

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

(2/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2314-B-002-043-

執行期間：93年08月01日至94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

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 5 月 18 日

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

The effects of combined interleukin-12- and interleukin-18-based immunogene therapy and anti-angiogenesis gene therapy on gliomas in rats

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 93 - 2314 - B - 002 - 043 -

執行期間： 93 年 08 月 01 日至 94 年 07 月 31 日

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

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：國立台灣大學醫學院外科部

中 華 民 國 94 年 5 月 18 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、granulocyte-macrophage colony-stimulating factor、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GM-CSF、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。第一年我們建立多種重組腺病毒，包括Ad/IL-12、Ad/IL-18、Ad/Endo、Ad/G+E，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。因此第二年我們調整方向，探討合併GM-CSF、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。結果發現Ad/G+E組(K組)大鼠有50%存活率(死亡大鼠存活時間為 20.6 ± 3.0 天)，Ad/IL-12+Ad/G+E組(L組)大鼠有60%存活率(死亡大鼠存活時間為 24.5 ± 3.1 天)，Ad/IL-18+Ad/G+E組(M組)大鼠有50%存活率(死亡大鼠存活時間為 22.2 ± 2.7 天)，Ad/IL-18+Ad/IL-12+Ad/G+E組(N組)大鼠有80%存活率(死亡大鼠存活時間為 29.5 ± 0.7 天)。這幾組的存活率都比對照組高度($P < 0.05$)，但與Ad/IL-12、Ad/IL-12+Ad/IL-18、Ad/IL-12+Ad/ME、Ad/IL-12+Ad/IL-18+Ad/ME等組之間並無差別($P > 0.05$)。Ad/IL-18+Ad/IL-12+Ad/G+E組(N組)的存活率比Ad/IL-18+Ad/ME(I組)的存活率高($P = 0.03$)，且大鼠存活時間比除了Ad/IL-12+Ad/IL-18+Ad/ME(I組)之外的各組長($P < 0.05$)。這須結果證明合併GM-CSF、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有加成的療效。

英文摘要

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

This 3-year project is intended to investigate the effects of combined granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-, interleukin-12 (IL-12)- and IL-18-based gene therapy and anti-angiogenesis gene therapy on the intracerebral gliomas in rats. In the first year, we constructed several recombinant adenoviral vectors, including Ad/IL-12, Ad/IL-18, Ad/Endo, Ad/G+E 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. In the second year, we modified the strategies and included the adenoviral vector carrying granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and endostatin (Ad/G+E) in the treatment methods. We found that the survival rate of the rats treated with Ad/G+E was 50%, Ad/IL-12+Ad/G+E was 60%, Ad/IL-18+Ad/G+E組 was 50%, Ad/IL-18+Ad/IL-12+Ad/G+E was 80%. The survival rate of these groups was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$); however, was not different from that of the groups treated with Ad/IL-12, Ad/IL-12+Ad/IL-18, Ad/IL-12+Ad/ME, Ad/IL-12+Ad/IL-18+Ad/ME ($P > 0.05$). By contrast, the survival rate of the group treated with Ad/IL-18+Ad/IL-12+Ad/G+E was higher than that of the group treated with Ad/IL-18+Ad/ME ($P = 0.03$). Furthermore, the survival time of the group treated with Ad/IL-18+Ad/IL-12+Ad/G+E was longer than that of all tested groups ($P < 0.05$) except the group treated with Ad/IL-12+Ad/IL-18+Ad/ME. The results suggested that combination of GM-CSF, IL-12, and IL-18-based immunogene therapy and the anti-angiogenesis therapy had synergistic therapeutic effects on gliomas.

