

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10777

研究課題名(和文)放射線増強効果をもつプロドラッグ遺伝子治療システムによる新規膠芽腫治療法の開発

研究課題名(英文) Development of prodrug activator gene therapy combined with radiation therapy in glioblastoma

研究代表者

高橋 雅道 (Takahashi, Masamichi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医長

研究者番号：10436454

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)：抗真菌薬である 5-FC を細胞内で抗腫瘍薬の5-FU に変換するプロドラッグシステムと自己増殖型レトロウイルス(RRV)による遺伝子発現システムを用いた遺伝子治療と放射線治療の併用効果を膠芽腫細胞株を使って検証した。RRVは一般的な膠芽腫細胞株では効率良くほぼ全ての細胞に感染した一方、患者由来の膠芽腫幹細胞株では約半数に感染した。放射線照射後もRRVは安定した感染力を維持し、マウス脳腫瘍モデルではプロドラッグシステムによって放射線治療の抗腫瘍効果が増強してマウスの生存期間が延長することが示された。更なる遺伝子導入効率の向上が今後の検討課題と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は最も予後不良の原発性悪性脳腫瘍の一つであり、新規治療法開発が切望されている。我々は本研究で、増殖型レトロウイルスベクター(RRV)を用いたプロドラッグシステムの放射線治療への増強効果について、膠芽腫細胞株を用いた基礎的研究、前臨床研究を行う事で検証した。その結果、RRVは膠芽腫細胞に広く感染して放射線照射を受けた後も安定してその感染能力を維持することが判明し、特にマウス脳腫瘍モデルにおいて効果的に放射線治療の抗腫瘍効果を増強させることが明らかとなった。これらの結果は現在論文として発表されるべく準備が進んでおり、将来的には膠芽腫患者を対象とした臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the therapeutic efficacy of the combination of our prodrug activating gene therapy system using retroviral replicating vector (RRV) and radiation therapy in experimental glioblastoma models. RRV efficiently spread to almost all the cells in commercially available glioblastoma cell lines including U87 and radioresistant U87EGFRvIII cells, whereas only 50% of the cells were infected in patient-derived glioblastoma stem-like cells. In stability assay, RRV was shown to safely maintain its ability of infection even after the irradiation. In survival study, mice harboring brain tumor with U87EGFRvIII cells were treated with combination of RRV prodrug system and radiation therapy showed significant elongated survival time compared to other groups. In conclusion, our RRV prodrug gene therapy system efficiently enhanced the anti-tumor effect of radiation therapy in experimental glioblastoma. Improved infection to glioblastoma stem-like cells should be further investigated.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：膠芽腫 遺伝子治療 放射線治療 ウイルスベクター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は原発性悪性神経膠腫の中で最も発生頻度が高く予後の悪い WHO Grade IV に分類される悪性腫瘍であり、標準治療として手術による可及的摘出に加えて放射線治療と temozolomide による化学療法が行われるが、5 年生存割合が 10%、生存期間中央値が約 14 か月と不良であり、新規治療法の開発が急務である。

近年米国において、自己増殖型レトロウイルスベクター (RRV; retroviral replicating vector) を用いたプロドラッグ活性化遺伝子治療システムが開発され、現在膠芽腫を主な対象として臨床応用が進められている。本研究で用いる RRV は従来の非増殖型ベクターの持っていた弱点である腫瘍内での感染効率を大幅に改善した新規自己増殖型レトロウイルスベクターで、これまでに悪性脳腫瘍を含む種々のがん細胞に対して複数の Phase I/II 臨床試験が行われ、その安全性が確立している。この RRV は被膜内に核移行シグナルを持たないため静止期の細胞では感染・増殖を行うことができない。活発に分裂する細胞にのみ感染し、そのゲノム DNA に組み込まれる。脳腫瘍細胞は活発な分裂能を有するため、極めて効率的な腫瘍選択性を示す。更に今回導入するプロドラッグ活性化遺伝子として、コドン最適化した cytosine deaminase (CD) を選択している。脳腫瘍内へ到達した RRV は上述の機序により腫瘍細胞選択的に感染・増殖を繰り返して脳腫瘍全体に広がり、腫瘍細胞内に CD を発現する。その状態で経口投与された中枢神経系抗真菌薬である 5-FU は、脳血液関門 (BBB) を通過して脳内へ到達し正常細胞へは悪影響を及ぼすことなく脳腫瘍細胞特異的に発現する細胞内 CD の存在下で殺細胞効果を持つ 5-FU に変換される。細胞内で局所的に生み出された高濃度の 5-FU によって脳腫瘍細胞は選択的に障害され、バイスタンダー効果も手伝って強い抗腫瘍効果を示す。

