

令和元年6月6日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10596

研究課題名(和文) 難治性膵臓癌に対する癌特異的p53遺伝子治療の前臨床評価

研究課題名(英文) Preclinical study of tumor-specific p53 gene therapy against refractory pancreatic cancer

研究代表者

田澤 大(TAZAWA, HIROSHI)

岡山大学・大学病院・准教授

研究者番号：90415513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓癌は高率に浸潤や転移を起こし、治療抵抗性を示す予後不良な難治性疾患である。本研究では、癌抑制遺伝子p53を誘導する癌特異的制限増殖型アデノウイルス製剤OBP-702がKRAS-ERKシグナルの抑制を介してヒト膵臓癌細胞株における遊走能・浸潤能への抑制効果、腫瘍増殖への抑制効果、免疫原性細胞死の誘導効果を発揮する事を明らかにした。今後は膵臓癌に対する癌特異的p53遺伝子治療を用いた集学的治療の臨床開発が重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、高率にKRAS癌遺伝子やp53癌抑制遺伝子の異常を伴う膵臓癌に対して癌特異的増殖型ウイルスを用いたp53遺伝子治療がp53シグナルの活性化とKRAS-ERKシグナルの抑制を介して抗腫瘍効果を発揮する新たな治療戦略となる可能性を示唆している。予後不良な膵臓癌は有効な治療法の確立に未だ至っておらず、新規治療法の開発研究は膵臓癌患者の生命予後の改善につながるため社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) frequently shows invasion and metastasis, leading to treatment resistance and poor prognosis. The development of novel antitumor strategy for PDAC is an urgent issue. Here, we show that a tumor-specific replication-competent oncolytic adenovirus expressing tumor suppressor p53, OBP-702, inhibits the migration and invasion abilities and tumor growth and induces the immunogenic cell death in human PDAC cells. In the future, the clinical application of a multiplidisciplinary therapy with OBP-702 is important.

研究分野：分子腫瘍学、遺伝子治療学

キーワード：膵臓癌 p53 KRAS 腫瘍融解 アデノウイルス オートファジー 免疫原性細胞死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は他の消化器癌に比べ早期発見が難しく、診断時に高率に浸潤や転移を起こし、抗癌剤抵抗性を示す予後不良な難治性疾患である。これまで膵臓癌に対する有効な治療法の確立に至っておらず、5年生存率は約10%と低いのが現状である。そのため、膵臓癌患者の予後を改善するためには従来の抗癌剤とは異なる新規治療法の開発が強く求められている。

近年、様々な癌に対して遺伝子異常に基づいたコンパニオン診断や個別化医療の開発が進められている。特に、膵臓癌で高頻度に認められる遺伝子異常として癌遺伝子 *KRAS* の変異(95%以上)と癌抑制遺伝子 *p53* の変異(75%以上)がある。*KRAS* 遺伝子変異に対する治療薬として、変異型 *KRAS* タンパク質に対する特異的な阻害剤の開発が進められているが、未だ成功には至っていない。一方、*p53* 遺伝子変異に対する治療薬として、正常な *p53* 遺伝子を誘導する *p53* 誘導性非増殖型アデノウイルス (Ad-*p53*) を用いた遺伝子治療がすでに中国などで臨床応用されている。しかし、Ad-*p53* は非増殖型のために全ての癌細胞に *p53* を誘導する事が出来ず、治療効果は一過性である。つまり、膵臓癌に対する遺伝子異常に基づいた有効な個別化医療は未だ確立していない。

我々は、これまで癌特異的増殖型アデノウイルス OBP-301 を用いた消化器癌に対する前臨床評価や臨床研究を行ってきた。さらに、癌抑制遺伝子 *p53* を誘導する癌特異的増殖型アデノウイルス OBP-702 を開発し、OBP-301 よりも強力にオートファジーやアポトーシスを主体とする細胞死を誘導する事を見出した。最近、膵臓癌の悪性化に関連する因子として、癌抑制遺伝子 *p53* とオートファジーの関係が注目されている。特に、膵臓癌の *p53* 機能が正常な場合はオートファジーの誘導が悪性化を抑制する事が報告された。そこで、我々は OBP-702 が癌特異的に *p53* 発現を誘導して *p53* 機能を正常化するとともにオートファジーを誘導する事で *p53* 変異膵臓癌の悪性化を強力に抑制できるのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、*p53* 変異を伴うヒト膵臓癌細胞の増殖や悪性化における *p53* 誘導性癌特異的増殖型アデノウイルス OBP-702 を用いた新規治療法の前臨床評価を行い、*p53* やオートファジーの誘導を介した治療メカニズムを解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *p53* 変異膵臓癌に対する *p53* 誘導性癌特異的増殖型ウイルスの治療効果の検討

