

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591754
 研究課題名（和文）
 尿路性器癌に対するテロメラゼ活性を標的とした新規ウイルス療法の開発研究
 研究課題名（英文）The development study of the new gene therapy that assumed telomerase activity for urinary cancers.
 研究代表者
 賀来 春紀（KAKU HARUKI）
 岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師
 研究者番号：60346426

研究成果の概要：

本研究は尿路性器癌に対するテロメラゼ活性を標的とした新規ウイルス療法の開発研究を目的とした。研究期間内に転移癌を含む前立腺癌、腎癌に対する有効性、他の療法との併用効果の増強が確認された。一方、Telomelysin と新規癌抑制遺伝子 REIC との併用効果は癌種によって効果は一定ではなく、新規ウイルス Armed-Telomelysin (Telomelysin-REIC) の作製に至らなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	570,000	3,970,000

研究分野：泌尿器科悪性腫瘍、遺伝子治療、細胞治療

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腫瘍学

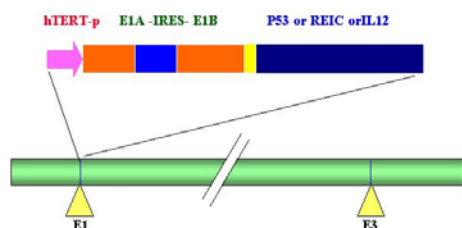
1. 研究開始当初の背景

本研究の対象癌種は尿路性器癌とする。進行尿路性器癌では手術不能例が多く、また手術後の再発率も高い。現在のところそのような症例に対する治療は抗癌化学療法が中心であるが、必ずしも満足すべき効果を上げているとは言い難い。そこで進行癌に対するあらたな治療法として、癌に対する特異性を高めた

治療法の開発が望まれている。

岡山大学（藤原ら）は遺伝子治療用のアデノウイルスベクターにおいて非増殖性を獲得するために欠損させていた E1 遺伝子を、テロメラゼ（hTERT）・プロモーターにより発現させることにより、癌特異的に増殖可能な変異アデノウイルス（Tumor-specific Replication-competent Adenovirus: テロメ

ライシン:Telomelysin OBP-301) を作成した。テロメライシンは正常細胞に影響を及ぼさなく、肺癌、大腸癌などの癌細胞に対する殺細胞効果が確認された。



尿路性器癌においても Telomerase 活性が高いことから、Telomerase を標的にする治療の可能性が指摘されている。予備的な実験結果ではあるが尿路性器癌に対する有効性が確認されたために本研究の着想に到った。

一方、REIC/Dkk-3は、岡山大学でヒト正常線維芽細胞の不死化に伴って発現が低下する遺伝子として同定され (BBRC, 289:257-263, 2001)、癌細胞において特異的にアポトーシスを誘導する (Cancer Res, 65:9617-9622, 2005)。本研究は前立腺癌細胞株LNCaPにTelomelysinとAd-REICを同時感染させ、TelomelysinとAd-REICとの併用による抗腫瘍効果の向上の有無を明らかにし、より強力な武装化Telomelysinを作製する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、岡山大学において独自に開発されたテロメラーゼ・プロモーター発現腫瘍特異的制限増殖型アデノウイルス (以下 テロメライシン: Telomelysin) の尿路性器癌に対する有効性を確認するとともに、Telomelysinに癌抑制遺伝子p53 などの治療遺伝子を組み込んだ新規腫瘍特異的制限増殖型アデノウイルス (Armed-Telomelysin : 武装型テロメライシン) を作製し、尿路性器癌に対する有効性の向上を確認し、新規ウイルス療法の確立を目指すことである。具体的

には以下のことを明らかにする。

- (1) 腫瘍特異的制限増殖型アデノウイルス Telomelysin の尿路性器癌における選択的増殖性の確認と抗腫瘍効果の検討を行う。
- (2) 腫瘍特異的制限 Telomelysin に治療遺伝子として p53、REIC (Reduced Expression in Imortalized Cells) などを組み込んだ新規ウイルス (Armed-Telomelysin) を作製するとともに、尿路性器癌における選択的増殖性の確認と抗腫瘍効果の検討を行う。

