測其吸光值。

Chemotaxis assay

病毒感染內皮細胞的上清液：將 M.O.I.=100 的病毒液感染內皮細胞，三天後內皮細胞出現 CPE，即可收集上清液。上層溶液：內皮細胞+病毒感染內皮細胞的上清液；下層溶液：含有 10 ng/ml bFGF 的 serum-free medium；染劑：Giemsa solution (2 ml; Merck) 加水 20 ml。此方法是根據 Castellot 等人(1982)所發表的方法再加以修飾而成的。將數張濾膜(8 μ m; Neuro Probe, Inc.)浸泡於 3% acetic acid solution 中隔夜，隔天將濾膜取出風乾，而後再浸泡於 100 μ g/ml 的 gelatin solution 中 2 hr，取出濾膜風乾即可，此處理過的濾膜可以於室溫中放置 1 個月。將內皮細胞用 trypsin 打下，加入含有 serum 的 medium，4°C 下離心 5min，吸掉上清液加入 serum-free medium，4°C 下離心 5min，吸掉上清液，加入 1ml serum-free medium，算細胞，每個 well 所需的細胞濃度為 2×10^5 cells。下層溶液：取兩個 eppendorf 各裝 1ml serum-free medium，並加入 10 μ g/ml 的 bFGF 1 λ ，使最終濃度為 10 ng/ml。上層則為內皮細胞加病毒感染內皮細胞的上清液，各樣本做六個

重複。首先加入 32 μl /well 下層溶液到 Boyden chamber 下層的 well 中，而後覆上濾膜，裝置好 Boyden chamber 後，加入 52 μl /well 上層的溶液。完成後用保鮮膜包住整個 Boyden chamber 並放置於 37°C 細胞培養箱中，培養 6 小時。6 小時後，取出濾膜，將其下方朝下浸於 methanol 中 8 min，而後取出濾膜風乾，風乾後再將濾膜下方朝下，置於染劑中染色 1 小時。染色後，將濾膜置於清水中洗一下而後風乾，取棉花沾水拭去濾膜上層未 migration 到下層的細胞。將做好的濾膜置於玻片上，到顯微鏡下用 100 x 算視野下的細胞數。

CAM assay

CAM 是指雞胚胎的絨毛膜(chorioallantoic membrane; CAM)，此方法是利用已受精的雞胚胎做體內試驗，因為雞胚胎在受精後的初期，其血管新生的情形非常旺盛，因此藉以模擬腫瘤刺激血管新生的情形 (Parsons-Wingerter *et al.*, 1998; Shing *et al.*, 1985)。

方法一：

將受精後第六天 (E6) 的雞胚胎做個假氣室 (air sac)，使原本在鈍端的氣室移至中央部位，並在假氣室中注入 2×10^7 PFU 病毒液，而後用指甲油封口再置回 37°C 培養箱中，培養至隔天即可直接觀察其血管新生的情形。

方法二：

將受精後第三天(E3)的雞胚胎置於 10 公分的培養皿中，並置於 37°C 培養箱中培養直到受精後第七天(E7)，此時可以打開培養皿注入 2×10^7 PFU 病毒液於雞胚胎中，並繼續培養至隔天即可直接觀察其血管新生的情形。

結果

構築表現血管靜止蛋白之腺病毒載體 Ad/AST

plasminogen 內的 kringle domain 有五個，最近研究指出含 kringle 5 或 kringle 1-5 片段之蛋白質同樣具有抑制血管新生的能力，且其活性比 angiostatin (即 kringle 1-4) 強，因此在本計畫實驗的設計上我們使用的片段為 kringle 1-5，和目前已發表之 angiostatin 基因治療所用的基因有所不同。我們已完成攜帶 kringle 1-5 之病毒載體 pAd/AST 之構築。另外先前我們已經構築了表現 interferon- γ 腺病毒載體 pAd/IFN- γ ；本研究中亦構築另一個可表現 thrombospondin-1 (亦有抑制血管新生的性質) 之重組腺病毒 Ad/TSP-1。

