

機関番号：34519

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591871

研究課題名 (和文) 膀胱癌に対する制限増殖型アデノウイルスベクターを用いた新規治療法の開発

研究課題名 (英文) Conditionally Replicative Adenovirus for Targeting Bladder Cancer.

研究代表者

寺尾 秀治 (TERAO SHUJI)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：10457103

研究成果の概要 (和文)：

我々は、これまで行われてきたアデノウイルスベクターを用いた治療で効果が認められなかったタイプの膀胱癌に対して、バルプロ酸という薬剤を遺伝子治療前にあらかじめ投与することで、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療の効果を增强することが出来るかという課題について実験を行った。結果として、培養実験と動物実験において、バルプロ酸を前投与することでアデノウイルスベクターによる遺伝子治療の効果を增强することが可能であった。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we examined whether the pre-treatment of valproic acid enhance the therapeutic effect of gene therapy using adenovirus vector for bladder cancer which do not have a significant effect on therapeutic outcome of adenovirus gene therapy. Our data showed the feasibility of the enhancement of adenovirus gene therapy using the pre-treatment of valproic acid in *in vitro* and *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞・遺伝子治療

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：膀胱癌、遺伝子治療、AdMKE1a、導入効率、バルプロ酸 Na、

1. 研究開始当初の背景

近年、膀胱癌は罹患数、死亡数とも増加傾向が見られており、米国では2007年に新たに膀胱癌と診断される患者数は約6万7千人、年間死亡者数は1万3千人を超えると推定されている。膀胱筋層に浸潤しかつリンパ節および遠隔転移を認めない場

合、手術療法（根治的膀胱全摘除術）あるいは放射線療法が選択される。しかし、根治的膀胱全摘除術の再発率は約50%と高く、筋層を超える浸潤およびリンパ管浸潤を有する場合には、5年生存率は30-50%と低い。一方、手術療法を選択せず放射線療法を施行された場合も、5年生存率

は約 30%と低い。近年、プラチナ製剤をベースとした術前他剤併用抗癌化学療法が試みられているが、生存率を劇的に改善するものではない。また、膀胱温存の観点から、経尿道的膀胱腫瘍切除術後に抗癌化学療法、放射線療法を施行する試みも行われているが、手術療法と比較して有効であるかは現在のところ不明である。さらに、手術療法を施行された患者では、尿路変更術が施行されるため術後 QOL の低下を招き、放射線療法を施行された患者においても、約半数に排尿障害、頻尿および下部消化管障害のため QOL の低下を引き起こす。このようなことから、既存の治療法と比較して、より治療効果がありかつ QOL を損なわない新たな治療法の開発が早急に望まれている。癌に対する遺伝子治療臨床研究の領域において、欧米を中心としてアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法が開発が進んでおり、中でも増殖型アデノウイルスベクターは今後臨床研究の主流となりつつある。これまでは癌細胞周囲の正常細胞へのアデノウイルス感染による危険性が危惧され、非増殖型アデノウイルスベクターを用いた基礎及び臨床研究が盛んに行われていたが、非増殖型であるがゆえに標的となる腫瘍全体へのウイルスベクターの暴露が制限され、臨床的な抗腫瘍効果が十分には期待出来ないという問題を抱えていた。また安全性の面から、癌に対する遺伝子治療においては、対象とする遺伝子を癌細胞に特異性に効率良く発現させるために、癌細胞で

特異性に活性化される腫瘍特異性プロモーターを用いた癌遺伝子治療法の基礎研究、および臨床試験が盛んにおこなわれている。これまでに、我々は前立腺癌に対しての腫瘍特異性プロモーターであるオステオカルシンプロモーターを組み込んだアデノウイルスベクターの開発を行い、その臨床応用として当ウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究を行った実績がある。また、膀胱癌に対する腫瘍特異性プロモーターとして MK プロモーターに着目し、膀胱癌細胞株に対する MK プロモーターの有用性を証明した。

