

[illegible]

5

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 90-2314-B002-155-MH

執行期限：90 年 08 月 01 日至 91 年 07 月 31 日

主持人：賴明陽 執行機構及單位名稱：台大醫學臨床醫學研究所

計畫參與人員：王志強、劉韋良、蘇文正

一、中文摘要

肝細胞癌是世界上最常見的人類癌症之一。在台灣，它常佔癌症死亡率的第一或第二位。雖然近年來治療肝癌的方法有不少進展，包括手術切除、肝臟移植、肝動脈栓塞、酒精注射、或 radiofrequency ablation 等局部治療、化學與放射線治療等，但對多發性或浸潤性肝細胞癌病人成效不彰，肝癌的死亡率仍高居不下。近年來由於生物科技之進步，許多癌症的基因治療在動物實驗已證明有效，也有不少人體試驗正進入第二期或第三期試驗。針對國內特多之肝癌病人，基因治療是否可提供另一嶄新的治療方式且對病人有益，值得探討。

P53 基因是人類最重要的抑癌基因之一。P53 能促使欠缺 P53 表現的癌細胞停止生長與凋亡(apoptosis)而抑制腫瘤，增加腫瘤細胞對化學治療藥品與放射線的敏感度，並抑制血管生成(angiogenesis)。介白質-12 (interleukin-12, IL-12)是一種細胞素，能活化細胞毒性 T 淋巴球與自然殺手細胞(NK cells)去殺死癌細胞，也能抑制血管生成，抗腫瘤效果在動物模式相當顯著。由於 P53 與 IL-12 之抑癌機轉不同，合併兩者之基因治療方式可能有更好的療效，但迄今並無此方面的研究。此外，對無法以開刀切除或酒精注射之肝癌病人，動脈栓塞(TAE)常被使用，但是否能延長病人生命頗受爭論。基因治療是否能增進 TAE 之抗癌效果頗值得研究。

關鍵詞：基因治療、肝細胞癌、P53、介白質-12、反轉錄病毒

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a common human malignancy. It ranks 1st or 2nd the highest mortality rate due to cancer in Taiwan. Despite the advances in the treatment of HCC, including surgery, locoregional ablation by ethanol or radiofrequency, transcatheter arterial embolization (TAE), and chemotherapy, the improvement in survival is limited, especially for those patients who have unresectable HCC. In recent years, gene therapy for cancer has been effective in some animal models and human trials. It may be a promising novel approach to treat HCC.

The p53 gene is a very important tumor suppressor gene, which is frequently mutated in human cancer. P53 can induce growth arrest and apoptosis of cancer cells. Reintroduction of wild-type p53 into p53-altered cells can suppress tumors, increase the sensitivity of tumor cells to chemotherapeutic agents or radiation, and inhibit angiogenesis. Interleukin-12 (IL12) plays an important role in cellular immunity to cancer. It can activate macrophage, NK cells, T lymphocytes, and enhance IFN- γ secretion. It is also a potent inhibitor of angiogenesis. Both p53 alone or IL-12 alone gene therapy had been used to treat murine models of HCC with considerable effects, but combination therapy of p53 and IL-12 has not been tried. Furthermore, TAE of HCC is a widely used therapeutic procedure for treatment of unresectable HCCs, but the efficacy is controversial. We would like to know whether TAE in conjunction with the combination gene therapy can have a better anti-HCC effect.