3. 研究の方法

- (1) 腫瘍特異的制限増殖型アデノウイルス Telomelysin の尿路性器癌細胞株における抗腫瘍効果の検討

①前立腺癌、腎癌に対するTelomelysinの抗腫瘍効果の検討を行い、転移性癌に対する治療効果の有無を検討する。

RT-PCR 定量法にて各種ヒト尿路性器癌細胞株における hTERT 活性を調べ、癌細胞株およびヒト正常細胞に Telomelysin を感染させ、*in vitro* にて各種ヒト尿路性器癌細胞株における選択的増殖性およびベクター濃度依存性に殺細胞効果を検討する。

各種ヒト尿路性器癌細胞株を用いてヌードマウス皮下移植モデルを作製し、*in vivo* にて、Telomelysin 抗腫瘍効果を検討する。

さらに、転移性癌モデルを作製、Telomelysin の転移性癌に対する抗腫瘍効果を検討する。

- ②腎癌においてTelomelysinと免疫療法 (IL2) との併用効果の効果を検討する

- (2) 新規ウイルス Armed-Telomelysin の作製

前立腺癌に対するTelomelysinと新規癌抑制遺伝子REICなどとの併用療法の効果を検討し、新規ウイルスArmed-Telomelysinの作製を行う。

Telomelysinと新規癌抑制遺伝子ベクターAd-REICを同時感染させ、2剤の遺伝子治療による抗腫瘍効果について検討し、新規ウイルスArmed-Telomelysinを作製する。

4. 研究成果

(1) 腫瘍特異的制限増殖型アデノウイルスTelomelysinの尿路性器癌細胞株における抗腫瘍効果の検討

①前立腺癌、腎癌に対するTelomelysinと新規癌抑制遺伝子REICなどとの併用療法の効果を検討する。

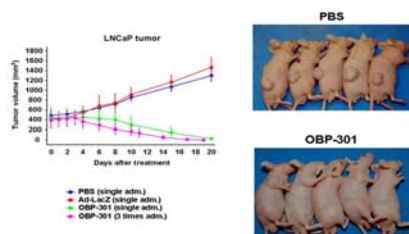
前立腺癌において、RT-PCR定量法にてヒトの前立腺癌細胞株LNCaP, PC3, DU145においてhTERT活性の上昇が認められた*in vitro*にて、Telomelysinの前立腺癌細胞株における選択的増殖性およびベクター濃度依存性に殺癌細胞効果を証明した。正常前立腺細胞への細胞障害は認められなかった。*in vivo*実験では、前立腺癌細胞株LNCaPのヌードマウス皮下移植モデルを作製し、腫瘍内にTelomelysinを3日間連日投与した。Telomelysin投与群において、投与20日後にすべてのマウスの腫瘍が肉眼的に消失した。さらに、マウス両側皮下腫瘍モデルにおいて片側腫瘍内へのTelomelysin投与により、対側腫瘍へのE1遺伝子発現および対側腫瘍の縮小が確認された。これらの結果は、世界で初めて、Telomelysinの前立腺癌細胞株に対する強い抗癌効果を示したものである。また、皮下腫瘍モデルにおいて、投与した局所癌のみならず遠隔癌についても効果が認められるという結果は、転移癌の治療が癌治療の至上命題となっている臨床家にとって、非常に

魅惑的なものである。

腎癌において、*in vitro*実験にて各種ヒト腎細胞癌細胞株(Caki-1、Caki-2、RENCA、KPK-1)に対するTelomelysinの抗癌細胞効果が確認された。また、*in vivo*実験では、腎癌細胞株Caki-1のヌードマウス皮下腫瘍モデルにおいて、Telomelysin投与により皮下腫瘍の増殖が有意に抑制された。

②腎癌においてTelomelysinと免疫療法(IL2)との併用効果の効果を検討する

腎細胞癌株RENCAを用いてルシフェラーゼ遺伝子恒常発現RENCA細胞株を独自に作製し、同癌の肺転移マウスモデルを用いたIVIS(小動物内における発光を検知する機器)による癌細胞・腫瘍の評価系を、岡山大学において