しかし、増殖型アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療をもってしても、特に悪性度の高い癌においては、現状では期待されたほどの治療効果が得られていない。その原因の一つとして、アデノウイルスベクターの受容体である Coxsackie and Adenovirus Receptor (CAR) の低発現による低い導入効率が挙げられる。膀胱癌細胞株を用いた我々の基礎実験においても、KK47 と比較して T24 では CAR の発現が極めて低く、よってアデノウイルスベクターの導入効率も非常に低い。近年、VPA を用いることで、CAR の発現を上昇させてアデノウイルスベクターの導入効率を向上させたとの報告があり、このような薬剤と遺伝子治療との併用により、悪性度が高くかつアデノウイルスベクターの導入効率が低い癌細胞においても高い抗腫瘍効果が期待できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、まず、膀胱癌に対する腫瘍特異性プロモーターとして有用である MK プロモーターを組み込んだ制限増殖型アデノウイルスベクター (AdMKE1a) を作製し、悪性度の異なるさまざまな膀胱癌細胞株である KK47、5637、T24 に対する本ウイルスベクターの有用性を検討する。次に VPA 投与による各細胞株における CAR の発現および本ウイルスベクターの導入効率に及ぼす影響を検討することで、VPA 投与により各膀胱癌細胞株に対するアデノウイルスベクターの導入効率が向上することを *in vitro*, *in vivo* において明らかにする。次に、本ウイルスベクターと VPA との併用療法における抗腫瘍効果を検討することで、VPA 投与によるアデノウイルスベクターの導入効率向上が、各膀胱癌細胞株の殺細胞効果の向上に繋がることを *in vitro*, *in vivo* において検討する。

3. 研究の方法

(1)制限増殖型アデノウイルスベクターの作製。

まず、5 型アデノウイルスの配列を有するプラスミドベクター (pXC1:E1a gene を含む) から 492 ~ 552bp 領域を欠損させた (pXC1-491 プラスミド)。この pXC1-491 プラスミドに MK プロモーター (595bp) をライゲーションさせて pXC1-MK プラスミドを作製した。次に、293 細胞を用いて、pXC1-MK プラスミドと E3 領域を持つアデノウイルス DNA の pBHGE3 との相同組み換えを行い、MK プロモーターを組み

込んだ制限増殖型アデノウイルスベクター (AdMKE1a) を作製した。293 細胞を用いて作製された AdMKE1a を増殖させウイルスベクターを精製し、TCID50 法にてウイルスタイターを測定した。なお、PCR を行うことで、ワイルドタイプアデノウイルスの混入がないことを確認した。

(2)ヒト膀胱癌細胞株に対する CAR の発現および AdMKE1a 導入効率の検討。

ヒト膀胱癌細胞株 (KK47, 5637, T24) を培養し、TRIzol Reagent を用いて RNA を抽出した後、定量的リアルタイム PT-PCR 法により各ヒト膀胱癌細胞株における CARmRNA の発現を検討した。次に、各ヒト膀胱癌細胞株におけるアデノウイルスベクターの導入効率を検討するために、Ad5-CMV- β gal を 96-well plate に 1×10^4 cells/well で調整しておいた各ヒト膀胱癌細胞株に感染させ、 β gal 染色法を行うことで各ヒト膀胱癌細胞株に対する導入効率を検討した。最後に、各ヒト膀胱癌細胞株に対する CARmRNA の発現とアデノウイルスベクターの導入効率との関係を解析した。

(3)VAP 投与による CAR の発現および AdMKE1a 導入効率の検討。

各種ヒト膀胱癌細胞株 (KK47, 5637, T24) を T-150 フラスコで培養し 60 ~ 70% コンフルエントの状態に調整した。VPA を 0.25mM の濃度で投与し、投与 24 時間後、48 時間後および 72 時間後に TRIzol Reagent を用いて RNA を抽出した後、定量的リアルタイム PT-PCR 法により各種ヒト膀胱

癌細胞株における CARmRNA の発現を検討した。また、VPA 非投与群、投与群における CARmRNA の発現の比較および VPA 投与群における VPA の濃度と CARmRNA 発現との関係を解析した。次に、96-well plate に 1×10^4 cells/well で調整しておいた各種ヒト膀胱癌細胞株に、VPA を 0、0.5、1.0、2.0 および 5.0mM の濃度で投与し、投与投与 24 時間後、48 時間後および 72 時間後に Ad5-CMV- β gal を感染させ、 β gal 染色法を行うことで各種ヒト膀胱癌細胞株に対する導入効率を検討した。また、VPA 非投与群、投与群における導入効率の比較、および CARmRNA の発現と導入効率との関係を解析した。

(4) AdMKE1a と VAP との併用療法による抗腫瘍効果の検討。

CARmRNA 発現およびアデノウイルスベクターの導入効率の最も低い細胞株を用いて *in vivo* における抗腫瘍効果の検討を行った。Balb/C nu/nu マウスの背側皮下に該当する細胞株 (1×10^6 個/腫瘍) を移植し、マウス膀胱癌皮下腫瘍モデルを形成した。腫瘍径が 5mm に到達した時点で、まず VPA 投与 3 日および 7 日後に腫瘍部位における CAR の発現を検討した。次に VPA の投与 1 週間後に、 1.0×10^9 plaque-forming unit (PFU) の AdMKE1a を皮下腫瘍内に投与した。本実験群は、VPA 投与群と非投与群に分け、それぞれに対して非治療群 (PBS 投与)、AdMKE1a 投与群に振り分けた。非治療群の最大腫瘍体積が 4000mm^3 に到達した時点でマウスを兵庫医科大学での動物実験規準に従

