

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月27日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15705

研究課題名(和文) 進行卵巣癌に対する新しい戦略的腫瘍溶解性ウイルス療法の開発

研究課題名(英文) Development of new strategic oncolytic virotherapy for advanced ovarian cancer

研究代表者

那波 明宏 (Nawa, Akihiro)

名古屋大学・医学系研究科・特任教授

研究者番号：90242859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：シクロデキストリンは食品分野にも応用されている易溶性の環状オリゴ糖で、その内部空洞において疎水性化合物と結合して可溶化する性質から、抗癌剤の新たなキャリアとして期待されている。他方、上皮性卵巣癌の80%以上で葉酸受容体FOLR1が高発現していることから、癌標的化リガンドとして葉酸が注目されている。本研究では、卵巣癌由来細胞株を対象として、葉酸付加したシクロデキストリン化合物(FA-CyD)によるFOLR1標的化の可否について検討を行った。その結果、FA-CyDはFOLR1を発現している細胞だけでなく、プロトン依存性葉酸トランスポーターPCFTのみを発現している細胞も標的化することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

葉酸受容体(FOLR1)は卵巣癌で高発現しているが、正常卵巣組織においてはほとんど発現していないことから、卵巣癌を特異的に標的化できる分子として期待され、多くの葉酸コンジュゲート薬が開発されてきた。本研究によって、葉酸コンジュゲート薬の一つである葉酸修飾シクロデキストリンは、FOLR1を発現している細胞だけでなく、プロトン依存性葉酸トランスポーター(PCFT)を発現している細胞も標的化することが示唆された。ヒトにおいてPCFTは主に小腸で発現し、他にも肝臓・腎臓・胎盤・脾臓などでも発現すると報告されている。葉酸コンジュゲート薬はこれらの臓器を非特異的に標的化してしまう可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cyclodextrin is readily soluble cyclic oligosaccharides which is also used as the food additive, and are expected to be new carrier of anticancer agents because of their ability to solubilize the hydrophobic compounds by binding at their internal cavity. On the other hand, folate is paid attention as a cancer targeting ligand because folate receptor alpha (FOLR1) is highly expressed in 80% or more of epithelial ovarian cancer. In this study, we examined if the folate-appended cyclodextrin compound (FA-CyD) can specifically target the ovarian cancer cell lines. As a result, it was suggested that FA-CyD targets not only cells expressing FOLR1 but also cells expressing only the proton-coupled folate transporter (PCFT).

研究分野：産婦人科学

キーワード：腫瘍溶解性ウイルス 卵巣癌 シクロデキストリン 分子標的薬 パクリタキセル FOLR1 PCFT

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

進行卵巣癌の5年生存率は未だ30%程度で推移し、Taxol、Carboplatin、Doxil、Topotecan や分子標的薬 Bevacizumab の併用により無増悪生存期間は延長されたものの、劇的な改善を望むことは難しく、化学療法以外の新規治療法の導入が早急に必要である。

腫瘍溶解性ウイルス (Oncolytic virus: OV) 療法は、現在までに VSV、Measles ウイルス、単純ヘルペスウイルス等、様々なウイルスを用いて開発されてきた。近年、頭頸部癌、乳癌、悪性黒色腫等に対する治験が多数実施され、固形癌に対する局注接種では優れた治療成績を得られる場合も多い。しかし、進行卵巣癌のように腹膜播種した癌の場合、多数の癌に一つずつ OV を接種していくことは難しく、OV 溶液の腹腔内投与が理想的ではあるが、腹腔内投与では、OV が腫瘍に到達する前に宿主免疫により中和不活化されてしまい、十分な抗腫瘍効果が得られない。OV 療法を有効な卵巣癌治療法として実用化するためには、腹腔内あるいは全身性に投与可能で、宿主免疫による中和不活化を回避できる新しい OV 粒子の開発が不可欠である。

2. 研究の目的

既存の OV 療法には無い優れた特長を備えた機能性 OV を作製し、これまで治療が困難であった悪性度の高い進行卵巣癌、特に腹膜播種癌に対する新しい癌治療法を確立することを目的とする。さらに、腫瘍微小環境における細胞間相互クロストークを解析することにより、癌-間質のクロストークの解明が OV を用いた治療法のウイルス増殖促進につながるかを検討し、新しい OV 開発に発展させる。

