

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

合併 interleukin-12 及 interleukin-18 為基礎之免疫基因
療法及抗血管生成基因療法對於大鼠神經膠質瘤的療效

(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2314-B-002-253-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院外科

計畫主持人：曾勝弘

共同主持人：林瑞明

計畫參與人員：陳佳康

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 5 月 20 日

中文摘要

關鍵詞: 神經膠質瘤、免疫基因療法、抗血管生成基因療法、interleukin-12、interleukin-18、endostatin、腺病毒載體

本研究計畫為三年計畫，主要在探討IL-12及IL-18免疫基因療法，以及抗血管生成基因療法等不同作用機轉的組合基因療法對於神經膠質瘤的療效。我們建立多種重組腺病毒，包括Ad/IL-12、Ad/IL-18、Ad/Endo，其titer在 10^{11} - 10^{12} pfu。接著進行動物實驗，以這些重組腺病毒，單獨或合併，來治療腦瘤，結果發現對照組及Ad/IL-18組大鼠全部死亡，Ad/IL-12組有50%存活率，Ad/ME組有30%存活率，Ad/IL-12+Ad/IL-18有50%存活率，Ad/IL-12+Ad/ME有70%存活率，Ad/IL-18+Ad/ME有30%存活率，Ad/IL-12+Ad/IL-18+Ad/ME有70%存活率。Ad/IL-12、Ad/IL-12+Ad/IL-18、Ad/IL-12+Ad/ME、Ad/IL-12+Ad/IL-18+Ad/ME組都比對照組存活率高($P < 0.05$)；但Ad/IL-18、Ad/ME、Ad/IL-18+Ad/ME組則與對照組存活率沒有差別($P > 0.05$)；此外，Ad/IL-12+Ad/IL-18+Ad/ME組比Ad/IL-18、Ad/ME、Ad/IL-18+Ad/ME組存活率高($P < 0.05$)，但與Ad/IL-12、Ad/IL-12+Ad/IL-18、Ad/IL-12+Ad/ME則無差別($P > 0.05$)。這結果證明單獨以Ad/IL-12治療對於腦部神經膠質瘤有療效，但單獨以Ad/IL-18治療則沒有療效，合併二者並無加成效果。此外，合併Ad/IL-12及Ad/ME則有加成效果，但再加上Ad/IL-18則亦未能提高療效。

英文摘要

關鍵詞 (Keywords): glioma, immunogene therapy, anti-angiogenesis gene therapy, interleukin-12, interleukin-18, endostatin, adenoviral vector

This 3-year project is intended to investigate the effects of combined interleukin-12 (IL-12)- and IL-18-based gene therapy and anti-angiogenesis gene therapy on the intracerebral gliomas in rats. We constructed several recombinant adenoviral vectors, including Ad/IL-12, Ad/IL-18, Ad/Endo, with the titers in the range of 10^{11} to 10^{12} pfu. Then these adenoviral vectors were used to treat the intracerebral gliomas. All the control rats and the rats treated with Ad/IL-18 died. By contrast, the survival rate of the rats treated with Ad/IL-12 was 50%, Ad/ME was 30%, Ad/IL-12+Ad/IL-18 was 50%, Ad/IL-12+Ad/ME was 70%, Ad/IL-18+Ad/ME was 30%, and Ad/IL-12+Ad/IL-18+Ad/ME was 70%. The Ad/IL-12, Ad/IL-12+Ad/IL-18, Ad/IL-12+Ad/ME, and Ad/IL-12+Ad/IL-18+Ad/ME groups had higher survival rate than the control groups ($P < 0.05$). However, the Ad/IL-18, Ad/ME, Ad/IL-18+ Ad/ME groups showed no significant difference from the control groups ($P > 0.05$). on the other hand, Ad/IL-12+Ad/IL-18+Ad/ME group had higher survival rate than Ad/IL-18, Ad/ME, or Ad/IL-18+Ad/ME groups ($P < 0.05$), but showed no difference from the Ad/IL-12, Ad/IL-12+Ad/IL-18, or Ad/IL-12+Ad/ME groups ($P > 0.05$). The results indicated that Ad/IL-12 alone was effective for the treatment of intracerebral gliomas, by contrast, Ad/IL-18 had no therapeutic effect on the glioma. Combined Ad/IL-12 and Ad/IL-18 showed no synergistic effects. Combined Ad/IL-12 and Ad/ME shoed synergistic effects on the intracerebral gliomas, however, addition of Ad/IL-18 did not enhance the therapeutic effects.