Keywords : Gene therapy; Hepatocellular carcinoma; P53; Interleukin 12; retrovirus

二、緣由與目的

基因治療是一種利用分子生物學的技術，將遺傳材料 (genetic materials) 送入病人之特定細胞內，以治療疾病的方法，理論上可廣泛應用到醫學的各個領域上，如治療遺傳疾病、癌症、病毒感染等 (11,12)。雖然人類基因治療的研究在前十年進步緩慢，不易達到至特定細胞做長期穩定的基因表現，但最近陸續的成功使基因治療被看好在二十一世紀可成為革命性的新治療方式來對付目前難治的疾病 (13-16)。目前近 400 個人類基因治療的 protocol 中，70% 以上的對象為癌症。癌症基因治療可利用病毒或非病毒載體攜帶所欲表現的基因，經由 *ex vivo* 或 *in vivo* 的方式，將所欲表現的基因帶進癌細胞，來達到消滅癌細胞的目的。所用的策略包括抑癌基因置換 (gene replacement)、免疫基因療法 (表現細胞素 cytokines、腫瘤抗原、或利用 dendritic cells 增強抗原表現)、自殺基因療法、以 antisense 法抑制致癌基因、對抗血管生長等 (17-19)。

至目前為止，應用上述基因治療的策略在肝癌的 *in vitro* 模式及動物模式上可見到有意義的抑制腫瘤的效果 (20)，但無法完全消除腫瘤。人類肝癌的臨床試驗則祇有以 p53 DNA 打入肝癌的初步報告，效果未確定 (21)。臨床上若欲治療不能開刀切除的肝癌，可以想到的一個較好的策略是先利用臨床常用的肝動脈栓塞來減少腫瘤的體積與大小，再輔以合併式的癌症基因治療方法。由於癌細胞通常具有異質性 (heterogeneity)，合併的基因治療有互補的好處。由於晚期的肝癌可能癌細胞到處散佈，因此合併基因治療策略中，應包括免疫治療的方法。

三、結果與討論

P53 抑癌基因是人類最重要的抑癌基因之一，約一半的人類癌症有 p53 的突變 (22)。台灣的肝癌約 1/3 有 p53 基因異常，包括本實驗室所發現的特殊的 splicing

mutation (23)。P53 蛋白能促使有 p53 缺陷的癌細胞生長停止 (growth arrest) 與凋亡 (apoptosis)，並可抑制血管生成，因而抑制腫瘤 (24)；此外，p53 尚會增加腫瘤細胞對化學治療藥品與放射線治療的敏感性 (25)。介白質-12 (Interleukin-12) 是一種能活化細胞毒性 T 淋巴球與自然殺手細胞的細胞素，並有很強的抑制血管生成的能力，可抑制腫瘤的生長 (26-28)。P53 與 IL-12 在動物模式上均具有抑制肝癌的能力 (29, 30)。合併兩者的基因治療，由於作用機轉各不相同，可能有加成作用，但迄今並無此方面的研究。此外，對無法以開刀切除或酒精注射之肝癌病人，肝動脈栓塞雖常被使用，但是否能延長病人生命頗受爭論。肝動脈栓塞加上基因治療能否增進 TAE 之抗癌效果值得研究。

四、計畫成果自評

本研究的目的是在探討合併 P53 與 IL-12 基因療法治療肝癌的療效。本計畫擬：(1) 先建構可表現 P53 與 IL-12 之 vesicular stomatitis virus G (VSVG) pseudotyped MMLV 反轉錄病毒；(2) 完成大鼠 (rat) 與正位肝癌 (orthotopic) 模式，並熟練由肝動脈進行基因治療與動脈栓塞的操作；(3) 比較經由大鼠肝動脈注射 P53，IL-12，與 p53 合併 IL-12 三種不同基因治療方法之效果；(4) 評估基因治療是否能增進 TAE 之抗肝癌的效果。然而在大鼠肝動脈注射方面由於需藉助外科專業人員從旁輔助，手術失敗率尚需待改進，才能有更進一步的成效。