具体的には、宿主免疫を回避し、腹膜播種卵巣癌を選択的に攻撃できる、機能性分子修飾型人工エンベロープ被覆 OV (Artificial-Enveloped Oncolytic Virus: AEOV) 粒子を開発する。AEOV は、ウイルス表面抗原を人工エンベロープによって被覆するため、原理的には、宿主免疫によって不活化されることなく標的組織に到達できる。さらに、人工エンベロープ表面を様々な分子で修飾可能であるため、上皮性卵巣癌の90%以上で高発現している葉酸レセプター (FOLR1) のリガンドである葉酸で修飾することで卵巣癌指向性を付与する。

3. 研究の方法

(1) 卵巣癌指向性 AEOV 粒子の開発

精製したウイルス粒子と DEAE-デキストランとを結合させた後、真空凍結乾燥装置を用いて精製する。感染増殖能を評価するため、AEOV をヒトおよびマウスの上皮、中皮、ならびに卵巣癌由来の細胞株の培養液に添加し、細胞溶解活性およびウイルス放出量を測定する。精製した AEOV の表面に、クロスリンカー試薬 (EDC、NHS、DSS など) を用いて葉酸を結合させ、葉酸結合型 AEOV (fol-AEOV) を作製する。

(2) AEOV 粒子表面の機能性分子修飾

fol-AEOV の感染増殖能を評価するため、各種細胞株に接種し、細胞溶解性およびウイルス放出量を測定する。また、fol-AEOV の卵巣癌指向性を評価するため、各種細胞株における葉酸受容体、FOLR1、2、3の発現量と fol-AEOV 感染増殖能を比較解析する。さらに、FOLR 過剰発現による fol-AEOV の感染増殖能の変化を解析するため、FOLR 発現ベクターを作製し、FOLR 過剰発現細胞における fol-AEOV の細胞溶解性およびウイルス放出量を測定する。

(3) 葉酸修飾シクロデキストリンによる卵巣癌指向性の解析

FOLR1 発現レベルがそれぞれ異なっている卵巣癌由来細胞株について、分子表面を葉酸修飾したシクロデキストリンにパクリタキセルを結合させた化合物 (PTX/fol-CyD) で処理し、細胞の生存率を解析した。PTX/fol-CyD による細胞傷害に関連すると考えられる遺伝子について、siRNA によって発現をノックダウンした条件下で PTX/fol-CyD 処理後の細胞生存率を解析した。腫瘍微小環境においては乳酸が蓄積することで pH が酸性に変化していると言われていたため、乳酸によって pH を酸性に調整した条件下で PTX/fol-CyD 処理後の細胞生存率を解析した。

4. 研究成果

(1) 卵巣癌指向性 AEOV 粒子の開発

まず、HSV wild 株、L1BR1 のウイルス粒子を、デキストラン、ポリエチレンイミン、リボソーム、コンドイチン硫酸、ヒアルロン酸を用いて被覆し、真空凍結乾燥装置を用いて精製した。作製した AEOV の感染増殖能を評価するために、AEOV を Vero 細胞及びヒト卵巣癌株に接種した。しかし今回の検討では、Vero 細胞を用いたプラークアッセイにおいてプラークは認められなかった。特に被覆の段階をもう一度検討中である。

(2) AEOV 粒子表面の機能性分子修飾

AEOV の作製は困難であった為、FOLR を標的とした葉酸結合型薬剤による卵巣癌標的化の可否について検討を行っていくことにした。卵巣癌由来細胞株として A2780、ES2、HEY、SK-OV-3、及び TOV-21G を用い、FOLR の発現レベルの比較解析を行った。FOLR1 については SK-OV-3 及び TOV-21G において発現が検出された【図1】。FOLR2 発現はいずれの細胞株でも発現が検出されなかった。FOLR3 発現については、発現の検出系を構築することが出来なかった。少なくとも株化された卵巣