4種類の *p53* 変異ヒト膵臓癌細胞株 (Capan-1、MIA PaCa-2、BxPC-3、Panc-1) に対する2種類の癌特異的増殖型アデノウイルス (OBP-301、OBP-702) の治療効果を比較するために、感染後72時間の細胞生存率をXTTアッセイで検討する。

(2) *p53* 変異膵臓癌に対する *p53* 誘導性癌特異的増殖型ウイルスの細胞死誘導能の検討

4種類の *p53* 変異ヒト膵臓癌細胞株に対する2種類の癌特異的増殖型アデノウイルスの細胞死誘導能を比較するために、感染後72時間の癌細胞のタンパク質を回収し、オートファジーやアポトーシスに関連するタンパク質の変化をウェスタンブロット法で検討する。さらに、腫瘍免疫の活性化に関連する免疫原性細胞死の誘導能を比較するために、培養上清中の細胞外ATP量をATPアッセイで検討する。

(3) *p53* 変異膵臓癌における遊走能・浸潤能の検討とウイルスの影響の検討

4種類の *p53* 変異ヒト膵臓癌細胞株における遊走能・浸潤能を比較するために、Transwell Chamber法で検討する。さらに、2種類の癌特異的増殖型アデノウイルスによる遊走能・浸潤能への抑制効果を検討する。

(4) 高度浸潤性膵臓癌における *KRAS*-ERK シグナルの検討と *KRAS*-ERK 阻害剤の影響の検討

4種類の *p53* 変異ヒト膵臓癌細胞株における *KRAS*-ERK シグナルを比較するために、*KRAS*-ERK シグナルに関連するタンパク質の発現をウェスタンブロット法で検討する。さらに、*KRAS*-ERK 阻害剤による遊走能・浸潤能への抑制効果を検討する。

(5) 高度浸潤性膵臓癌に対する神経関連因子の影響の検討とウイルスの影響の検討

遊走能・浸潤能の強い *p53* 変異ヒト膵臓癌細胞株に対する神経関連因子の影響を検討するために、3種類の神経関連因子 (ノルエピネフリン (NE)、NGF、GDNF) を処理した場合の遊走能の変化をTranswell Chamber法で検討し、*KRAS*-ERK シグナルの変化をウェスタンブロット法で検討する。さらに、2種類の癌特異的増殖型アデノウイルスを処理した場合の遊走能や *KRAS*-ERK シグナルへの抑制効果を検討する。

(6) 高度浸潤性膵臓癌の腫瘍増殖に対する *p53* 誘導性癌特異的増殖型ウイルスの効果の検討

遊走能・浸潤能の強い *p53* 変異ヒト膵臓癌細胞株の腫瘍増殖に対する2種類の癌特異的増殖型アデノウイルスの治療効果を比較するために、ヌードマウスの皮下腫瘍モデルと膵臓腫瘍モデルを作製して検討する。

4. 研究成果

(1) p53 変異膵臓癌に対する p53 誘導性癌特異的増殖型ウイルスの治療効果の検討

4 種類の p53 変異ヒト膵臓癌細胞株 (Capan-1, MIAPaCa-2, BxPC-3, Panc-1) において、OBP-702 は OBP-301 よりも強い抗腫瘍効果を示した。

(2) p53 変異膵臓癌に対する p53 誘導性癌特異的増殖型ウイルスの細胞死誘導能の検討

4 種類の p53 変異ヒト膵臓癌細胞株において、OBP-301 は軽度のオートファジーとアポトーシスの誘導を認め、OBP-702 は強力なオートファジーとアポトーシスの誘導を認めた。さらに、OBP-702 は OBP-301 よりも細胞外 ATP 分泌量の増加を誘導し、免疫原性細胞死を誘導する事が示唆された。

(3) p53 変異膵臓癌における遊走能・浸潤能の検討とウイルスの影響の検討

4 種類の p53 変異ヒト膵臓癌細胞株において、Capan-1 細胞株と MIAPaCa-2 細胞株は軽度の遊走能・浸潤能を認め、BxPC-3 細胞株と Panc-1 細胞株は強い遊走能・浸潤能を認めた。さらに、BxPC-3 細胞株と Panc-1 細胞株の強い遊走能・浸潤能に対して、OBP-702 は OBP-301 よりも強力な抑制効果を示した。

(4) 高浸潤性膵臓癌における KRAS-ERK シグナルの検討と KRAS-ERK 阻害剤の影響の検討

強い遊走能・浸潤能を示す BxPC-3 細胞株と Panc-1 細胞株は KRAS の下流に存在する ERK の活性化を示すリン酸化を認め、弱い遊走能・浸潤能を示す Capan-1 細胞株と MIAPaCa-2 細胞株では認めなかった。さらに、KRAS siRNA や ERK1/2 siRNA の導入は BxPC-3 細胞株と Panc-1 細胞株の遊走能・浸潤能を有意に抑制し、KRAS-ERK シグナルの活性化が遊走能・浸潤能に関与する事が示唆された。