製造表現血管靜止蛋白及干擾素- γ 之重組腺病毒

將此等腺病毒載體和帶有 E1 基因缺失的腺病毒基因體之質體共同轉染至包裝細胞 293 細胞株 (提供 E1 基因產物)，在 293 細胞內經同源重組，製造出表現不同 transgene 產物之重組腺病毒，並經分離病毒斑 (plaque)，再逐步繁殖，以病毒斑測定法，測得病毒力價，以 plaque-forming unit (PFU)/ml 表示之。此等病毒並繼續大量繁殖，提供小鼠肺癌基因治療用。

重組腺病毒之特性分析

用 PCR 方法測到 Ad/AST 病毒帶有血管靜止蛋白基因 (Fig. 1A)；接著更進一步利用 Western blotting 方法測 Ad/AST 病毒可表現血管靜止蛋白 (Fig. 1B)。

血管靜止蛋白活性之分析

1. 抑制內皮細胞之增生 (proliferation) 及游走 (migration)

血管主要是由內皮細胞所組成的，而一條新的血管要形成的過程主要有三個步驟：1. 分泌蛋白酶 (protease)：將原有血管周圍的組織破壞掉；2. 內皮細胞的增生 (proliferation)；3. 內皮細胞的游走 (migration)。即當有血管新生的過程

中，會看到內皮細胞有增生與游走這兩種特性，因此可以利用此兩種特性來分析 Ad/AST 重組腺病毒是否會抑制此兩種特性，即是否會抑制新血管的生成。我們用 WST-1 與 Boyden chamber 來作內皮細胞增生與遊走的實驗。Ad/AST 和 Ad/TSP 重組腺病毒可抑制經 basic fibroblast growth factor(bFGF) 刺激之內皮細胞其增生 (Fig. 2) 及游走 (Fig. 3) 現象。

2. CAM (chorioallantoic membrane)分析

受精雞胚胎在發育的初期，其 CAM 具有旺盛的血管新生現象，因此是作血管新生分析理想的體內模式。將病毒液直接加入雞胚胎中隔天觀察其血管新生的情形。結果顯示：受到 Ad/AST 或 Ad/TSP-1 重組腺病毒感染的雞胚胎其血管新生的能力被明顯的抑制 (Fig. 4)；由 Table 1 的統計中，以同樣病毒的劑量給予雞胚胎 Ad/AST 或 Ad/TSP-1 比起對照組 Ad/LacZ (重組腺病毒表現 β -galactosidase) 具有明顯抑制雞胚胎血管新生的能力，即抑制血管新生的因子是 AST 並非腺病毒本身的影響。

建立小鼠肺癌模式

目前我們已建立 Lewis lung carcinoma (LL-2) 在 syngeneic C57BL/6 小鼠皮下肺癌模式，以 2×10^5 或 4×10^5 之 LL-2 細胞皮下注射入六至八週 C57BL/6 小鼠，約一週可見腫瘤的產生，至三週腫瘤長至 250 - 500 mm³，腫瘤發生率達 80 % 至 100 %。我們亦將 LL-2 細胞 intrapleural 接種至小鼠，雖然小鼠肺部可發現腫瘤，但卻不能產生肋膜積水(pleural effusion)；我們也曾嘗試人類肺腺癌細胞株接種至 SCID 小鼠，雖可產生腫瘤，但亦不能產生肋膜積水。

利用皮下肺癌模式進行攜帶血管靜止蛋白或干擾素- γ 基因治療

1. 以 Ad/AST anti-angiogenic strategy 進行基因治療

以 5×10^5 LL-2 細胞接種 C57BL/6 小鼠皮下，在第 2, 3, 4 天 intratumor

接種 4×10^6 PFU 之 Ad/AST、Ad/TSP-1、Ad/LacZ 或 medium，結果發現經 Ad/AST 或 Ad/TSP-1 治療之小鼠，腫瘤有中央壞死(central necrosis)現象發生，而對照組甚少發生。Ad/AST 治療之小鼠其腫瘤平均大小比對照組小(在所有小鼠仍存活時計算)，但其差別無統計學意義，因為腫瘤大小個別差異大；而在存活時間方面，開始死亡時間 Ad/AST 治療之小鼠比 medium 處理之小鼠約晚二週，而比 Ad/LacZ 處理之小鼠約晚五天；在存活率方面，至 60 天時，Ad/AST 治療之小鼠為 44.4%，medium 處理之小鼠為 20%，Ad/LacZ 處理之小鼠為 60%。