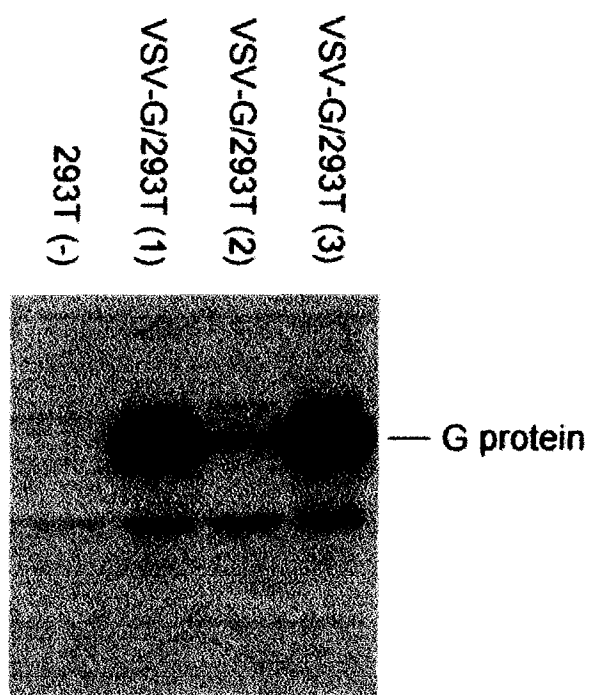
五、參考文獻

1. Bosch FX, Ribes J, Borras J. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis* 1999;19:272-285; WHO Mortality Database. (www-dep.iarc.fr)
2. Chen CJ, Yu MW, Liaw YF. Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:S294-308.

3. Yu MW, Chang HC, Liaw YF et al. Familial risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers and their relatives. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1159-1164.
4. Chen PJ, Chen DS. Hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma: Molecular genetics and clinical perspectives. *Semin Liver Dis* 1999;19:253-262.
5. Buendia MA. Genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2000;10:185-200.
6. Simonetti RG, Liberati A, Angiolini C et al. Treatment of hepatocellular carcinoma : a systemic review of randomized controlled trials. *Ann Oncol* 1997;8:117-136.
7. Acunas B, Rozanes J. Hepatocellular carcinoma: treatment with transcatheter arterial chemoembolization. *Eur J Radiology* 1999;32:86-89.
8. Okada S. Local ablation therapy for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 1999;19:323-328.
9. Lin DY, Liaw YF, Lee TY et al. Hepatic arterial embolization with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomized clinical trial. *Gastroenterology* 1998;94:453-455.
10. Huang YH, Wu JC, Chau GY et al. Supportive treatment, resection and transcatheter arterial chemoembolization in resectable hepatocellular carcinoma: analysis of survival in 419 patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:315-321.
11. French Anderson W. Human gene therapy. *Nature* 1998;392:25-30.
12. 賴明陽·基因治療·教育部生物技術科技教育改進計畫：通識版生物技術，第九章，109-122 頁，1998.
13. Cavazzana-Calvo M, Hachein-Bey S, de Saint Basile G et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. *Science* 2000;288:669-672.
14. Kay MA, Manno CS, Ragni MV et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nature Genetics* 2000;24:257-261.
15. Abonour R, Williams DA, Einhorn L et al. Efficient retrovirus-mediated transfer of the multidrug resistance 1 gene into autologous human long-term repopulation hematopoietic stem cells. *Nature Medicine* 2000;6:652-658.
16. French Anderson W. The best of times, the worst of times. *Science* 2000;288:627-629.
17. Roth JA, Cristiano RJ. Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going ? *J Natl Cancer Inst* 1997;89:21-39.
18. Curiel DT, Gerritsen WR, Krul MRL. Progress in cancer gene therapy. *Cancer Gene Therapy* 2000;7:1197-1199.
19. Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I et al. A controlled trial of intratumor ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nature Medicine* 2000;6:879-885.
20. Qian C, Drozdzik M, Caselmann WH et al. The potential of gene therapy in the treatment of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000;32:344-351.
21. Habib NA, Ding SF, el-Masry R et al. Preliminary report: the short-term effects of direct p53 DNA injection in primary hepatocellular carcinoma. *Cancer Detect Prev* 1996;20:103-107.

22. Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-331.
23. Lai MY, Chang HC, Li HP et al. Splicing mutations of the p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1993;53:1653-1656.
24. Amudson SA, Myers TG, Fornace AJ. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* 1998;17:3287-3299.
25. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T et al. P53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993;74:957-967.
26. Lamonta A, Adorini L. IL-12: a key cytokine in immune regulation. *Immunol Today* 1996;17:214-217.
27. Brunda MJ, Luistro LL, Warriar RR et al. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med* 1993;178:1223-1230.
28. Voest EE, Kenyan BM, O'Reilly MS et al. Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin-12. *Natl Cancer Inst* 1995;8:581-586.
29. Anderson SC, Johnson DE, Harris MP et al. P53 gene therapy in a rat model of hepatocellular carcinoma: intra-arterial delivery of a recombinant adenovirus. *Clin Cancer Res* 1998;4:1649-1659.
30. Barajas M, Mazzolini G, Genove G et al. Gene therapy of orthotopic hepatocellular carcinoma in rats using adenovirus coding for interleukin 12. *Hepatology* 2001;33:52-61.
31. Calipeau J, Li H, Paquin A et al. Vesicular stomatitis virus G pseudotyped retrovector mediates effective in vivo suicide gene delivery in experimental brain cancer. *Cancer Res* 1999;59:2384-2394.

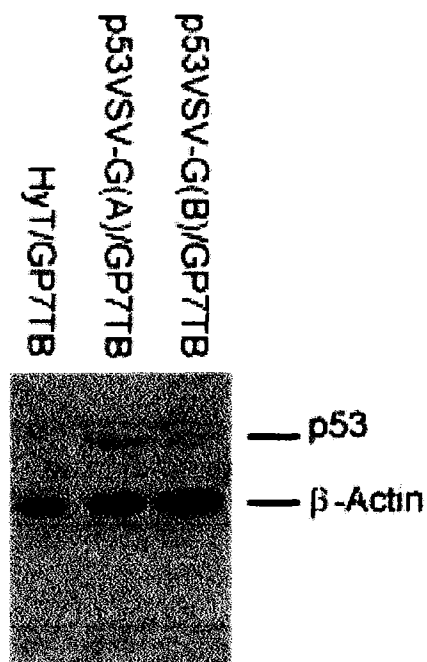
293T 的 Lysate 做 VSV-G protein Western



p53VSV-G virus 在 GP7TB 細胞中的表現：

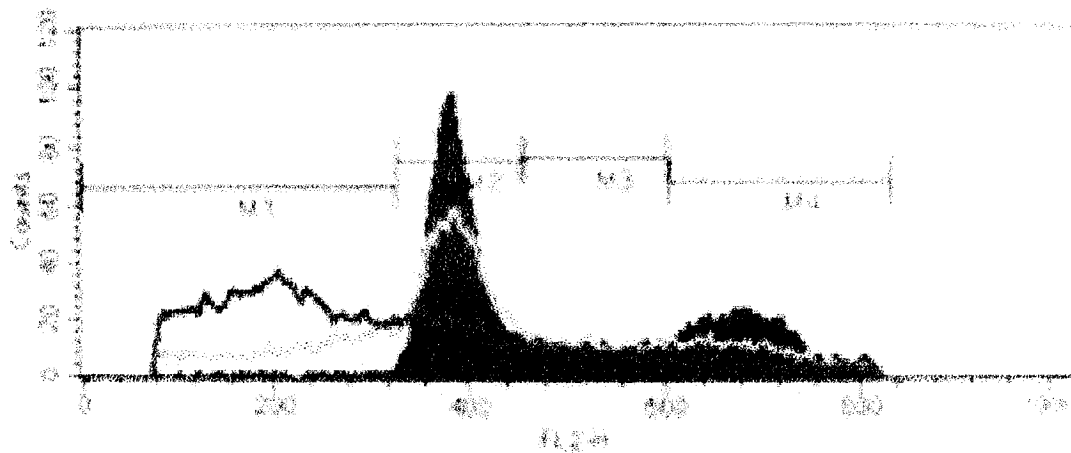
p53VSV-G virus infect GP7TB , Post-Transfection 72 hr.