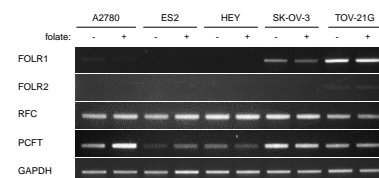


図1 各種卵巣癌細胞株における遺伝子発現の解析

癌由来細胞においては、FOLR1 及び FOLR2 発現が陰性である場合が多いことが分かった。
 (3) 葉酸修飾シクロデキストリンによる卵巢癌指向性の解析

まず、いずれの細胞株もパクリタキセル(10 ng/μL) 処理によって有意に傷害されることを確かめた【図2・左】。一方、PTX/fol-CyD (10 μM) で処理すると、A2780、SK-OV-3 及び TOV-21G 細胞のみが傷害され、ES2 及び HEY は全く傷害されなかった【図2・右】。A2780 細胞は FOLR1、FOLR2 を発現していないにも関わらず PTX/fol-CyD によって傷害された。FOLR 以外の葉酸関連遺伝子について発現解析を行ったところ、A2780 細胞においてはプロトン/葉酸共輸送体 (PCFT) 発現が比較的高いことが分かった【図1】。

A2780 細胞における PCFT 発現をノックダウンすると PTX/fol-CyD 処理による細胞傷害が有意に減少したが、FOLR1 発現をノックダウンしても細胞傷害の有意性は解消されなかったことから、A2780 細胞における PTX/fol-CyD の細胞傷害活性は PCFT 発現に依存的であり、FOLR1 は関与していないことが示唆された【図3・左】。一方、SK-OV-3 細胞においては、FOLR1 または PCFT 発現のいずれかをノックダウンすることで PTX/fol-CyD による細胞傷害活性が有意に減少した【図3・右】。FOLR1 による葉酸取り込み機構においては、葉酸が結合することで FOLR1 周辺の細胞膜がエンドサイトーシスを起こし、エンドソームに含まれる形で葉酸が細胞内に取り込まれる。その後、エンドソーム内腔から細胞質に葉酸が移行する機構にエンドソーム膜上の PCFT が寄与すると言われている。このため、SK-OV-3 細胞においては PCFT 発現をノックダウンすることで PTX/fol-CyD の細胞質への移行が阻害されたために細胞傷害活性が減少したと考えられる。

PCFT による葉酸輸送活性は酸性 pH 環境において上昇することが報告されていた為、pH7.1 に下げた条件下で PTX/fol-CyD 処理を行ったところ、A2780 細胞においては、pH7.6 条件下での処理と比較して、有意に細胞傷害活性が上昇した【図4・左】。この結果から、A2780 細胞における PCFT 依存的な PTX/fol-CyD 取り込み機構の存在が支持された。一方、SK-OV-3 細胞においては pH 条件による細胞障害活性の変化は見られなかった【図4・右】。

以上、OV 粒子表面を化学的に修飾し、AEOV を作製することは出来なかったが、葉酸リガンドに着目した薬剤輸送について新たな知見を得た。すなわち、癌細胞にのみ発現している FOLR1 を特異的に標的化できるという理由から注目されていた葉酸コンジュゲート薬、少なくとも葉酸修飾シクロデキストリン fol-CyD については、FOLR1 に非依存的、且つ、PCFT に依存的な標的化が起こることが示唆された【図5】。PCFT は、ヒト生体内において主に腸管系で幅広く発現している(十二指腸から回腸)。研究代表者は腹膜播種卵巢癌に対する治療法の開発を主目的としているため、正常な腸管系組織を標的化する可能性がある点では fol-CyD の特異性に疑念が持たれる。しかし一方で、PCFT が上皮性卵巢癌や肝臓癌において高発現し、また、酸性 pH に傾いている腫瘍の微小環境において PCFT が葉酸の取り込みに寄与するという報告もあることから、PCFT を新たな癌治療標的として位置づけられる可能性もある。現在、マウスにおいてヒト腹膜播種卵巢癌の増殖をモニターする実験系を構築したところであり、この担癌マウスに対して PTX/fol-CyD を腹腔投与した際の抗腫瘍効果や投与部位周辺に及ぼす影響などの解析を注意深く行っていき、腹膜播種卵巢癌に対する fol-CyD の有用性についての評価をしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Koya Yoshihiro, Liu Wenting, Yamakita Yoshihiko, Senga Takeshi, Shibata Kiyosumi, Yamashita Mamoru, Nawa Akihiro, Kikkawa Fumitaka, Kajiyama Hiroaki. Hematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1), a hidden player in migration, invasion, and tumor formation, is over-expressed in ovarian carcinoma cells. *Oncotarget*. 査読あり 9(66), 2018, 32609-32623.

