

研究種目：基盤研究(B)  
研究期間：2007 ～ 2009  
課題番号：19390286  
研究課題名（和文）：小児の固形癌への革新的遺伝子治療法となる増殖制御型アデノウイルスの開発

研究課題名（英文）：Development of innovative gene therapy of conditionally regulating adenovirus for treating pediatric solid cancer

研究代表者

小賤 健一郎 (KOSAI KENICHIROU)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：90301663

研究成果の概要（和文）：

「多因子で精密に癌を特異化可能な増殖制御型アデノウイルス」(m-CRA)に関し、以下の成果を得た。

1. 小児固形癌への Surv.m-CRA の開発

mutant E1B の発現を他のプロモーター(Osteocalcin)に置換した新型 Surv.m-CRA(OC)は、治療効果を減ずる事なく、癌（骨肉腫や前立腺癌）特異性が向上した。

2. 新たな m-CRA の開発

染色体異常に関連する4つの新規の m-CRA 治療薬を開発し、骨肉腫や小児がんを含む種々の癌治療に有効であることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

We previously developed a method to efficiently generate conditionally replicating adenovirus that target cancer with multiple-tumor specific factors (m-CRA). Based on this m-CRA technology, we in fact developed survivin-responsive m-CRA (Surv.m-CRA), which selectively replicate in and kill cancer cells (the most of which highly express survivin), as an attractive anticancer agent. Here we modified Surv.m-CRA and developed the improved Surv.m-CRA, which may increase anticancer effects and tumor-specificity, in order to develop an innovative therapy for treating pediatric solid cancer. The obtained results are the followings.

1. The development of Surv.m-CRA for treating pediatric solid cancer

We replaced the promoter driving mutated E1B with another tumor-specific promoter (osteocalcin) in the original Surv.m-CRA, resulting in a novel type of Surv.m-CRA(OC). Surv.m-CRA(OC) increased tumor-specificity in osteosarcoma and prostate cancer without reducing anticancer effect. In this study, we also identified a novel mechanism in viral replication and tumor therapy. The paper was submitted to a scientific journal (under review).

## 2. Novel m-CRAs that target chromosomal abnormality

We newly developed four m-CRAs that target chromosomal abnormality under the transcriptional regulation using either of four different promoters. We analyzed antitumor effects and clinical utility of the new m-CRAs in animal studies. We obtained the important results that the new m-CRAs had sufficient antitumor effects and tumor-specificity (i.e., safety), suggesting that these m-CRAs may be a innovative anticancer agents. The patent was applied and the paper is being written.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度			
2007年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：遺伝子、ウイルス、癌、トランスレーショナルリサーチ、バイオテクノロジー

### 1. 研究開始当初の背景

癌への遺伝子治療は、臨床試験が国内外で一万人前後の患者で行われ、「高い安全性」と「ある程度の治療効果」という結果が明確になっている。当初期待された癌根治レベルの成果が得られていない最大の原因は、いかなる「非」増殖型のベクターを用いても *in vivo* の生体で 100%の癌細胞にもれなく遺伝子を導入することは物理的理由から不可能（腫瘍内注入でベクター液が達しない癌細胞には当然遺伝子も導入されない）であることで、この問題に対処していない戦略は遺伝子「未」導入癌細胞からの再発が起こるからである。申請者らはまず、治療遺伝子の研究でかなりこれを克服した。

この問題の根本解決として近年期待されているのが、ウイルス増殖が正常細胞では阻止され、癌細胞内では旺盛に起こるように遺伝子改変した癌特異的増殖型アデノウイルス (CRA ; Conditionally replicating adenovirus) の開発である。CRA は、「生体内での高効率かつ癌細胞特異的な治療遺伝子導入」と「増幅ウイルス蛋白による癌細胞特異的な溶解死」を可能とする、新世代の癌遺伝子治療ベクターとして期待されている。しかしこれまでの CRA は、「単一因子での癌特異性の不十分さ」と「効率的な標準化作製技術がないことによる研究の非効率さ」という二つの科学技術的困難から、その大きな潜在能力が完全には発揮できていなかった。申請者らは最近、