- 1. 收 GP7TB lysate 做 p53 Western blot , 以確定 p53VSV-G virus 可以在 GP7TB 細胞中表現 p53 蛋白質**



2. Flow cytometry (propidium iodide staining)證明 p53

在 GP7TB 細胞中可以執行 apoptosis 的功能



Apoptosis (%)	
■ vector control	1.3%
■ p53VSV-G	23%
■ FasL-VSV-G	60.3%

3. TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) assay



HyTvsv.G/GP7TB



p53vsv.G/GP7TB



FasLvsv.G/GP7TB

4. ex-vivo test

經濃縮過的 p53VSV-G retrovirus infect GP7TB，72 hr.後，再將這種 pre-treated 的 GP7TB 細胞，取 5×10^6 cells，皮下(s.c.)注射到 F344 rat 的背部，經過 2 個月的觀察。

A

B(-)

C(-)



結果：

A : HyT vector control

tumor: 2.1 x 2.1 x 1.8 cm

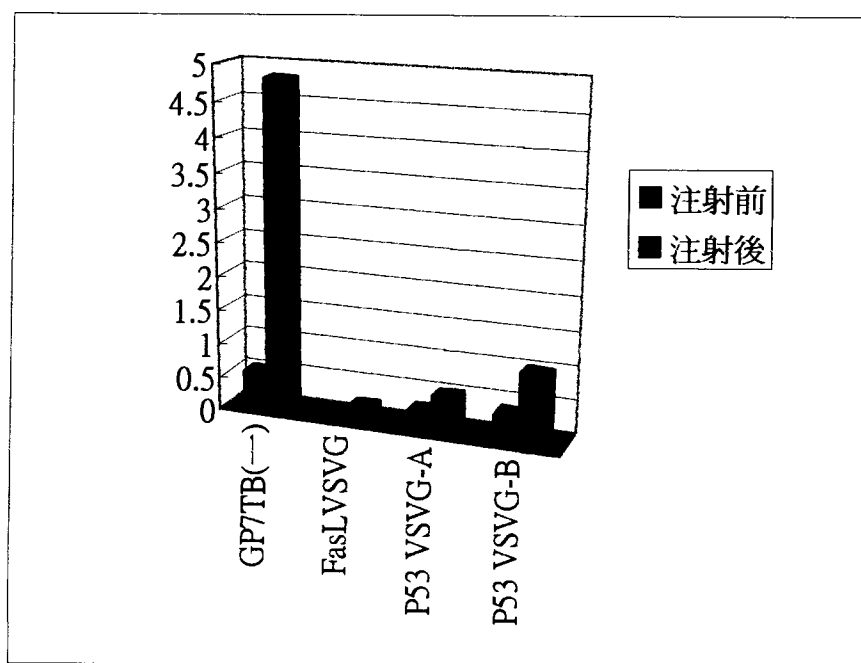
B : not detectable

C : not detectable

5. *in-vivo* test

先將 GP7TB 皮下注射到 F344 rat 的背部，約 1 個月後長出 tumor 後，再分別 intratumor 注射濃縮過的 p53VSV-G virus，每隔一天打一劑，總計打五劑。

	注射前	注射後	成長倍數
GP7TB(—)	1.0 x 1.0 x 1.0 (0.52cm ³)	2.1 x 2.1 x 2.1 (4.815cm ³)	9.26x
FasLVSVG	0.5 x 0.5 x 0.5 (0.065cm ³)	0.75 x 0.75 x 0.75 (0.219cm ³)	3.36x
P53 VSVG-A	0.8 x 0.8 x 0.8 (0.266cm ³)	1.0 x 1.0 x 1.0 (0.52cm ³)	1.95x
P53 VSVG-B	0.9 x 0.9 x 0.9 (0.379cm ³)	1.25 x 1.25 x 1.25 (1.015cm ³)	2.76x



結果：p53VSV-G virus 可以抑制延緩 tumor 的生長