報告內容

一、前言

在所有腦瘤中，神經膠質瘤(glioma)是最常見的原發性腦瘤，約佔全部腦瘤的 50%。神經膠質瘤的預後相當不好，例如神經膠質瘤中最惡性的多形神經膠母細胞瘤(glioblastoma multiforme)的中位數存活時間(medium survival time)短於一年，五年存活率只有約 5% [44]，所以大家都不斷的努力研發更有效的治療方法。

免疫缺乏(immunodeficiency)現象是普遍存在於腦部神經膠質瘤病人[5,25]，而且這種免疫缺乏現象通常和 tumor progression 及 recurrence 一起存在[1]，由於惡性腦瘤病人免疫功能較差，所以以免疫療法(immunotherapy)來提高病人的免疫力，進而將腫瘤清除，是一個可能可行的方法。欲提高抗腫瘤免疫反應必須克服腫瘤的免疫抑制作用，利用抗原、major histocompatibility complex (MHC)、T 細胞、合作刺激分子(costimulatory molecule)、及 CD28 等的交互作用及免疫反應，刺激 T 細胞，尤其是 cytotoxic T lymphocytes (CTLs)的激發在宿主的抗腫瘤作用中扮演重要的角色[57]。事實上，近年來的研究發現分泌細胞素的腫瘤疫苗(tumor vaccine)對於腦部腫瘤有抗腫瘤作用[42,46,55,62]，不過腫瘤疫苗的抗腫瘤作用的強弱與不同種類腦瘤的特性、腫瘤大小、細胞素的種類及劑量、腫瘤存在的時間長短、腫瘤疫苗的投予途徑等等因素有關[42,46,55,62]。過去我們的研究也發現帶有細胞素基因(IL-2、IL-4、或 GM-CSF)的腦瘤細胞在腦部的腫瘤發生率(tumorigenicity)降低，而且可以刺激產生長期抗腫瘤之免疫反應；三種細胞素中以 GM-CSF 的作用最強[55]，因為 GM-CSF 的作用最強，所以我們以帶有 GM-CSF 的腦瘤細胞作為腫瘤疫苗來治療腦部的神經膠質瘤，結果發現分泌 GM-CSF 的腫瘤疫苗對於較小腦瘤有療效，但對於較大腦瘤則效果不佳[54]，因此有關惡性腦瘤的基因治療仍有待繼續努力。

二、研究目的

我們實驗室投入基因療法的研究已有數年，研究方向包括細胞素基因療法[8,54,55]、合作刺激分子(costimulatory molecule)基因療法、抗血管生成基因療法。在本研究計畫中，我們擬探討 IL-12 及 IL-18 免疫療法，以及抗血管生成基因療法等不同作用機轉的組合基因療法對於神經膠質瘤的療效。目前文獻上探討合併 IL-12 及 IL-18 二種細胞素或基因療法來治療惡性腫瘤的研究很少，合併 IL-12、IL-18 基因療法及抗血管生成基因療法更少。我們將以腺病毒攜帶 IL-12、IL-18 或 endostatin 抗血管生成基因(Ad/IL-12、Ad/IL-18、及 Ad/endostatin)來進行神經膠質瘤的基因治療的研究。因為單一一種基因療法效果通常不好，尤其是對於較大腫瘤，效果更是有限，合併不同作用機轉的組合基因療法的療效較好[54]，所以我們計畫探討 IL-12 及 IL-18 免疫療法，以及抗血管生成基因療法等不同作用機轉的組合基因療法對於神經膠質瘤的療效。希望經由本研究計畫的執行，我們能對於神經膠質瘤的治療提供另一可供選擇的治療方式。