(5) 高浸潤性膵臓癌に対する神経関連因子の影響の検討とウイルスの影響の検討

強い遊走能・浸潤能を示す BxPC-3 細胞株と Panc-1 細胞株に 3 種類の神経関連因子 (NE、NGF、GDNF) を処理したところ、BxPC-3 細胞は NE に、Panc-1 細胞は NGF と GDNF に反応して有意に遊走能が増強し、遊走能の増強に伴う ERK の活性化を確認した。さらに、OBP-301 と OBP-702 は有意に遊走能を抑制した。

(6) 高浸潤性膵臓癌の腫瘍増殖に対する p53 誘導性癌特異的増殖型ウイルスの効果の検討

強い遊走能・浸潤能を示す BxPC-3 細胞株 (500 万個) をヌードマウス (6 週齢、メス) の皮下に移植して皮下腫瘍モデルを作製し、OBP-301、OBP-702、PBS (溶媒コントロール) を 1 日おきに 3 回腫瘍内投与し、治療効果を比較検討した。OBP-301 と OBP-702 は PBS に比べて有意に腫瘍増殖を抑制した。さらに、BxPC-3 細胞株 (300 万個) をヌードマウス (6 週齢、メス) の膵臓に移植して膵臓腫瘍モデルを作製し、OBP-301、OBP-702、PBS を同様に腫瘍内投与して治療効果を比較検討した。OBP-702 は PBS に比べて有意に腫瘍増殖を抑制したが、OBP-301 は腫瘍増殖を有意に抑制しなかった。

以上の研究成果から、p53 誘導性癌特異的増殖型アデノウイルス OBP-702 は神経性微小環境に隣接して強い遊走能・浸潤能を示す p53 変異膵臓癌に対して強力な抗腫瘍効果や腫瘍免疫の活性化を誘導する新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

國府島 健、田澤 大、杭瀬 崇、吉田龍一、榎田祐三、藤原俊義：膵臓に対するウイルス療法の実用化に向けて。 *消化器外科* 2018;41:931-938 (査読なし)

Tazawa H, Kuroda S, Hasei J, Kagawa S, Fujiwara T. Impact of autophagy in oncolytic adenoviral therapy for cancer. *Int J Mol Sci* 2017;18:1479. (査読あり)

〔学会発表〕(計 5 件)

荒木宏之、田澤 大、金谷信彦、菊地覚次、黒田新士、吉田龍一、岸本浩行、西崎正彦、浦田泰生、香川俊輔、藤原俊義：膵臓に対する p53 誘導性腫瘍融解ウイルスによる免疫原性細胞死の誘導効果。 *第 77 回日本癌学会学術総会*、2018 年 9 月 28 日、大阪

Araki H, Tazawa H, Ieda T, Fushimi T, Kuroda S, Yoshida R, Kishimoto H, Nishizaki M, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T. Oncolytic adenovirus-mediated p53 overexpression induces profound immunogenic cell death in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *第 24 回日本遺伝子細胞治療学会*、2018 年 7 月 27 日、東京

Araki H, Tazawa H, Ieda T, Fushimi T, Kuroda S, Yoshida R, Kishimoto H, Nishizaki M, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T. Overexpression of tumor suppressor p53 gene by oncolytic adenovirus boosts immune responses in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *109th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*、2018 年 4 月 18 日、Chicago, USA

Koujima T, Tazawa H, Kuwada K, Tanimoto T, Kuroda S, Kishimoto H, Nishizaki M, Urata Y,

Kagawa S, Fujiwara T. Impairment of KRAS-driven pancreatic cancer growth and invasion by tumor-specific oncolytic adenoviruses. **第22回日本遺伝子治療学会**、2016年7月28日、東京

Koujima T, Tazawa H, Ieda T, Kuwada K, Tanimoto T, Kuroda S, Kishimoto H, Nishizaki M, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T. Virally enhanced p53 reactivation impairs KRAS-driven pancreatic cancer invasion. **107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research**、2016年4月19日、New Orleans、USA

〔図書〕(計 3 件)

田澤 大、田辺俊介、香川俊輔、白川靖博、藤原俊義：テロメラーゼ依存性腫瘍融解アデノウイルス Telomelysin の臨床開発. **次世代がん治療** (第3章第1節)、エヌ・ティー・エス、2017、229-237

Tazawa H, Kagawa S, Shigeyasu K, Fujiwara T. Telomerase-targeted replicative adenoviruses for cancer treatment and diagnosis. **Advances in Medicine and Biology Volume 110** (Chapter 4), Nova Science Publishers, 2016, 95-113

Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T. p53 replacement therapy for cancer. **Recent Results in Cancer Research (Current Strategies in Cancer Gene Therapy)** (Chapter 1), Springer International Publishing, 2016, 1-15

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。