2. 以 Ad/IFN- γ 等 cytokine 進行基因治療

以 Ad/IFN- γ 在上述之小鼠肺癌模式中，並無療效。我們另外利用表現 interleukin-12 (IL-12) 之重組腺病毒 Ad/IL-12 進行實驗，因為 IL-12 可誘發 IFN- γ 的產生，且其抗腫瘤及免疫增強活性比 IFN- γ 強。我們發現 Ad/IL-12 合併 cisplatin 或手術切除可有效地抑制小鼠肺癌。

討論

目前臨床上治療腫瘤的方法不外乎手術切除、放射線治療以及全身性的化學療法，而藉由增強患者本身的免疫系統的功能來對抗腫瘤的免疫療法也逐漸被採用，不過最近利用阻斷腫瘤內新血管的生成亦成為治療腫瘤的策略之一。在腫瘤生長的過程中，會伴隨著血管的新生，以提供腫瘤細胞生長所需的養分，因此阻斷提供養分給腫瘤的血管，成為近幾年來治療腫瘤的新方向 (Folkman, 1971)。然而新血管生成反應決定於血管發生誘導物與抑制劑在微環境中的平衡 (Hanahan and Folkman, 1996)。

在 1994 年，O'Reilly 與 Folkman 等人 (O'Reilly *et al.*, 1994) 從患有 Lewis lung carcinoma 小鼠的血清與尿液中分離出一個 38 kDa 蛋白質，其構造為 plasminogen 中的 kringle 1-4 片段，此蛋白質被命名為 angiostatin，可以有效的抑制血管的新生與腫瘤的轉移，小鼠長期以血管靜止蛋白全身系統處置，可以壓制多種腫瘤成長。plasminogen 中共有 5 個 kringle domain，其中 kringle 5 domain 已被證明出可以有效的抑制內皮細胞的增生與游走，且 k1-5 domain 比 k1-4 domain 抑制內皮細胞增生的效果更強 (Ji *et al.*, 1998; Cao *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 1999)。近年來科學家們對 angiostatin 抑制腫瘤生長的情形很感興趣，過去的研究中指出：利用 baculovirus 做出重組小鼠 angiostatin 蛋白質可以抑制內皮細胞 bovine aortic endothelial cells 的增生與小鼠 Lewis lung carcinoma 的生長 (Wu *et al.*, 1997)；在 '98 年有科學家開始利用 angiostatin 進行腫瘤的基因治療。他們利用複製缺陷的腺病毒載體攜帶 angiostatin k3 domain 對 C6 glioma 與 MDA-MB-231 breast cancer 進行基因治療。結果顯示：利用腺病毒攜帶 angiostatin k3 可以促使腫瘤細胞 apoptosis，且可以延遲 C6 glioma 腫瘤的發生與生長 (Griscelli *et al.*, 1998)。另一研究是利用腺病毒與反轉錄病毒攜帶 angiostatin k1-4 治療 malignant glioma，結果此兩種重組病

毒皆可以抑制腫瘤內的血管新生，進而抑制腫瘤的生長 (Tanaka *et al.*, 1998)。由於最近的研究顯示：plasminogen 中 k1-5 domain 為較有效的血管新生抑制因子，因此在實驗的設計上我們以 plasminogen 中 k1-5 domain 為抑制血管新生的材料之一，利用腺病毒攜帶 plasminogen k1-5 片段進行小鼠膀胱癌的基因治療。