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[5,30]，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[68]。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[51,56,65,72]，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[51,56,65,73]。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[65]，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腫瘤有療效，但對於較大腫瘤則效果不佳[64]，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[9,64,65]、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 GM-CSF、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，合併 GM-CSF 及 IL-12 來治療腫瘤的研究也很少，此外並沒有有關合併 GM-CSF、IL-12 及 IL-18 來治療腫瘤的研究。我們將以腺病毒攜帶 IL-12、IL-18、GM-CSF 及 endostatin 抗血管生成基因(Ad/IL-12、Ad/IL-18、及 Ad/G+E 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 [64]，所以我們計畫探討 GM-CSF、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[75]。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) [20,21,29,32,37,62]。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 [29,36,58,62]，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[39,63]。除了 IL-12 之外，interleukin-18 也有免疫刺激作用[27,33,40,41]，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- γ [27,33,40,41];此外,IL-18 也會促進 NK 細胞的活性及活化的 T 細胞的分化[41,44,66],刺激 Th1 細胞製造 IL-2 [17],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 [17]。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 γ 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[59,62,63];但 IL-18 刺激 IFN γ 的製造的作用比 IL-12 還強[17];此外 IL-12 會提高 NK 及 T 細胞的 IL-18 受體的表現[44]。事實上,IL-18 可刺激 IL-1 receptor-associated kinase 及 nuclear factor κ B 的 nuclear translocation [34,53],所以 IL-18 與 IL-1 family 的細胞素有類似的訊息傳遞機轉[59]。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[59,62,63]。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[11];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[43]。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 [17,28],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[17],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 [15];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[71];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[44]。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 [25];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[45];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[3]。整體而言,多數的研究證明合併 IL-12 及 IL-18 的免疫療法比單一一種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。GM-CSF 是促進抗腫瘤作用的重要細胞素[49,64,65,67]。它可以刺激 hematopoietic progenitor cells,使 committed progenitors 分化成 granulocytes 及 mononuclear phagocytes [14,47]。此外,GM-CSF 對於 dendritic cells (DCs) 有較高的 affinity,可刺激 DC precursors 分化成 DCs,最後刺激 tumor antigen presentation [14,46,47]。所以合併 GM-CSF、IL-12、及 IL-18 可能可以加強抗腫瘤作用,不過文獻上有關合併 GM-CSF 及 IL-12 來治療腫瘤的研究並不多,且其結果也不一致[2,18,23,52]。此外並沒有有關合併 GM-CSF、IL-12、及 IL-18 來治療腫瘤的研究。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[12,22,31,42,50]。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 [69,70];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 [4,5]。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 [16,35,55],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[12,22,31,35,42,74]。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[60]。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[7,60,61],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 [57]。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。文獻上並沒有有關合併 GM-CSF、IL-12、IL-18、及 endostatin 來治療腫瘤的研究報告。

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、IL-18、GM-CSF 及 endostatin、或 endostatin 基因(Ad/IL-12、Ad/IL-18、Ad/G+E、Ad/ME)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。

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 [10]，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 °C，5% CO₂ 的狀況下培養。

B.重組腺病毒載體(Adenoviral Vector)

GM-CSF 基因是小鼠的 GM-CSF cDNA，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)、帶有小鼠 IL-18 基因的腺病毒(Ad/IL-18)、及帶有小鼠 GM-CSF 及 endostatin 基因的腺病毒(Ad/G+E)，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、GM-CSF 加 endostatin、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 10 μ l 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)[64,65]，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 14 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
- K 組：將 RT-2 細胞與 Ad/G+E 混合打入動物腦部
- L 組：將 RT-2 細胞與 Ad/IL-12 + Ad/G+E 混合打入動物腦部
- M 組：將 RT-2 細胞與 Ad/IL-18 + Ad/G+E 混合打入動物腦部
- N 組：將 RT-2 細胞與 Ad/IL-12 + Ad/IL-18 + Ad/G+E 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