三、文獻探討

在多種不同的細胞素中，IL-12 對於抗腫瘤免疫反應非常重要，而且腦部神經膠質瘤病人的 T 細胞的 IL-12 產量有減少的現象[64]。IL-12 會刺激 naïve T 細胞分化成 Th1 (type 1 T helper)細胞，加強 Th1 responses，刺激 T 細胞及 NK 細胞，並促進其分泌 IFN- γ (IL-12 是 T 細胞分泌 IFN- γ 的 costimulus)，激發 NK/lymphokine-activated killer (NK/LAK)細胞，加強特殊 CTL 反應及遲發性型過敏反應(delayed type hypersensitivity) [16,17,24,27,32,52]。IL-12 在 Th1 及 Th2 細胞之間的平衡扮演調節的角色，二種 Th 免疫反應中，Th1 以 cell-mediated immunity 為主，而 Th2 則以免疫細胞浸潤及細胞壞死機轉為主，最後二者都經由 CD8 T 細胞將腫瘤細胞殺死，而這二個作用中，以 Th1 的作用對於抗腫瘤免疫反應較為重要[24,31,48,52]，因此以 IL-12 刺激 Th1 免疫反應，加強宿主的抗腫瘤作用是一種簡便可行的方式[33,53]。除了 IL-12 之外，interleukin-18 也有免疫刺激作用[22,28,34,35]，早期認為它是 interferon- γ inducing factor (GIF)，可刺激脾臟細胞、肝臟淋巴球、及 Th1 細胞製

造 IFN- [22,28,34,35]；此外，IL-18 也會促進 NK 細胞的活性及活化的 T 細胞的分化 [35,38,56]，刺激 Th1 細胞製造 IL-2 [14]，增加 GM-CSF 的產量，減少 IL-10 的製造，提高 CD4 T 細胞及 NK 細胞的 FasL-mediated cytotoxicity [14]。IL-18 的生物功能與 IL-12 有共同點，而且相互合作，加強免疫機能，刺激 IFN 的製造，促進 NK 細胞的細胞毒性 (cytotoxicity)，及加強活化的 T 細胞的分化，提升 Th1 細胞的反應[49,52,53]；但 IL-18 刺激 IFN 的製造的作用比 IL-12 還強[14]；此外 IL-12 會提高 NK 及 T 細胞的 IL-18 受體的表現 [38]。事實上，IL-18 可刺激 IL-1 receptor-associated kinase 及 nuclear factor κ B 的 nuclear translocation [29,43]，所以 IL-18 與 IL-1 family 的細胞素有類似的訊息傳遞機轉[49]。從以上的資料我們了解 IL-12 及 IL-18 都可以提高病人的免疫力，增強其抗腫瘤免疫反應，而且彼此間有合作加強的效果[49,52,53]。文獻上有關合併 IL-12 及 IL-18 的免疫療法的研究不多，有研究發現合併 IL-12 及 IL-18 使動物的 mammary SCK carcinoma 腫瘤消失，但其作用機轉可能主要來自細胞素的抗血管生成[10]；另一研究則發現合併 IL-12 及 IL-18 會抑制小鼠的 fibrosarcoma，但因所使用的劑量較大，動物會產生出血性結腸炎及胸腺萎縮等副作用，引起腹瀉及體重減輕現象[37]，因直接注射 recombinant IL-12 或 IL-18 須要較大的劑量，可能會引起毒性及副作用[14,23]，採用基因療法則可局部緩慢的釋出細胞素，減少副作用的發生[14]，所以逐漸有學者以 IL-12 及 IL-18 的基因療法來治療惡性腫瘤。以分泌 IL-18 的腫瘤疫苗及腹腔內注射 rIL-12 治療皮下的 Lewis lung carcinoma，結果二種細胞素並沒有產生加成的抗腫瘤作用[12]；相反的，以分泌 IL-12 的腫瘤疫苗及腹腔內注射 rIL-18 治療小鼠皮下的膀胱癌，卻有加成的抗腫瘤作用[60]；另外以腺病毒攜帶 IL-18 直接注射至腫瘤周邊，再加上腹腔內注射 rIL-12 來治療 fibrosarcoma，結果發現二者有加成的抗腫瘤作用[38]。有學者以 electroporation 方式將 IL-12 及 IL-18 基因送入黑色素瘤中，結果產生顯著的抗腫瘤作用[20]；亦有研究以 gene gun 將 IL-12、pro-IL-18、及 IL-1 converting enzyme cDNA 打入乳癌細胞中，對於乳癌產生加成的抗腫瘤作用[39]；另外利用 Epstein-Barr virus/lipoplex 作為載體將 IL-12 及 IL-18 送入黑色素瘤中，結果發現只分泌 IL-12 或分泌 IL-12+IL-18 的腫瘤疫苗都有抗腫瘤作用，但只分泌 IL-18 者則沒有作用[2]。整體而言，多數的研究證明合併 IL-12 及 IL-18 的免疫療法比單一細胞素可產生較強的抗腫瘤免疫反應，但目前文獻上尚無研究報告探討合併這二種細胞素(recombinant IL-12 及 IL-18)來治療神經膠質瘤，也沒有合併這二種細胞素的基因療法來治療神經膠質瘤的研究。