利用腺病毒攜帶外來的基因到哺乳類細胞表現有幾項優點：包括可以選用多種啟動子來啟動基因的表現；比較穩定，再活體外製備時可以得到較高的效價；腺病毒可以感染複製中或非複製狀態的細胞，且當病毒感染寄主細胞後不會嵌入寄主的基因中，而是以游離基因 (episome) 的形式存在細胞中 (McGrory *et al.*, 1997)。在本實驗中所做出的重組腺病毒其效價約 10^7 - 10^8 PFU 左右，但若經純化後其效價可達到 10^{12} PFU。腺病毒為傳遞基因至肺常用之載體，因此直接將攜帶細胞激素基因之腺病毒直接打入肋膜或腫塊內，對於肺癌病人，尤其是合併惡性肋膜積水，為一可行之基因治療方式。在一個早期階段為什麼一些肺腺癌入侵肋膜原因仍未知，然而新血管生成反應決定早期重要的腫瘤成長、侵犯和轉移，取決於血管發生誘導物與抑制劑在微環境中的平衡，新血管生成抑制為近日發展相當有潛力的癌症治療策略。

在動物實驗方面，目前我們已建立 Lewis lung carcinoma (LL-2) 在 syngeneic C57BL/6 小鼠皮下肺癌模式；我們亦將 LL-2 細胞 intrapleural 接種至小鼠，雖然小鼠肺部可發現腫瘤，但卻不能產生肋膜積水。以人類肺腺癌細胞株接種至 SCID 小鼠，雖可產生腫瘤，但亦不能產生肋膜積水。目前我們擬利用 LL-2 cell 在 C57BL/6 小鼠 pleural space 經數次繼代，相信可以篩選出會產生肋膜積水之 Lewis lung carcinoma subline，此法是參考 Dr. I. J. Fidler (University of Texas M.D. Anderson Cancer Center) 建立人類肺腺癌細胞株 PC14PE6 在裸鼠產生肺癌合併肋膜積水之動物模式。另外 Dr. Fidler 已答應

提供人類肺腺癌 PC14PE6 細胞株，能在 SCID 小鼠產生肋膜積水，將可提供 orthotopic 小鼠肺癌合併惡性肋膜積水動物模式。

由本研究結果，Ad/AST 治療效果並不令人滿意，可能因治療劑量太低以及 Lewis lung tumor 之致癌性太高之故，因而只得到部分治療效果。目前我們大量繁殖病毒，以 CsCl gradient 超高速離心方法，純化病毒，以獲得高效價病毒，希望改善療效。合併化療、手術或其他基因治療，亦是接著我們擬進行之研究。

總之，在本研究中我們製造了重組腺病毒 Ad/AST，在體外試驗，Ad/AST 均能抑制內皮細胞的增生與游走的能力；且可以抑制雞胚胎絨毛膜上的血管新生。將重組腺病毒應用在小鼠肺癌的基因治療上，Ad/AST 只能部分抑制腫瘤的生長，其治療效果不強。以 Ad/IFN- γ 在小鼠肺癌模式中，並無療效。但是我們另外利用表現 interleukin-12 (IL-12) 之重組腺病毒 Ad/IL-12 進行實驗，其理由為 IL-12 可誘發 IFN- γ 的產生，且其抗腫瘤及免疫增強活性比 IFN- γ 強。我們發現 Ad/IL-12 合併 cisplatin 或手術切除可有效地抑制小鼠肺癌。未來我們擬純化病毒，以獲得高效價病毒，希望改善療效。合併 Ad/AST 和 Ad/IFN- γ 之基因治療、化療、手術或其他基因治療，亦是值得繼續研究的方向。

結論與建議

本計畫利用小鼠 Lewis 肺癌細胞株在 C57BL/6 小鼠試驗重組腺病毒攜帶血管靜止蛋白或干擾素- γ 基因之抗腫瘤反應及其作用機制。結果顯示帶有血管靜止蛋白基因的重組腺病毒具有部分抑制小鼠肺癌的生長，但帶有干擾素- γ 基因的重組腺病毒則無抑制腫瘤生長的效果。未來我們擬純化病毒，以獲得高效價病毒，希望改善療效。合併血管靜止蛋白或干擾素- γ 基因之治療、化療、手術或其他基因治療，亦是值得繼續研究的方向。