第一年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。

第二年我們調整方向，探討合併GM-CSF、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。結果發現Ad/G+E組(K組)大鼠有50%存活率(死亡大鼠存活時間為20.6 \pm 3.0天), Ad/IL-12+Ad/G+E組(L組)大鼠有60%存活率(死亡大鼠存活時間為24.5 \pm 3.1天), Ad/IL-18+Ad/G+E組(M組)大鼠有50%存活率(死亡大鼠存活時間為22.2 \pm 2.7天), Ad/IL-18+Ad/IL-12+Ad/G+E組(N組)大鼠有80%存活率(死亡大鼠存活時間為29.5 \pm 0.7天)。這幾組的存活率都比對照組高度($P < 0.05$)，但與Ad/IL-12、Ad/IL-12+Ad/IL-18、Ad/IL-12+Ad/ME、Ad/IL-12+Ad/IL-18+Ad/ME等組之間並無差別($P > 0.05$)。Ad/IL-18+Ad/IL-12+Ad/G+E組(N組)的存活率比Ad/IL-18+Ad/ME(I組)的存活率高($P = 0.03$)，且大鼠存活時間比除了Ad/IL-12+Ad/IL-18+Ad/ME(I組)之外的各組長($P < 0.05$)。

過去文獻上的研究證明recombinant IL-12或IL-12基因療法對於皮下神經膠質瘤meningeal gliomatosis有治癒效果[8,24,26,48]，但對於腦部神經膠質瘤的療效則不清楚，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[11]；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[43]。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[15]；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[71]；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[44]。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[25]；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[45]。整體而言，多數的研究證明合併IL-12及IL-18的免疫療法比單一種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[72]；另外以adenovirus攜帶angiostatin及IL-12來治療動物的乳癌，會使腫瘤變小[19]，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。

第二年我們加上Ad/G+E來進行神經膠質瘤的各種組合基因療法。我們發現Ad/IL-18+Ad/IL-12+Ad/G+E組(N組)大鼠有80%存活率，其大鼠存活時間比除了Ad/IL-12+Ad/IL-18+Ad/ME(I組)之外的各組長($P < 0.05$)，這顯示這樣的組合基因療法有加成作用。文獻上有關合併GM-CSF及IL-12治療腫瘤的研究很少，且其結果並不一致[2,18,23,52]。有學者發現局部注射分泌GM-CSF及IL-12的腫瘤疫苗至tumor draining lymph nodes (TDLNs)會刺激TDLN effector cells，可提高對於metastatic melanoma的療效[Aruga 1999]。另外以表現CD40 ligand、CD80、及GM-CSF之leukemia tumor vaccine及recombinant IL-12來治療小鼠leukemia，其療效比單一種治療方式有效[18]。以腫瘤疫苗及GM-CSF/IL-12局部連續灌流對於神經膠質瘤有加成的效果[23]。相對的，以multiple myeloma的idiotype-specific antigen 及GM-CSF/IL-12作局部注射，其療效與以idiotype-specific antigen 及IL-12 的局部注射的療效差不多 [52]，這表示GM-CSF及IL-12並無加成作用。此外，文獻上並沒有有關合併GM-CSF、IL-12、及IL-18來治療腫瘤的研究報告，更沒有合併GM-CSF、IL-12、IL-18、及endostatin來治療腫瘤的研究報告，而我們發現合併這四種基因療法確有加成作用，我們將根據這些研究結果，在第三年繼續進行較大神經膠質瘤的療效的研究。

六、計畫成果自評

由於研究發現合併GM-CSF、IL-12、IL-18 及endostatin來治療神經膠質瘤有加成作用，我們將在第三年繼續進行較大神經膠質瘤的療效的研究。由於Fischer rats來源不足且不穩定，所以研究進度及品質受到很大的影響。