除了免疫基因療法之外，腫瘤血管生成(angiogenesis)的抑制也是一種減緩腫瘤生長的方法[11,18,26,36,41]。腫瘤的血管生成會提供腫瘤生長所須的養分，並且也提供腫瘤細胞轉移所須的管道，在乳癌及攝護腺癌的腫瘤中的血管數目與病人的預後有關 [58,59]；同樣的，血管生成在惡性神經膠質瘤的生長也扮演重要的角色，惡性神經膠質瘤的血管生成現象非常明顯，其腫瘤中的血管數目與腫瘤的惡性度有關，例如新生血管的增生(neovascularization)就是惡性神經膠質瘤中最惡性的多形神經膠母細胞瘤的病理特點之一 [3,4]。血管生成在腫瘤的生長扮演重要的角色，若能抑制腫瘤的血管生成，則可抑制腫瘤的生長，因為缺乏血液循環的腫瘤不會長大且不易發生轉移 [13,30,45]，文獻上已有報告證明一些血管生成的選擇性抑制劑在生物體內會抑制腫瘤的生長，但是這種模式的抗血管生成的治療方式只有 cytostatic 的效果，而非 cytotoxic，因此必須長時間的治療才有效果[11,18,26,30,36,63]。此外，蛋白質形式(Peptide 及 protein)的抗血管生成藥物在靜脈注射後會很快的與血管的內皮細胞結合，很快的被從血流中清除掉，有其投予上的困難[50]。若採用抗血管生成基因療法，可在局部表現抗血管生成因子的基因，長時間緩慢釋放出抗血管生成因子，達到抑制血管生成的目的[6,50,51]，進而減緩腫瘤的生長。目前文獻上已有報告證明抗血管生成基因療法會抑制多種腫瘤的生長[47]。我們過去一段時間曾以腺病毒攜帶 angiostatin 或 endostatin 來治療惡性神經膠質瘤，結果發現表現抗血管生成因子(angiostatin 及 endostatin)的神經膠質瘤細胞在皮下有自抑制及旁抑制作用，在腦部也有自抑制作用，而且以腺病毒攜帶抗血管生成因子的基因來治療惡

性神經膠質瘤，也有抗腫瘤作用。從這些資料顯示抗血管生成基因療法對於惡性腦瘤是可行的一種治療方式。

四、研究方法

本研究計畫為三年計畫，主要在探討 IL-12 及 IL-18 免疫療法，以及抗血管生成基因療法等不同作用機轉的組合基因療法對於神經膠質瘤的療效。我們將以腺病毒攜帶 IL-12 或 IL-18 二種細胞素、endostatin 或 angiostatin 二種抗血管生成基因(Ad/IL-12、Ad/IL-18、Ad/endostatin、及 Ad/angiostatin)治療大鼠腦部神經膠質瘤，研究其對於較小及較大腦部神經膠質瘤的療效及相關的免疫反應。第一年的研究著重在重組腺病毒的建立，測定其 titer，然後進行上述基因療法對於小腦瘤的治療。