参考文献

- Cao R, Wu HL, Veitonmaki N, Linden P, Farnebo J, Shi GY, Cao Y: Suppression of angiogenesis and tumor growth by the inhibitor K1-5 generated by plasmin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:5728-5733.
- Folkman J: Tumor angiogenesis: therapeutic implication. *N Engl J Med* 1971; 185:1182-1186.
- Graham, FL, Smiley J, Russell WC, Nairin R: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36:59-72.
- Griscelli F, Li H, Bennaceur-Griscelli A, Soria J, Opolon P, Soria C, Perricaudet M, Yeh P, Lu H: Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth in vivo by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6367-72.
- Hanahan D, Folkman J: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-364.
- Ji WR, Barrientos LG, Llinas M, Gray H, Villarreal X, DeFord ME, Castellino FJ, Kramer RA, Trail PA: Selective inhibition by kringle 5 of human plasminogen on endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Com* 1998; 247:414-419.
- Lu H, Dhanabal M, Volk R, Waterman MJ, Ramchandran R, Knebelmann B, Segal M, Sukhatme VP: Kringle 5 causes cell cycle arrest and apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com* 1999; 258:668-673.
- McGrory WJ, Bautista DS, Graham FL: A simple technique for the rescue of early region 1 mutations into infectious human adenovirus type 5. *Virology* 1997; 163:614-617.
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J: Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that

mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79:315-328.

Parsons-Wingerter P, Lwai B, Yang MC, Elliott KE, Milaninia A, Redlitz A, Clark JI, Sage EH: A novel assay of angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane: stimulation by bFGF and inhibition by angiostatin according to fractal dimension and grid intersection. *Microvas Res* 1998; 55:201-214.

Shing Y, Folkman J, Haudenschild C, Lund D, Crum R, Klagsbrun M: Angiogenesis is stimulated by a tumor-derived endothelial cells growth factor. *J Cell Biochem* 1985; 29:275-287.

Tanaka T, Cao Y, Folkman J, Fine HA: Viral vector-targeted antiangiogenic gene therapy utilizing an angiostatin complementary DNA. *Cancer Res* 1998; 58:3362-3369.

Wu Z, O'Reilly MS, Folkman J, Shing Y: Suppression of tumor growth with recombinant murine angiostatin. *Biochem Biophys Res Com* 1997; 236:651-654.

Zetter BR: Angiogenesis and tumor metastasis. *Ann Rev Med* 1998; 49:407-424.