「多因子で精密に癌特異化可能な CRA (m-CRA)を迅速効率に作製可能とする初めての標準化作製技術」を独自開発してこの問題を解決し(*Gene Ther.* 2005 ; 国際特許出願中)、さらに本技術で実際に既存の CRA を凌ぐ性能の新規 m-CRA の開発にも成功した(*Cancer Res.* 2005)。

一方、神経芽腫、肝芽腫、骨肉腫などいわゆる小児の固形癌は近年の治療の進歩はみられるものの、特に浸潤・転移症例は未だ予後が悪く、革新的治療法の開発が切望されている。しかし小児固形癌への遺伝子治療の開発は世界的にも進んでおらず、さらに小児固形癌に焦点を当てた CRA の研究開発は世界でも未だなされていない。

これらの研究背景を元に、小児がんを対象にした m-CRA 治療の本研究を着想して、実施した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、小児癌の革新的治療法開発を目標に、独自の m-CRA 研究を進めることである。具体的には、以下である。

Surv.CRA を基盤として、独自技術の m-CRA 作製法でさらに様々に改変した本格的な Surv.m-CRA を開発すれば、それはより精密に癌のみを特異的に (安全に)、より強力に治療する、革新的な癌遺伝子治療ができると思われる。よってそのような改良型の Surv.m-CRA を開発し、その癌治療効果と癌特異性を検証する。

一方、染色体の制御過程関連して癌でも高発現しているであろう分子 (2 family、計 4 プロモター) でウイルス増殖制御される新型 m-CRA の開発を行う。

## 3. 研究の方法

### 1) ウイルス増殖部の4因子制御による

「癌特異性」の増強した Surv.m-CRA

### 1. 各種 Surv.m-CRA の作製

E1A を Survivin promoter で発現制御する基本形から、さらなる m-CRA 化として、(a)E1A の mutant 化 (Rb 結合領域欠損による Rb 異常特異的増殖の加味)、(b)E1B の発現を他の腫瘍特異的分子 (オステオカルシンなど) の promoter で制御、(c)E1B の mutant 化 (p53 結合領域欠損による p53 異常特異的ウイルス増殖の加味) の各因子を組み入れた、「4 因子でウイルス増殖制御」する Surv.m-CRA を作製する。

### 2. 内因性の発現と Promoter 解析

小児固形癌を含む各種の癌と正常の細胞株で、内因性の Survivin の発現量を調べる。また Survivin promoter 制御下に LacZ 遺伝子を発現する非増殖型アデノウイルスベクターを感染後にプロモーターアッセイを行う。オステオカルシンはビタミン D で発現増強するという報告があるので、さらにビタミン D の有無でも調べる。

### 3. Surv.m-CRA の *in vitro* での性能解析

これらの種々の Surv.m-CRA を、小児固形癌を含む各種の癌と正常の細胞株とで感染実験を行い、*in vitro* で癌の特異化と治療効果を検討する。

### 4. Surv.m-CRA の *in vivo* 治療実験

ヌードマウス皮下に植え付けた Xenograft の癌動物モデルに *in vivo* で Surv.m-CRA を注入し、治療効果を解析する。

### 2) 染色体異常を標的とする新たな m-CR の開発

いずれも同上 1)の方法で行う。

#### 4. 研究成果

1) ウイルス増殖部の4因子制御による「癌特異性」の増強した Surv.m-CRA

##### 1. ウイルス作製

Surv.m-CRA(OC)を中心に調整を行った。

##### 2. 内因性発現とプロモーター活性

複数の骨肉腫細胞株、ならびに前立腺がん細胞株で、オステオカルシンの内因性発現は、様々なレベルではあったが発現していた。

プロモーター活性は、オステオカルシン発現細胞ではみられた。しかし意外なことに、前立腺がんではオステオカルシンのプロモーター活性は高かったが、骨肉腫細胞では活性はみられるものの、そのレベルは低かった。