A.組織培養及細胞株

本研究所使用的細胞株為 RT-2 神經膠質瘤細胞株。RT-2 神經膠質瘤細胞是以 avian sarcoma virus 在 Fischer 344 大鼠腦部誘發產生的腦瘤所培養的細胞株 [9]，細胞培養是以 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Biochrom, Berlin, Germany)加上 10% fetal calf serum (FCS) (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) 在 37℃，5% CO₂ 的狀況下培養。

B.重組腺病毒載體(Adenoviral Vector)

IL-12 基因是選用小鼠 single chain IL-12 (1.7 kb)，其中包含一個 linker 連接二邊的 p40 及 p35 subunits，而 IL-18 是選用小鼠 IL-2(I)-IL-18(m)，包含小鼠 IL-2 leader sequence 及 mature IL-18 基因，實驗所採用的腺病毒載體是 pAdvPGK，其 promoter 是 phosphoglycerate kinase promoter。我們建立多種重組腺病毒，包括帶有 GL1 基因的腺病毒(Ad/GL1)、帶有小鼠 endostatin 基因的腺病毒(Ad/ME)、帶有小鼠 IL-12 基因的腺病毒(Ad/IL-12)、及帶有小鼠 IL-18 基因的腺病毒(Ad/IL-18)，複合腺病毒經由二次純化、繁殖、測定 titer，最後的 titer 為 1×10^{11} 至 1×10^{12} /ml。

C.動物及動物實驗

本研究所使用的動物是 Fischer 344 大鼠，體重為 200-350 gm，購自台大醫學院動物中心。大鼠養在台大醫學院動物中心，可自由取得食物及飲水，生活環境的日夜週期為 12:12 小時(白天為早上 6 點至晚上 6 點)，室內溫度約為 20°C。動物以 ketamine hydrochloride 80 mg/kg 及 xylazine 10 mg/kg 腹膜腔內注射(ip)作麻醉。取腦部標本時，先以 pentobarbital overdose 使動物安樂死，再取標本。

我們探討腫瘤內注射攜帶 IL-12、IL-18、或 endostatin 基因之重組腺病毒載體對於腦內神經膠質的療效。將 5×10^3 log phase 的野生種 RT-2 細胞與重組腺病毒混合(在 10μl phosphate-buffered saline 中)，以立體定位手術植入大鼠右側 caudateputamen 中(座標為 bregma 外側 2.5 mm、前面 1 mm、腦膜下 4 mm)[54,55]，研究各種組合基因療法對於小腦瘤的療效。探討各種組合基因療法對於小腦瘤的治療效果。實驗共分 10 組，每組 10 隻大鼠(A 組只有 3 隻)。

A 組：不接受任何治療

B 組：將 RT-2 細胞與 PBS 混合打入動物腦部

C 組：將 RT-2 細胞與 Ad/GL1 混合打入動物腦部

D 組：將 RT-2 細胞與 Ad/IL-12 混合打入動物腦部

E 組：將 RT-2 細胞與 Ad/IL-18 混合打入動物腦部

F 組：將 RT-2 細胞與 Ad/ME 混合打入動物腦部

G 組：將 RT-2 細胞與 Ad/IL-12 + Ad/IL-18 混合打入動物腦部

H 組：將 RT-2 細胞與 Ad/IL-12 + Ad/ME 混合打入動物腦部

I 組：將 RT-2 細胞與 Ad/IL-18 + Ad/ME 混合打入動物腦部

J 組：將 RT-2 細胞與 Ad/IL-12 + Ad/IL-18 + Ad/ME 混合打入動物腦部

動物接受治療後，我們觀察大鼠存活率及存活時間，以了解不同的治療方式對於腦內神經膠質瘤的療效。動物死亡時，取出腦部，觀察測量腫瘤大小，並進行組織學(Hematoxylin & eosin stain)及免疫組織學檢查。