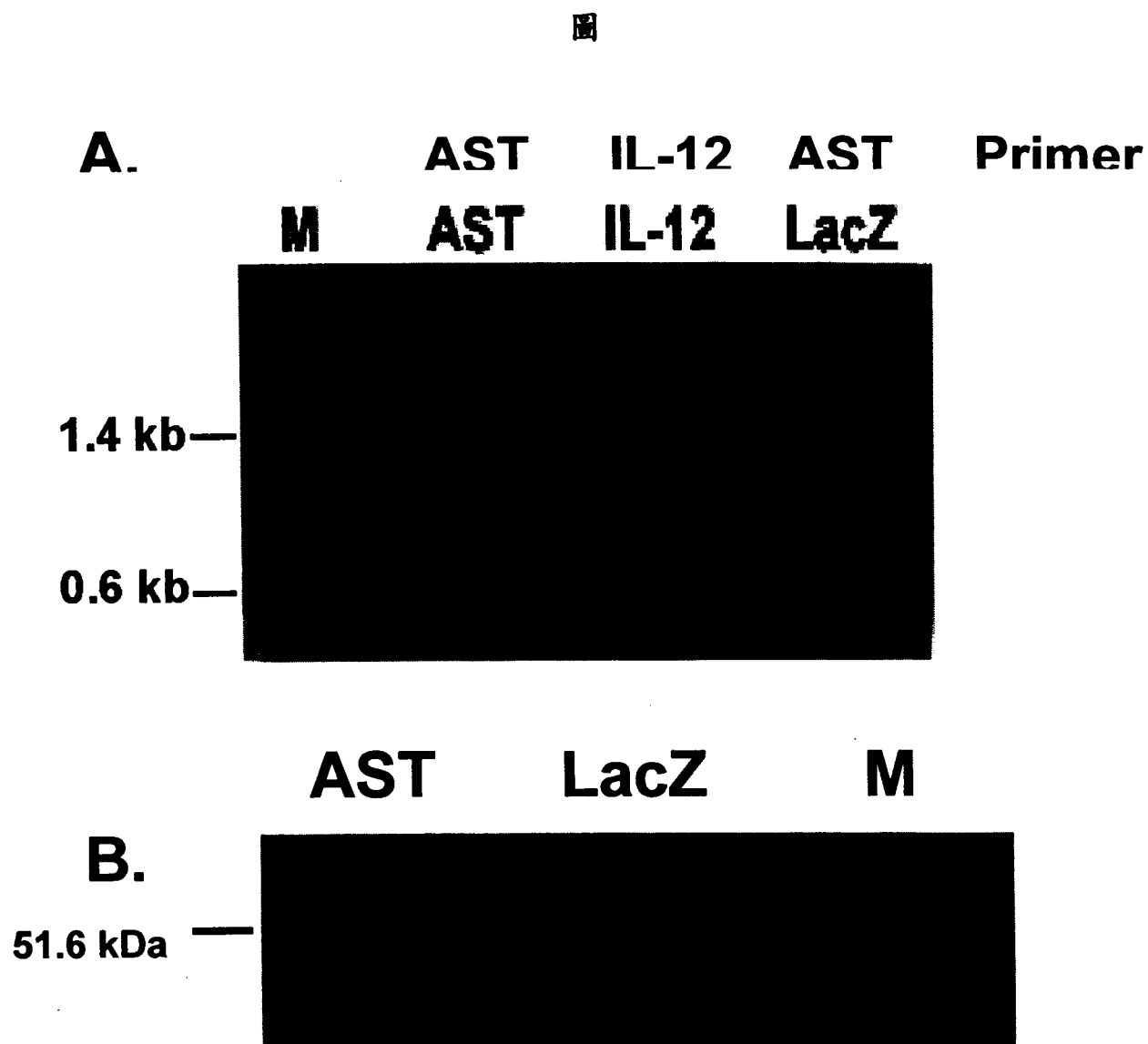


Fig. 1. The PCR analysis and western blot analysis of recombinant Ads. A. PCR analysis of Ad DNA. IL-12: using IL-12-specific primers; LacZ: using AST primer. B. Western blot analysis of recombinant Ad supernatants probed with rabbit anti-AST antiserum.