さらにビタミンDの添加により、内因性オステオカルシンの発現、ならびにオステオカルシンプロモーターの活性は増強した。しかし、骨肉腫細胞では活性増強があっても、そのレベルは依然低いものであった。

##### 3. Surv.m-CRA(OC)の in vitro での癌特異的細胞障害効果の増強

骨肉腫細胞ではオステオカルシンプロモーターの活性は低いものの、Surv.m-CRA(OC)は活性の強い前立腺がんだけでなく、骨肉腫細胞に強力な細胞傷害作用を示した。またビタミンDを加えない状態でも、同様の結果であった。しかし正常細胞やオステオカルシンを発現しない細胞に対する傷害は、従来の Surv.m-CRA よりも、今回開発した Surv.m-CRA(OC)の方が著明に抑制されていた(癌特異性、安全性が向上していた)。

##### 4. In vivo 治療実験

骨肉腫の Xenograft の腫瘍動物モデルへの投与(腫瘍内注入)では、Surv.m-CRA(OC)は、ビタミンD未添加にもかかわらず、オリ

ジナルの Surv.m-CRA と同程度の腫瘍縮小効果を示した。

##### 2) 「癌の染色体異常」を標的治療する新規 m-CRA の開発

1. 小児がんを含む複数の癌細胞および正常細胞における内因性 mRNA 発現レベルに差がみとめられ、癌特異性がみられた。

2. 今回の4つの promoter 活性は、正常細胞では発現がみられず、癌細胞と正常細胞の間に顕著な promoter 活性の差がみとめられた。両分子の promoter とともに癌特異的発現制御の再現性が得られた。

3. これら4分子プロモーターで制御される新規 m-CRA はいずれも promoter 活性に関連して、癌細胞において高い癌特異性と癌治療効果が期待できる成果が得られた。

4. 動物モデルでも、抗腫瘍効果が確認できた。

<考察：今回の成果の意義>

E1Bのプロモーターをさらに別の腫瘍特異的プロモーターに置換することは、そのプロモーター活性に依存せず、十分な癌治療効果を維持し、癌特異性の向上をきたすことが明確にできた。よって多くの腫瘍特異的プロモーターはが、革新的な m-CRA 開発に使用できるということで、重要な成果である。また新規の m-CRA も有用である。今後この成果を踏まえ、小児癌への臨床化へ向かって、さらなる研究を進める予定である。

#### 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6件)

1. Li L, Kosai K, et al: Postinfarction gene therapy with adenoviral vector expressing decorin mitigates cardiac remodeling and

- dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 査読有 97(4):H1504-13. 2009
2. Umeno H, Kosai K, et al.: Efficacy of autologous fat injection laryngoplasty with an adenoviral vector expressing hepatocyte growth factor in a canine model. *J Laryngol Otol* 査読有, 123 Suppl 31:24-9. 2009
  3. Okada H, Kosai K, et al.: Combined therapy with cardioprotective cytokine administration and antiapoptotic gene transfer in postinfarction heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 査読有, 296(3):H616-26. 2009
  4. Kondo T, Kosai K, et al.: Application of an adenoviral vector encoding soluble transforming growth factor-beta type II receptor to the treatment of diabetic nephropathy in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 査読有, 35(11):1288-93. 2008
  5. Esaki M, Kosai K, et al.: Treatment with an adenoviral vector encoding hepatocyte growth factor mitigates established cardiac dysfunction in doxorubicin -induced cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 査読有, 294(2): H1048-1057, 2008
  6. Chen XH, Kosai K, et al.: In vivo hepatocyte growth factor gene transfer reduces myocardial ischemiareperfusion injury through its multiple actions. *J Card Fail*. 査読有, 13(10):874-883, 874-883, 2007