五、結果與討論

我們建立多種重組腺病毒，包括Ad/IL-12、Ad/IL-18、Ad/Endo，其titer在 10^{11} - 10^{12} pfu。接著進行動物實驗，結果發現對照組及Ad/IL-18組大鼠全部死亡(存活時間，mean \pm standard deviation, A:17.7 \pm 3.2天, B:18.0 \pm 2.7天, C:17.6 \pm 3.0天, E: 19.1 \pm 4.4天)，Ad/IL-12組(D組)有50%存活率(死亡大鼠存活時間為17.6 \pm 3.4天)，Ad/ME組(F組)有30%存活率(死亡大鼠存活時間為19.6 \pm 4.3天)，Ad/IL-12+Ad/IL-18(G組)有50%存活率(死亡大鼠存活時間為20.2 \pm 3.9天)，Ad/IL-12+Ad/ME(H組)有70%存活率(死亡大鼠存活時間為22.4 \pm 4.5天)，Ad/IL-18+Ad/ME(I組)有30%存活率(死亡大鼠存活時間為18.6 \pm 3.3天)，Ad/IL-12+Ad/IL-18+Ad/ME(J組)有70%存活率(死亡大鼠存活時間為24.2 \pm 3.8天)。Ad/IL-12、Ad/IL-12+Ad/IL-18、Ad/IL-12+Ad/ME、Ad/IL-12+Ad/IL-18+Ad/ME組都比對照組存活率高($P < 0.05$)；但Ad/IL-18、Ad/ME、Ad/IL-18+Ad/ME組則與對照組存活率沒有差別($P > 0.05$)；此外，Ad/IL-12+Ad/IL-18+Ad/ME組比Ad/IL-18、Ad/ME、Ad/IL-18+Ad/ME組存活率高($P < 0.05$)，但與Ad/IL-12、Ad/IL-12+Ad/IL-18、Ad/IL-12+Ad/ME則無差別($P > 0.05$)。這結果證明單獨以Ad/IL-12治療對於腦部神經膠質瘤有療效，但單獨以Ad/IL-18治療則沒有療效，合併二者並無加成效果。此外，合併Ad/IL-12及Ad/ME則有加成效果，但再加上Ad/IL-18則亦未能提高療效。

過去文獻上的研究證明recombinant IL-12或IL-18基因療法對於皮下神經膠質瘤meningeal gliomatosis有治癒效果[7,19,21,40]，但對於腦部神經膠質瘤的癒效則不清楚，我們的研究證明Ad/IL-12治療對於腦部神經膠質瘤有療效，但本研究證明單獨以Ad/IL-12治療對於腦部神經膠質瘤有療效，但單獨以Ad/IL-18治療則沒有療效，所以我們進一步合併二者來治療腦部神經膠質瘤。合併IL-12及IL-18的免疫療法的研究不多，有研究發現合併IL-12及IL-18使動物的mammary SCK carcinoma腫瘤消失，但其作用機轉可能主要來自細胞素的抗血管生成[10]；另一研究則發現合併IL-12及IL-18會抑制小鼠的fibrosarcoma，但因所使用的劑量較大，動物會產生出血性結腸炎及胸腺萎縮等副作用，引起腹瀉及體重減輕現象[37]。亦有研究採用基因療法來治療腫瘤，以分泌IL-18的腫瘤疫苗及腹腔內注射rIL-12治療皮下的Lewis lung carcinoma，結果二種細胞素並沒有產生加成的抗腫瘤作用[12]；相反的，以分泌IL-12的腫瘤疫苗及腹腔內注射rIL-18治療小鼠皮下的膀胱癌，卻有加成的抗腫瘤作用[60]；另外以腺病毒攜帶IL-18直接注射至腫瘤周邊，再加上腹腔內注射rIL-12來治療fibrosarcoma，結果發現二者有加成的抗腫瘤作用[38]。有學者以electroporation方式將IL-12及IL-18基因送入黑色素瘤中，結果產生顯著的抗腫瘤作用[20]；亦有研究以gene gun將IL-12、pro-IL-18、及IL-1 converting enzyme cDNA打入乳癌細胞中，對於乳癌產生加成的抗腫瘤作用[39]。整體而言，多數的研究證明合併IL-12及IL-18的免疫療法比單一細胞素可產生較強的抗腫瘤免疫反應，但我們的研究發現合併這二種細胞素來治療神經膠質瘤並沒有加成的效果。