初めて確立した。この系においてルシフェラーゼを指標に腫瘍のサイズを経時的に観察することにより、Telomelysinの静脈内投与およびIL-2の腹腔内投与による治療群において、腎腫瘍のみならず、肺転移巣に対しても有意な抗腫瘍効果が確認された。フローサイトメトリーによる末梢血中の制御性T細胞(CD4+CD25+陽性細胞)はこの併用治療群において有意に減少しており、実質的な抗癌免疫賦活の可能性が示唆されている。また、Telomelysinを静脈内投与による肝臓細胞の組織学的傷害像は認められず改めて本剤の腫瘍・癌選択性が証明された。すなわち、腎癌においてもTelomelysinの高い殺癌細胞効

果を確認し、さらには Telomelysin の転移癌に対する抑制効果を証明した。

(2) 新規ウイルス Armed-Telomelysin の作製

前立腺癌に対する Telomelysin と新規癌抑制遺伝子 REIC との併用療法による抗腫瘍効果の検討

各種前立腺癌細胞株 (LNCaP、PC-3、DU45) に Telomelysin と Ad-REIC を同時感染させ、2 剤の遺伝子治療の併用による抗腫瘍効果について検討した。 *in vitro* にて前立腺癌細胞株 LNCaP に Telomelysin と Ad-REIC を同時感染させ、2 剤併用による抗腫瘍効果の増強が証明された。また、前立腺癌マウス皮下腫瘍モデルを用いて、Telomelysin と Ad-REIC との併用による抗腫瘍効果の増強が認められた。しかし、PC-3、DU45 においては著明な増強効果は認められなかった。癌抑制遺伝子である REIC 遺伝子との併用遺伝子治療を行うことで、Telomelysin の癌細胞における選択的融解効果に加えて、REIC 遺伝子によるアポトーシス誘導作用、全身抗癌免疫賦活化効果などの抗腫瘍効果が加えられることが予想されるが、癌種によって効果は一定ではなく、新規ウイルス Armed-Telomelysin (Telomelysin-REIC) の作製に当たる根拠は不十分であった。今後、前立腺癌のホルモン感受性株および非感受性株での差にも焦点をあてて詳細なメカニズムの検討が必要である。

研究期間中に、泌尿器科領域の重要な前立腺癌、腎癌に対するテロメラーゼ活性を標的とした新規ウイルス療法の開発研究として、Telomelysin の抗癌・抗腫瘍効果とその安全性を証明してきた。また、Telomelysin と免疫療法 (腎癌) との併用効果が確認された。以上より、腫瘍特異的制限増殖型アデノウイ

ルス Telomelysin は、Oncolytic virus として尿路器癌に対しても有効性が期待され、尿路器癌の新しい治療法になり得る。

癌抑制遺伝子である REIC 遺伝子と Telomelysin との併用遺伝子治療の効果は癌種によって効果は一定ではないが、今後、前立腺癌のホルモン感受性株および非感受性株での差にも焦点をあてて詳細なメカニズムの検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Huang P., Watanabe M., Kaku H., Kashiwakura Y., Chen J., Saika T., Nasu Y., Fujiwara T., Urata Y., Kumon H. : Direct and distant antitumor effects of a telomerase-selective oncolytic adenoviral agent, OBP-301, in a mouse prostate cancer model. *Cancer Gene Therapy*. 15 :315-22. 2008 査読有
- ② Abarzua F., Sakaguchi M., Tanimoto R., Sonogawa H., Li D.W., Edamura K., Kobayashi T., Watanabe M., Kashiwakura Y., Kaku H., Saika T., Nakamura K., Nasu Y., Kumon H., Huh NH. : Heat shock proteins play a crucial role in tumor-specific apoptosis by REIC/Dkk-3. *Int J Mol Med*. 20 : 37-43, 2007 査読有
- ③ Nasu Y., Saika T., Ebara S., Kusaka N., Kaku H., Abarzua F., Manabe D., Thompson T.C., Kumon H. : Suicide gene therapy with adenoviral delivery of HSV-tK gene for patients with local recurrence of prostate cancer after