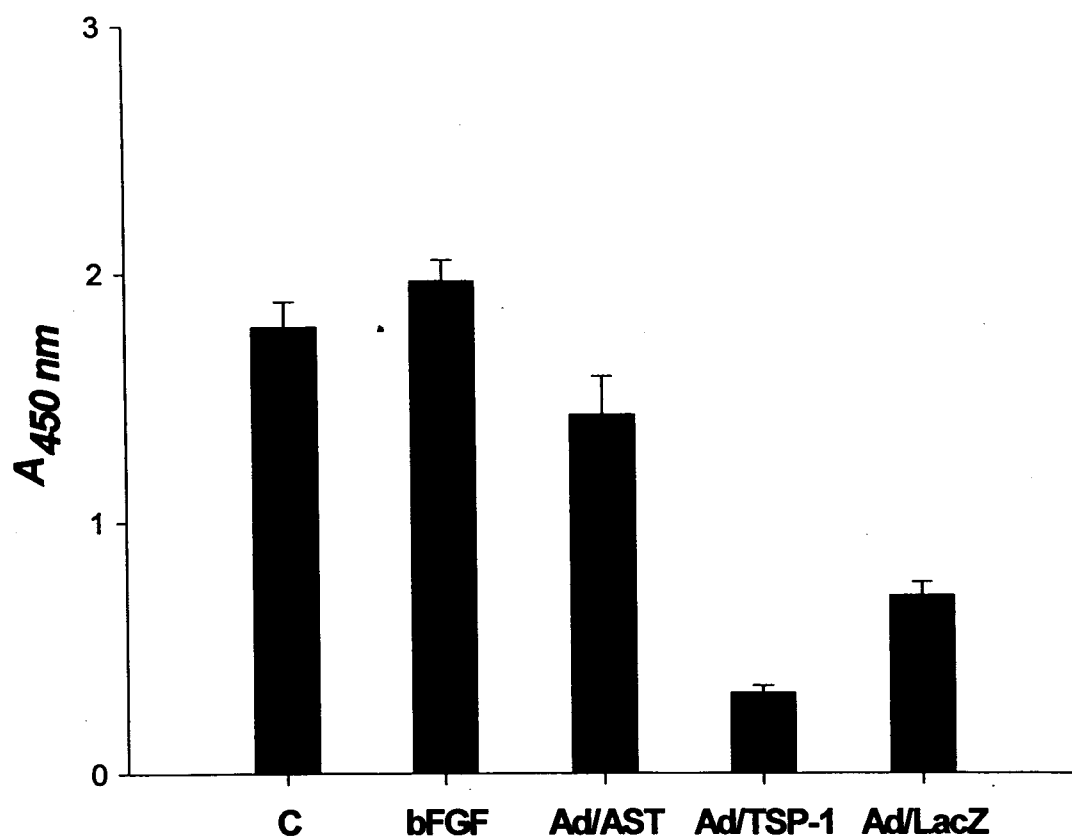


Fig. 2. Proliferation assay of human microvascular endothelial cells (HMEC-1) infected with recombinant Ads. Ad/AST, Ad/TSP-1 and Ad/LacZ can inhibit endothelial cell proliferation effectively.