我們接著探討合併IL-12及endostatin基因療法來治療神經膠質瘤，結果發現有加成效果，目前文獻上探討合併IL-12、IL-18基因療法及抗血管生成基因療法很少，曾有研究發現血管生抑制劑vasostatin及IL-12可降低無胸腺小鼠(athymic mice)的human Burkitt lymphoma、結腸癌、卵巢癌的腫瘤生長速度[61]；另外以adenovirus攜帶angiostatin及IL-12來治療動物的乳癌，會使腫瘤變小[15]，我們的研究結果與文獻報告一致。我們更進一步探討合併IL-12、IL-18及endostatin來治療神經膠質瘤，結果發現增加IL-18未能提高療效。整

體而言，Ad/IL-18對於神經膠質瘤沒有療效，與Ad/IL-12或Ad/ME合併治療也沒有加成效果，這與動物模式，腫瘤的種類，治療的劑量等等都有關係，後續須要更多的研究來探討相關的問題。

六、計畫成果自評

由於研究發現Ad/IL-18對於神經膠質瘤沒有療效，與Ad/IL-12或Ad/ME合併治療也沒有加成效果，所以整體而言，IL-18似乎對於神經膠質瘤的治療是沒有幫助的，我們將在第二年調整治療策略。此外台大醫院及國科會的Fischer rats似乎都有問題，我們在下半年的研究中發現RT-2在Fischer rats的tumorigenicity不穩定，所以組織學及免疫組織學的研究受到影響。

七、參考文獻

- 1.Adams RD, Victor M: Principles of neurology. 5th ed. McGraw-Hill, Inc., 1993, pp776-798.
- 2.Asada H, Kishida T, Hirai H, et al: Mol Ther 5:609-616, 2002.
- 3.Brem S, Cotran R, Folkman J: J Natl Cancer Inst 48: 347-356, 1972.
- 4.Brem S: Clin Neurosurg 23:440-453, 1976.
- 5.Brooks MS, Netsky MG, Normansell DE, et al: J Exp Med 136:1631-1647, 1972.
- 6.Cao Y, O'Reilly MS, Marshall B, et al: J Clin Invest 101:1055-1063, 1998.
- 7.Chen B, Timiryasova TM, Haghigat P, et al: J Immunother 24:46-57, 2001.
- 8.Chen Y, Lin SM, Lai HS, et al: J Pediatr Surg 37:1298-1304, 2002.
- 9.Copeland DD, Talley FA, Bigner DD: Am J Pathol 83:149-176, 1976.
- 10.Coughlin CM, Salhany KE, Wysocka M, et al: J Clin Invest 101:1441-1452, 1998.
- 11.D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, et al: Proc Natl Acad Sci USA 91:4082-4085, 1994.
- 12.Fukumoto H, Nishio M, Nishio K, et al: Jpn J Cancer Res 88:501-505, 1997.
- 13.Gimbrone MA Jr, Leapman SB, Cotran RS, et al: J Exp Med 136:261-276, 1972.
- 14.Golab J: Cytokine 12:332-338, 2000.
- 15.Gyorffy S, Palmer K, Podor TJ, et al: J Immunol 166:6212-6217, 2001.
- 16.Hendrzak JA, Brunda MJ: Lab Invest 72:619-637, 1995.
- 17.Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, et al: Science 260:547-549, 1993.
- 18.Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, et al: Nature 348:555-557, 1990.
- 19.Kikuchi T, Joki T, Saitoh S, et al: Int J Cancer 82:425-430, 1999.
- 20.Kishida T, Asada H, Satoh E, et al: Gene Ther 8:1234-1240, 2001.
- 21.Kishima H, Shimizu K, Miyao Y, et al: Br J Cancer 78:446-453, 1998.
- 22.Kohno K, Kataoka J, Ohtsuki T, et al: J Immunol 158:1541-1550, 1997.
- 23.Lotze MT, Zitvogel L, Campbell R et al: Ann NY Acad Sci 795:440-454, 1996.
- 24.Magram J, Connaughton SE, Warriar RR, et al: Immunity 4:471-481, 1996.
- 25.Mahaley MS, Brooks WH, Roszman TL, et al: J Neurosurg 46:467-476, 1977.
- 26.Maione TE, Gray GS, Petro J, et al: Science 247:77-79, 1990.
- 27.Mannetti R, Annuniziato F, Tomasevic L, et al: Eur J Immunol 25:2656-2660, 1994.
- 28.Matsui K, Yoshimoto T, Tsutsui H, et al: J Immunol 159:97-106, 1997.
- 29.Matsumoto S, Tsuji TK, Aizawa Y, et al: Biochem Biophys Res Comm 234:454-457, 1997.
- 30.Millauer B, Shawver LK, Plate KH, et al: Nature 367:576-579, 1994.
- 31.Mossmann TR, Coffman RL: Adv Immunol 46:111-147, 1989.
- 32.Murphy EE, Terres G, Macatonia SE, et al: J Exp Med 180:223-231, 1994.
- 33.Ohmi Y, Shiku H, Nishimura T: Cancer Immunol Immunother 48:456, 1999.
- 34.Okamura H, Nagata K, Komatsu T, et al: Infect Immun 63:3966-3972, 1995.
- 35.Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, et al: Nature 378:88-91, 1995.
- 36.O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al: Cell 79:315-328, 1994.
- 37.Osaki T, Peron JM, Cai Q, et al: J Immunol 160:1742-1749, 1998.
- 38.Osaki T, Hashimoto W, Gambotto A, et al: Gene Ther 6:808-815, 1999.
- 39.Oshikawa K, Shi F, Rakhmilevich AL, et al: Proc Natl Acad Sci USA 96:13351-13356, 1999.
- 40.Parker JN, Gillespie GY, Love CE, et al: Proc Natl Acad Sci USA 97:2208-2213, 2000.
- 41.Plate KH: Cancer & Metastasis Reviews 15:237-240, 1996.