hormonal therapy. Mol Ther. 15 : 834-840, 2007 査読有

- ④ Murakami T., Ebara S., Saika T., Irie S., Takeda K., Maki Y., Miyaji S., Manabe D., Kaku H., Nasu Y., Tsushima T., Kumon H. : Routine transurethral biopsy of the bladder is not necessary to evaluate the response to bacillus calmette-guerin therapy. Acta Med Okayama. 61 : 341-344, 2007 査読有
- ⑤ 賀来春紀, 那須保友, 雑賀隆史, 公文裕巳 : 前立腺癌—基礎・臨床研究のアップデート—II. 臨床研究 治療 遺伝子治療 自殺遺伝子・サイトカイン遺伝子を用いた遺伝子治療. 日本臨牀 65 : 522-527, 2007 査読無
- ⑥ Kaku H., Saika T., Tsushima T., Nagai A., Yokoyama T., Abarzua F., Ebara S., Manabe D., Nasu Y., Kumon H. : Combination chemotherapy with estramustine phosphate, ifosfamide and cisplatin for hormone-refractory prostate cancer. Acta Med Okayama. 60 : 43-49, 2006 査読有
- ⑦ 賀来春紀, 藤原俊義, 公文裕巳, 渡部昌実, 黄 鵬, 陳 潔, 谷本竜太, フェルナンド アバルスア, 枝村康平, 真鍋大輔, 江原 伸, 雑賀隆史, 那須保友, 公文裕巳 : 岡山大学における前立腺癌遺伝子治療研究の現況と展望—ベータシククリサーチからトランスレーショナルリサーチへ—. 西日本泌尿器科. 69 : 221-229, 2006 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① Huang P : In vitro and In vivo Molecular Evidence for better Therapeutic

Efficacy of telomerase-selective oncolytic adenovirus (OBP-301) and Interleukin-2 in renal cell carcinoma. The World 5th Gene Therapy Congress. 2008.9.21. Shijiazhuang, China

- ② Huang P : Direct and distant antitumor effects of a telomerase-selective oncolytic adenoviral agent, OBP-301, in a mouse prostate cancer model. The second China-Japan Urological Congress. 2008.9.20. Kunming, China
- ③ Kaku H. : REIC/Dkk-3 stable transfectant indicates anti-tumor phenotype in mouse prostate cancer RM9 cells. 14thJSGT. 2008.6.13. Sapporo, Japan
- ④ Huang P. : Synergistic antitumor effects of telomerase-selective oncolytic adenovirus (OBP-301) and interleukin-2 in a mouse renal cell carcinoma model. The 11th American Society of Gene Therapy. 2008.5.29. Boston, USA
- ⑤ Kaku H. : The present and future of gene therapy for prostate cancer in Okayama university. The 1st China-Japan Urological Congress. 2007.11.17. Xiamen, China
- ⑥ Peng Hung : Antitumor effect of telomerase-selective oncolytic adenoviral agents, OBP-301(Telomelysin) in prostate Cancer. The 24th Korea-Japan Urological Congress. 2007.10.5. Cheongju, Korea
- ⑦ 黄 鵬 : Telomerase-specific replication-selective virotherapy for prostate cancer. 第 95 回日本泌尿

器科学会総会 2007. 4. 15. 神戸

- ⑧ 賀来春紀 : Telomerase-specific replication-selective virotherapy for prostate cancer. 第12回日本遺伝子治療学会. 2006. 8. 26. 東京

[図書] (計1件)

- ① 賀来春紀, 那須保友, 公文裕巳 (村井 勝, 奥山明彦, 内藤誠二編) : 遺伝子治療の最先端 泌尿器疾患治療の新しいストラテジー (メジカルビュー社, 東京) : 793, 2007 査読無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

賀来 春紀 (KAKU HARUKI)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号 : 60346426

(2) 研究分担者

那須 保友 (NASU YASUTOMO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号 : 20237572

藤原 俊義 (FUJIWARA TOSHIYOSHI)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・准教授

研究者番号 : 00304303

香川 俊輔 (KAGAWA SYUNSUKE)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号 : 00362971

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

黄 鵬 (HUANG PENG)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大

学院生