研究代表者らは 5-FU が放射線感受性増強作用を持つことに着目し、これまでに放射線治療抵抗性を持つルシフェラーゼ発現型の脳腫瘍細胞株 (U87EGFRvIII-Fluc2) を、*ex vivo* に腫瘍細胞内に 5-FU を導入して放射線照射を施した後にヌードマウス脳内へ移植してその動態を検討した結果、プロドラッグシステムは強い放射線感受性増強効果をもたらすことを見出した (Takahashi M. et al, Cancer Gene Ther 2014)。本研究によって、従来放射線治療抵抗性であった膠芽腫においてプロドラッグシステムとの併用によって放射線治療の効果が増強できる可能性がある。

2. 研究の目的

RRV を用いたプロドラッグシステムと放射線治療の併用による膠芽腫細胞に対する治療効果の確認を行う事を目的とした。具体的には、市販の膠芽腫細胞株、および患者由来膠芽腫細胞を用いたプロドラッグシステムと放射線治療を併用することで *in vitro* と *in vivo* で放射線増感効果獲得により殺細胞効果、および生存延長効果を示すことを確認すること目的とした。

3. 研究の方法

1) RRV 感染性スクリーニング (spread assay)

市販の膠芽腫細胞株である U87 と、放射線治療抵抗性を示す膠芽腫細胞株である U87EGFRvIII を用いて先行研究と同様の手法で GFP を発現する RRV-GFP を感染させ、経時的に flow cytometry を用いて感染細胞数を計測して RRV が効率的に感染するかどうかを確認した。また、当院ではこれまで膠芽腫患者の手術検体から無血清培地浮遊条件での脳腫瘍幹細胞培養およびマウス皮下移植による生体内継代を試み、多数の膠芽腫細胞株を樹立しているため、これらの細胞を用いて同様に感染効率を確認した。

2) RRV の安定性の確認 (stability assay)

上記の効率的に感染が確認された細胞株において、RRV が感染することにより感染細胞から産生される RRV が、放射線照射を受けた後に度重なる感染、産生サイクルを経ても長期的に安定して感染能を有する RRV が産生されるかを判定する。各タイムポイントにおいて RRV を採取し、DNA を抽出して PCR 法で確認することで RRV の感染力が安定して持続しているかを評価した。

3) プロドラッグシステムと放射線治療の併用下での殺細胞効果の確認 (clonogenic assay)

上記の効率的に感染が確認された細胞株において、5-FU 投与下に放射線治療を併用することでその相乗的な殺細胞効果の有無を検証した。

4) マウス脳腫瘍モデルでのプロドラッグシステム併用放射線治療実験 (survival assay)

上記の効率的に感染が確認された細胞株を用いて、免疫不全マウスへ定位脳移植することでマウス脳腫瘍モデルを作成して、脳腫瘍が形成されたのちに RRV を定位的に腫瘍内投与し、5-FU と放射線治療の併用によるマウス生存期間を観察することで脳腫瘍モデルにおけるプロドラッグシステムの放射線治療増強効果を検証した。

4. 研究成果

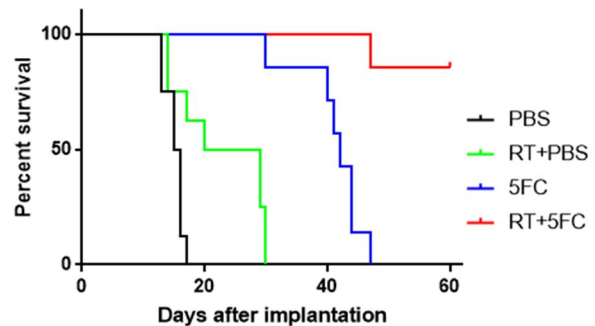
1) U87 細胞、および U87EGFRvIII 細胞に GFP を発現する RRV-GFP を感染させたところ、両者ともに RRV に対して高い感染効率を示した。それぞれ感染から day 9、および day 12 で共に感染細胞割合は 95% を超え、その後も day 24 まで安定して GFP 発現細胞割合は維持されていた。しかし、患者由来細胞株である浮遊細胞株である MGG152 細胞、GS-Y03 細胞、GSC23 細胞を用いて同様の感染実験を行ったところ、予想に反して RRV の感染細胞割合はほぼ 50% 程度と低くとどまっていた。これらの結果は、MOI を 1, 2, 5 と増量させても大きな変化はなく、浮遊細胞に対す