[学会発表] (計 11 件)

■ 国際学会

1. Taro Kamisanuki, Ken-ichiro Kosai, et al.: CD9 siRNA gene therapy inhibits diverse growth factors-induced angiogenesis in vitro and in vivo. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2010 Annual

Meeting, May 2-6, 2010 (Florida, USA)

2. Murofushi Y, Kosai K. et al: Conditionally replicating adenovirus regulated with 4 independent cancer-specific factors enhances cancer-specificity without reducing potent anti-cancer effect; the importance of E1B promoter. The American Society of Gene Therapy's 11th Annual Meeting, May 28-Jun 1, 2008 (Boston, USA)
3. Yoshiteru Murofushi, Ken-ichiro Kosai. et al.: Survivin-Responsive Conditionally Replicating Adenovirus Additionally Regulated with Cancer Specificity without Reducing Anti-Cancer Effect.(国際・一般演題) The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, May 30-Jun 3, 2007 (Seattle, Washington, USA)

■ 国内学会

1. 小賤健一郎. :多因子でウイルス増殖制御／癌特異化するアデノウイルス (m-CRA) の開発と治療応用を目指して. (国内・特別講演) 第 12 回 日本神経ウイルス研究会学術集会. 2008 年 7 月 17-19 日 (屋久島)
2. 神田純一、小賤健一郎、等.:多因子増殖制御増殖型アデノウイルスによる新規遺伝子治療法の開発. 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会、2007 年 10 月 25-26 日 (浜松)
3. 室伏善照, 小賤健一郎. 等 : *Survivin*/CEA-responsive conditionally replicating adenovirus enhances cancer specificity with potent anti-cancer effect. 第 66 回日本癌学会学術集会, 2007 年 10 月 3-5 日 (横浜)
4. 小賤健一郎, 室伏善照.: 独立 2-6 因子で癌を標的化・治療する癌特異的増殖制御

型アデノウイルス. 第66回日本癌学会学術集会, 2007年10月3-5日(横浜)

5. Yoshiteru Murofushi, Ken-ichiro Kosai. et al.: Conditionally Replicating Adenovirus Regulated by Survivin and CEA Promoters Exerted More Strict Cancer Specificity and Potent Anti-Cancer Effect. (国内・一般演題) 第13回日本遺伝子治療学会, 2007年6月28-30日(愛知)

\*その他3件

[産業財産権]

○出願状況(計3件)

名称: Xプロモーターを含む増殖制御型ウイルスベクター

発明者: 小賤健一郎

権利者: 鹿児島大学

種類: 特許

番号: 特願2010-223150

出願年月日: 2010年9月30日

国内外の別: 国内

名称: サービビンプロモーターを含む増殖制御型ウイルスベクターによる造血器腫瘍の遺伝子治療

発明者: 小賤健一郎、有馬直道、鈴木紳介

権利者: 鹿児島大学

種類: 特許

番号: 特願2010-070942

出願年月日: 2010年3月25日

国内外の別: 国内

名称: 血管新生抑制剤

発明者: 小賤健一郎、坂本泰二、上笹貫太郎

権利者: 鹿児島大学

種類: 特許

番号: 特願2009-105170

出願年月日: 2009年4月24日

国内外の別: 国内ならびに国外

○取得状況(計2件)

名称: 増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法及びその作製用キット

発明者: 小賤健一郎、永野聡

権利者: 中部TLO

種類: 特許

番号: 特許第4478775号

取得年月日: 2010年3月26日

国内外の別: 国内

名称: 胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法及び単離又は可視化用キット

発明者: 小賤健一郎、高橋知之

権利者: 小賤健一郎

種類: 特許

番号: 特許第4624100号

取得年月日: 2010年11月12日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~anatomy2/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小賤 健一郎 (KOSAI KENICHIROU)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 90301663