〔学会発表〕(計 6 件)

小屋 美博, 劉 文亭, 杉山 麻衣, 吉原 雅人, 千賀 威, 那波 明宏, 吉川 史隆, 梶山 広明. MITF は卵巢癌細胞において浸潤に寄与している. 第77回日本癌学会学術総会, 2018

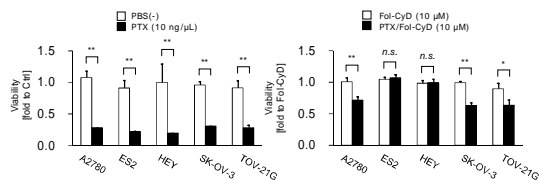


図2 各種薬剤で処理した細胞の生存率

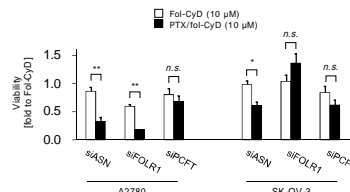


図3 A2780細胞はFOLR1非依存的にPTX/fol-CyDに傷害される

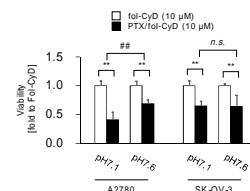


図4 低pHによる細胞傷害活性への影響

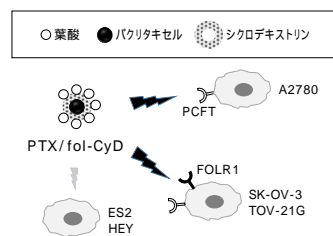


図5 葉酸修飾シクロデキストリンはPCFT発現細胞も標的化する

年 9 月 27 日-9 月 29 日 .

吉原雅人, 梶山 広明, 杉山 麻衣, 小屋 美博, 山北 由彦, 伊吉 祥平, 那波 明宏, 吉川 史隆 . 卵巣癌腹膜播種巣における多様性の創出 : 癌関連腹膜中皮細胞と Notch シグナルの役割 . 第 17 回 日本婦人科がん分子標的研究会, 2018 年 6 月 21 日-6 月 22 日 .

伊吉 祥平, 梶山 広明, 吉原雅人, 杉山 麻衣, 小屋 美博, 山北 由彦, 那波 明宏, 吉川 史隆 . 腹膜播種巣における腹膜中皮細胞による浸潤フロンティア形成 . 第 17 回 日本婦人科がん分子標的研究会, 2018 年 6 月 21 日-6 月 22 日 .

小屋 美博, 吉原 雅人, 梶山 広明, 山下 守, 吉川 史隆, 那波 明宏 . 卵巣癌において CSPG4 は細胞浸潤に大きく寄与している . 第 70 回 日本産科婦人科学会学術講演会, 2018 年 5 月 10 日-5 月 13 日 .

杉山 麻衣, 梶山 広明, 吉原 雅人, 小屋 美博, 横井 暁, 山下 守, 那波 明宏, 吉川 史隆 . 表層上皮性卵巣癌における Notch シグナルを介した腹膜中皮細胞の役割 . 第 70 回 日本産科婦人科学会学術講演会, 2018 年 5 月 10 日-5 月 13 日 .

三木 梨可, 小谷 友美, 澤田 雅子, 小屋 美博, 山下 守, 伊藤 由美子, 牛田 貴文, 今井 健史, 中野 知子, 炭 誠二, 吉川 史隆, 那波 明宏 . Notch 経路を介した S1P レセプターのスイッチが EVT の浸潤を制御する . 第 70 回 日本産科婦人科学会学術講演会, 2018 年 5 月 10 日-5 月 13 日 .

〔図書〕(計 0 件)

〔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

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小屋 美博

ローマ字氏名：(KOYA, Yoshihiro)

研究協力者氏名：山北 良彦

ローマ字氏名：(YAMAKITA, Yoshihiko)

研究協力者氏名：武藤 義文

ローマ字氏名：(MUTOH, Yoshifumi)

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。