七、參考文獻

- 1.Adams RD, Victor M: Principles of neurology. 5th ed. McGraw-Hill, Inc., 1993, pp776-798.
- 2.Aruga A, Tanigawa K, Aruga E, et al: Cancer Gene Ther 6:89-95, 1999.
- 3.Asada H, Kishida T, Hirai H, et al: Mol Ther 5:609-616, 2002.
- 4.Brem S, Cotran R, Folkman J: J Natl Cancer Inst 48: 347-356, 1972.
- 5.Brem S: Clin Neurosurg 23:440-453, 1976.
- 6.Brooks MS, Netsky MG, Normansell DE, et al: J Exp Med 136:1631-1647, 1972.
- 7.Cao Y, O'Reilly MS, Marshall B, et al: J Clin Invest 101:1055-1063, 1998.
- 8.Chen B, Timiryasova TM, Haghghat P, et al: J Immunother 24:46-57, 2001.
- 9.Chen Y, Lin SM, Lai HS, et al: J Pediatr Surg 37:1298-1304, 2002.
- 10.Copeland DD, Talley FA, Bigner DD: Am J Pathol 83:149-176, 1976.
- 11.Coughlin CM, Salhany KE, Wysocka M, et al: J Clin Invest 101:1441-1452, 1998.
- 12.D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, et al: Proc Natl Acad Sci USA 91:4082-4085, 1994.
- 13.Davidoff AM, Kimbrough SA, Ng CYC, et al: J Pediatr Surg 34:902-907, 1999.
- 14.Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, et al: Proc Natl Acad Sci USA 90:3539-3543, 1993.
- 15.Fukumoto H, Nishio M, Nishio K, et al: Jpn J Cancer Res 88:501-505, 1997.
- 16.Gimbrone MA Jr, Leapman SB, Cotran RS, et al: J Exp Med 136:261-276, 1972.
- 17.Golab J: Cytokine 12:332-338, 2000.
- 18.Gruber TA, Skelton DC, Kohn DB: J Immunol 168:73-80,2002.
- 19.Gyorffy S, Palmer K, Podor TJ, et al: J Immunol 166:6212-6217, 2001.
- 20.Hendrzak JA, Brunda MJ: Lab Invest 72:619-637, 1995.
- 21.Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, et al: Science 260:547-549, 1993.
- 22.Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, et al: Nature 348:555-557, 1990.
- 23.Jean WC, Spellman SR, Wallenfriedman MA, et al: J Neuro-Oncol 66:39-49, 2004.
- 24.Kikuchi T, Joki T, Saitoh S, et al: Int J Cancer 82:425-430, 1999.
- 25.Kishida T, Asada H, Satoh E, et al: Gene Ther 8:1234-1240, 2001.
- 26.Kishima H, Shimizu K, Miyao Y, et al: Br J Cancer 78:446-453, 1998.
- 27.Kohno K, Kataoka J, Ohtsuki T, et al: J Immunol 158:1541-1550, 1997.
- 28.Lotze MT, Zitvogel L, Campbell R et al: Ann NY Acad Sci 795:440-454, 1996.
- 29.Magram J, Connaughton SE, Warriar RR, et al: Immunity 4:471-481, 1996.
- 30.Mahaley MS, Brooks WH, Roszman TL, et al: J Neurosurg 46:467-476, 1977.
- 31.Maione TE, Gray GS, Petro J, et al: Science 247:77-79, 1990.
- 32.Mannetti R, Annunziato F, Tomasevic L, et al: Eur J Immunol 25:2656-2660, 1994.
- 33.Matsui K, Yoshimoto T, Tsutsui H, et al: J Immunol 159:97-106, 1997.
- 34.Matsumoto S, Tsuji TK, Aizawa Y, et al: Biochem Biophys Res Comm 234:454-457, 1997.
- 35.Millauer B, Shawver LK, Plate KH, et al: Nature 367:576-579, 1994.
- 36.Mossmann TR, Coffman RL: Adv Immunol 46:111-147, 1989.
- 37.Murphy EE, Terres G, Macatonia SE, et al: J Exp Med 180:223-231, 1994.
- 38.Nishimura T, Nakui M, Sato M, et al: Cancer Chemother Pharmacol 46 (Suppl): S52-S61,2000.
- 39.Ohmi Y, Shiku H, Nishimura T: Cancer Immunol Immunother 48:456, 1999.
- 40.Okamura H, Nagata K, Komatsu T, et al: Infect Immun 63:3966-3972, 1995.
- 41.Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, et al: Nature 378:88-91, 1995.
- 42.O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al: Cell 79:315-328, 1994.
- 43.Osaki T, Peron JM, Cai Q, et al: J Immunol 160:1742-1749, 1998.
- 44.Osaki T, Hashimoto W, Gambotto A, et al: Gene Ther 6:808-815, 1999.
- 45.Oshikawa K, Shi F, Rakhmievich AL, et al: Proc Natl Acad Sci USA 96:13351-13356, 1999.
- 46.Paglia P, Girololoni G, Robbiati F, et al: J Exp Med 178:1893-1901, 1993.
- 47.Pardoll DM: Annu Rev Immunol 13:399-415, 1995.
- 48.Parker JN, Gillespie GY, Love CE, et al: Proc Natl Acad Sci USA 97:2208-2213, 2000.
- 49.Parney IF, Petruk KC, Zhang C, et al: Hum Gene Ther 8:1073-1085, 1997.
- 50.Plate KH: Cancer & Metastasis Reviews 15:237-240, 1996.
- 51.Ram Z, Walbridge S, Heiss JD, et al: J Neurosurg 80:535-540, 1994.
- 52.Rasmussen T, Hansson L, Osterborg A, et al: Blood 101:4607-4610, 2003.