42. Ram Z, Walbridge S, Heiss JD, et al: *J Neurosurg* 80:535-540, 1994.
43. Robinson D, Shibuya K, Mui A, et al: *Immunity* 7:571-581, 1997.
44. Salzman M: Epidemiology and factors affecting survival. In: Apuzzo MLJ (ed): *Malignant Cerebral Glioma*. Illinois, American Association of Neurological Surgeons. 1990, pp95-109.
45. Saleh M, Stacker SA, Wilks AF: *Cancer Res* 56:393-401, 1996.
46. Sampson JH, Archer GE, Shley DM, et al: *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10399-10404, 1996.
47. Scappaticci FA: *J Clin Oncol* 20:3906-3927, 2002.
48. Scott P: *Science* 26:496-497, 1993.
49. Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, et al: *Immunity* 8:383-390, 1998.
50. Tanaka T, Manome Y, Wen P, et al: *Nature Med* 3:437-442, 1997.
51. Tanaka T, Cao Y, Folkman J, et al: *Cancer Res* 58:3362-3369, 1998.
52. Trinchieri G: *Blood* 84:4008-4027, 1994.
53. Trinchieri G: *Annu Rev Immunol* 13:251-276, 1995.
54. Tseng SH, Hsieh CL, Lin SM, et al: *Cancer Gene Ther* 6:302-312, 1999.
55. Tseng SH, Hwang LH, Lin SM: *J Immunother* 20:334-342, 1997.
56. Ushio S, Namba M, Okura T, et al: *J Immunol* 156:4274-4279, 1996.
57. Ward SG: *Biochemical J* 6:361-377, 1996.
58. Weidner N, Carroll PR, Flax J, et al: *Natl Cancer Inst* 143: 401-409, 1993.
59. Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al: *J Natl Cancer Inst* 84: 1875-1887, 1992.
60. Yamanaka K, Hara I, Nagai H, et al: *Cancer Immunol Immunother* 48:297-302, 1999.
61. Yao L, Pike SE, Setsuda J, et al: *Blood* 96:1900-1905, 2000.
62. Yu JS, Wei MX, Chiocca EA, et al: *Cancer Res* 53:3125-3128, 1993.
63. Yuan F, Chen Y, Dellain M, et al: *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14765-14770, 1996.
64. Zou JP, Morford LA, Chougnat C, et al: *J Immunol* 162:4882-4892, 1999.