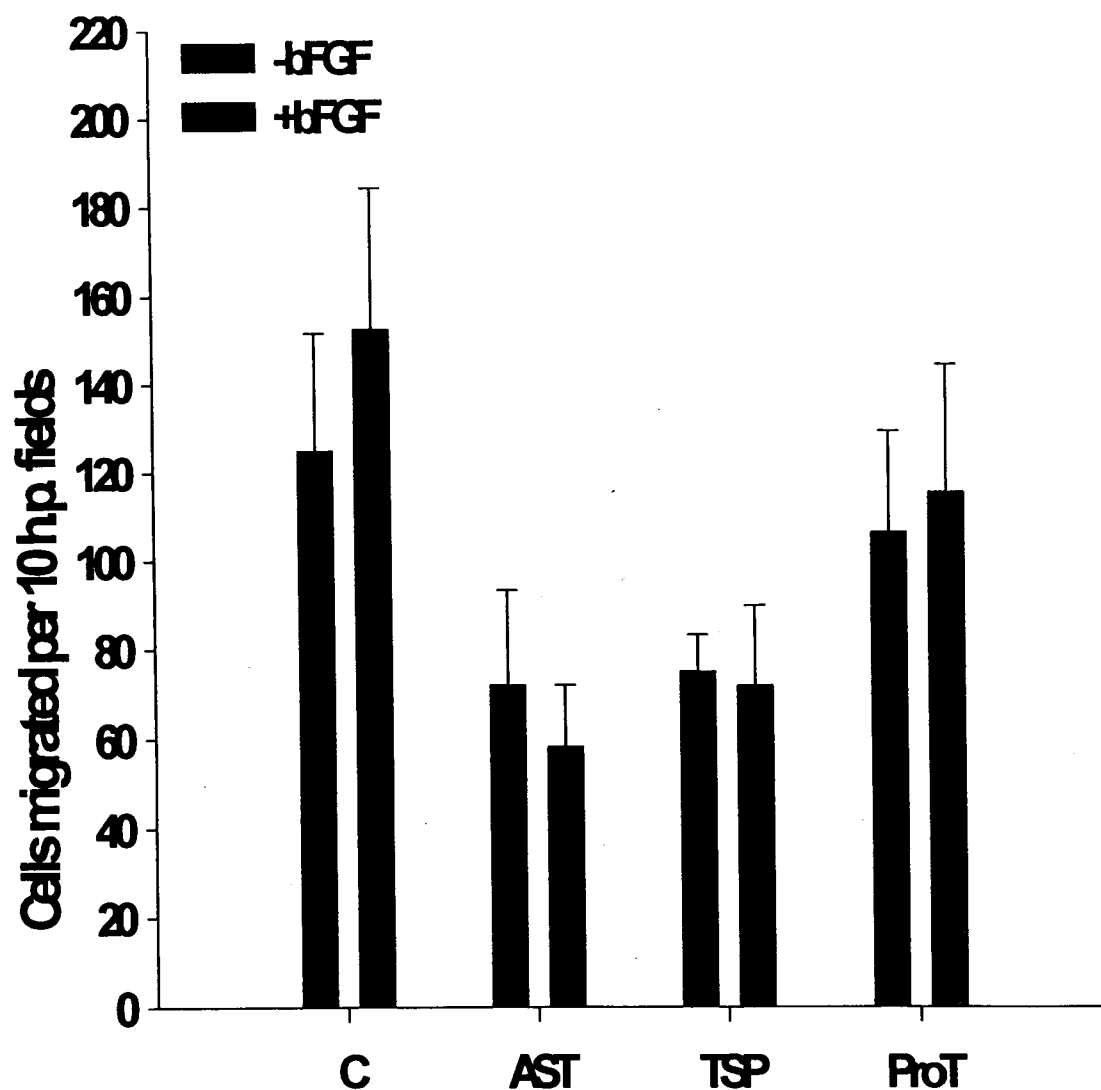
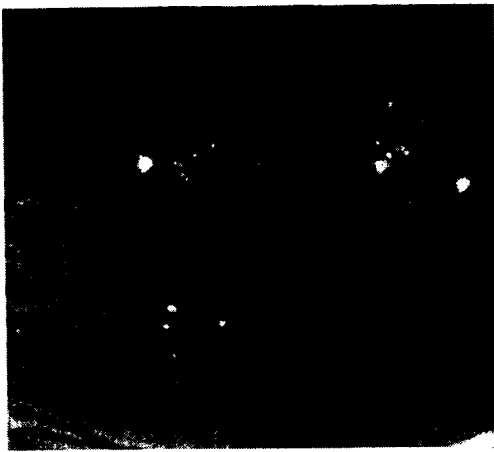


Fig. 3. Migration assay of HMEC-1 cells using a Boyden chamber. Cells migrating through the filter during a 6-h incubation were stained and counted. HMEC-1 cells towards bFGF were inhibited by Ad/AST and Ad/TSP-1, but not by Ad/ProT expressing prothymosin α serving as a negative control.



A: Ad/AST
C: Ad/LacZ

B: Ad/TSP-1
D: PBS

Fig. 4. CAM assay of recombinant Ads. CAMS of 6-day chicken embryos were treated with 2×10^7 PFU of various recombinant Ad or PBS. After 24 hr, the CAMs were photographed.

表

Table 1. Inhibition of angiogenesis by recombinant Ads in CAM assay.

Additions to CAM	Dose	Negative CAM/Total CAM
Ad/AST	2×10^7	4/6
Ad/TSP-1	2×10^7	3/6
Ad/LacZ	2×10^7	1/6
PBS	1 ml	0/5

CAMs of 6-day chicken embryo were treated with various recombinant adenoviruses or with PBS. The inhibition of neovascularization was observed after 24 hr and scored as a negative response.