53. Robinson D, Shibuya K, Mui A, et al: *Immunity* 7:571-581, 1997.
54. Salzman M: Epidemiology and factors affecting survival. In: Apuzzo MLJ (ed): *Malignant Cerebral Glioma*. Illinois, American Association of Neurological Surgeons. 1990, pp95-109.
55. Saleh M, Stacker SA, Wilks AF: *Cancer Res* 56:393-401, 1996.
56. Sampson JH, Archer GE, Shley DM, et al: *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10399-10404, 1996.
57. Scappaticci FA: *J Clin Oncol* 20:3906-3927, 2002.
58. Scott P: *Science* 26:496-497, 1993.
59. Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, et al: *Immunity* 8:383-390, 1998.
60. Tanaka T, Manome Y, Wen P, et al: *Nature Med* 3:437-442, 1997.
61. Tanaka T, Cao Y, Folkman J, et al: *Cancer Res* 58:3362-3369, 1998.
62. Trinchieri G: *Blood* 84:4008-4027, 1994.
63. Trinchieri G: *Annu Rev Immunol* 13:251-276, 1995.
64. Tseng SH, Hsieh CL, Lin SM, et al: *Cancer Gene Ther* 6:302-312, 1999.
65. Tseng SH, Hwang LH, Lin SM: *J Immunother* 20:334-342, 1997.
66. Ushio S, Namba M, Okura T, et al: *J Immunol* 156:4274-4279, 1996.
67. Wakimoto H, Abe J, Tsunoda R, Aoyagi M, et al: *Cancer Res* 56:1823, 1996
68. Ward SG: *Biochemical J* 6:361-377, 1996.
69. Weidner N, Carroll PR, Flax J, et al: *Natl Cancer Inst* 143: 401-409, 1993.
70. Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al: *J Natl Cancer Inst* 84: 1875-1887, 1992.
71. Yamanaka K, Hara I, Nagai H, et al: *Cancer Immunol Immunother* 48:297-302, 1999.
72. Yao L, Pike SE, Setsuda J, et al: *Blood* 96:1900-1905, 2000.
73. Yu JS, Wei MX, Chiocca EA, et al: *Cancer Res* 53:3125-3128, 1993.
74. Yuan F, Chen Y, Dellain M, et al: *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14765-14770, 1996.
75. Zou JP, Morford LA, Chougnnet C, et al: *J Immunol* 162:4882-4892, 1999.