る RRV の感染効率が低い結果となった。

2) U87、および U87EGFRvIII に RRV を感染させた後に放射線治療を併用して被爆後の RRV の安定性を評価した。感染細胞から産生されて培地に出現した daughter RRV を新しく naïve U87、および U87EGFRvIII に感染させ、その培地から得られた RRV をさらに naïve cells に感染させることを繰り返して、得られた RRV の安定性を PCR で評価したところ、放射線照射を受けていない RRV と同等に放射線照射を受けた RRV は感染から 9 継代目においても安定して感染力を維持していた。

3) 続いて放射線治療抵抗性の U87EGFRvIII 細胞を用いて clonogenic assay を行った。RRV により CD を発現させた膠芽腫細胞株に対して、5FC の存在下 / 非存在下に放射線治療を併用して surviving fraction を測定したところ、RRV プロドラッグシステムと放射線照射を併用した群はそれ以外の群に比べて有意差をもって生細胞数が減少していた。

4) 放射線治療抵抗性の U87EGFRvIII 細胞を定位的にヌードマウスの脳に移植して作成したマウス脳腫瘍モデルに対して、定位的に RRV を投与することで脳腫瘍内に CD を発現させた。そののちに、対照群、放射線治療群、5FC 群、放射線治療+5FC 群に振り分けてそれぞれの治療を行いマウスの生存を確認したところ、放射線治療+5FC 群のマウスの生存期間は他群に比べて有意に延長しており、放射線治療単独群に対して生存期間延長効果が極めて高いことが明らかになった。



以上から本研究により我々のプロドラッグシステムは膠芽腫細胞に対して放射線治療の効果を増強する可能性があることが判明したと同時に、膠芽腫細胞の治療抵抗性の原因となると考えられる腫瘍幹細胞集団への感染効率は改善の余地があることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inoko Kazuho, Hiraoka Kei, Inagaki Akihito, Takahashi Mizuna, Kushibiki Toshihiro, Hontani Koji, Takano Hironobu, Sato Shoki, Takeuchi Shintaro, Nakamura Toru, Tsuchikawa Takahiro, Shichinohe Toshiaki, Gruber Harry E, Jolly Douglas J, Kasahara Noriyuki, Hirano Satoshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Therapeutic activity of retroviral replicating vector-mediated prodrug activator gene therapy for pancreatic cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 184 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41417-018-0020-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mitchell Leah A., Lopez Espinoza Fernando, Mendoza Daniel, Kato Yuki, Inagaki Akihito, Hiraoka Kei, Kasahara Noriyuki, Gruber Harry E., Jolly Douglas J., Robbins Joan M.	4. 巻 19
2. 論文標題 Toca 511 gene transfer and treatment with the prodrug, 5-fluorocytosine, promotes durable antitumor immunity in a mouse glioma model	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 930 ~ 939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/neuonc/nox037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Inoko K, Hiraoka K, Inagaki A, Takahashi M, Kushibiki T, Hontani K, Takano H, Sato S, Takeuchi S, Nakamura T, Tsuchikawa T, Shichinohe T, Gruber HE, Jolly DJ, Kasahara N, Hirano S.	4. 巻 epub ahead of print
2. 論文標題 Therapeutic activity of retroviral replicating vector-mediated prodrug activator gene therapy for pancreatic cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Gene Ther	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41417-018-0020-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hiraoka K, Inagaki A, Kato Y, Huang TT, Mitchell LA, Kamijima S, Takahashi M, Matsumoto H, Hacke K, Kruse CA, Ostertag D, Robbins JM, Gruber HE, Jolly DJ, Kasahara N.	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Retroviral replicating vector-mediated gene therapy achieves long-term control of tumor recurrence and leads to durable anticancer immunity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/neuonc/nox038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Takahashi Masamichi、Miki Shunichiro、Fujimoto Kenji、Fukuoka Kohei、Matsushita Yuko、Maida Yoshiko、Yasukawa Mami、Hayashi Mitsuhiro、Shinkyo Raku、Kikuchi Kiyomi、Mukasa Akitake、Nishikawa Ryo、Tamura Kenji、Narita Yoshitaka、Hamada Akinobu、Masutomi Kenkichi、Ichimura Koichi	4. 巻 110
2. 論文標題 Eribulin penetrates brain tumor tissue and prolongs survival of mice harboring intracerebral glioblastoma xenografts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2247 ~ 2257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高橋雅道	4. 発行年 2017年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 480頁
3. 書名 先端治療技術の実用化と開発戦略 (核酸医薬、免疫療法、遺伝子治療、細胞医薬品)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平岡 圭 (Hiraoka Kei) (10719587)	北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101)	