って屠殺した。

4. 研究成果

(1) 制限増殖型アデノウイルスベクター (AdMKE1a) の作製

まず 5 型アデノウイルスの配列を有するプラスミドベクター (pXC1:E1a gene を含む) から 492~552bp 領域を欠損させ (pXC1-491 プラスミド)、この pXC1-491 プラスミドに MK プロモーター (595bp) をライゲーションさせて pXC1-MK プラスミドを作製した。次に、293 細胞を用いて pXC1-MK プラスミドと E3 領域を持つアデノウイルス DNA の pHGE3 との相同組み換えを行うことで、目的のウイルスベクター (AdMKE1a) を作製した。さらに 293 細胞を用いて、作製された AdMKE1a を増殖させアデノウイルスベクターを精製し、TCID50 法にて精製ウイルスタイターを測定した。また、PCR を行うことで、ワイルドタイプアデノウイルスの混入がないことを確認した。

(2) 各細胞株における CARmRNA の発現

使用したヒト膀胱癌細胞株のうち、KK47, 5637 においては、それぞれ 3.4×10^{10} btu/ml、 2.2×10^9 btu/ml と高い導入効率を認めた。一方、T24 においては、 1.0×10^7 btu/ml と導入効率は低かったことから、KK47, 5637 と比較して T24 においては、AdMKE1a による抗腫瘍効果は期待できないと考えられた。

(3) T24 に対する VPA 前処置による CARmRNA の発現

24、48 及び 72 時間の VPA 前処置により CARmRNA 発現は無処置群と比較して、それぞれ約 4、5.7 及び 15.3 倍に向上した。

(4) T24 に対する VPA 前処置によるアデノウイルスベクターの導入効率

非前処置群ではアデノウイルスベクターの遺伝子導入効率は 1.0×10^7 btu/ml であったが、アデノウイルスベクターの遺伝子導入効

率が、72時間のVPA前処置をしたT24におけるアデノウイルスベクターの遺伝子導入効率は 1.2×10^8 btu/mlと非前処置群と比較して12倍の導入効率の向上を認めた。

(5)T24に対するVPA前処置によるアデノウイルスベクターの抗腫瘍効果 (*in vitro*)

Day 7の時点で非前処置群における抗腫瘍効果は100MOIで23.4%であった。一方、VPA前処置群では1、10及び100MOIの感染でそれぞれ21%、45.7%及び74.2%と高い抗腫瘍効果が認められたことから、VPAによる前処置によってアデノウイルスベクターの初回感染率が向上し、かつ腫瘍崩壊後の周囲の非感染細胞へのアデノウイルスベクターの2次感染効率も向上した可能性が示唆された。

(6)T24マウス皮下腫瘍モデルにおけるVPA前処置による腫瘍部でのCAR発現

非投与群と比較して、VPA投与3日後で1.7倍、投与7日後で1.9倍に向上した。

(7)T24マウス皮下腫瘍モデルにおけるVPA前処置によるアデノウイルスベクターの抗腫瘍効果 (*in vivo*)

コントロール群 (PBS投与群) と比較して、AdMKE1a単独群、VPA前投与+AdMKE1a群ともに有意に抗腫瘍効果を認めた。一方、AdMKE1a単独群とVPA前投与+AdMKE1a群では、VPA前投与+AdMKE1a群では、AdMKE1a単独群より約13%の抗腫瘍効果の改善を認めたが、有意差は認めなかった。

以上から、VPA前処置により、既存の遺伝子治療では効果が認められなかったヒト膀胱癌細胞株においても、一定の抗腫瘍効果の増強が確認された。またVPAはてんかんに対する薬剤として広く臨床現場で使用されており、その安全性も確認されていることから考えても、本研究での研究成果をもとに更なる検討を加えることで、今後の遺伝子治療臨床研究のプロトコルに組み込むことが可能で

あると考えられた。

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4件)

- ①後藤章暢, 寺尾秀治. 膀胱癌の遺伝子治療. 日本臨牀 腎・泌尿器科癌 2010;68 増刊号 4:230-4. 査読無
- ②Terao S, Shirakawa T, Acharya B, Miyata M, Hinata N, Tanaka K, Takenaka A, Hara I, Naoe M, Fuji K, Okegawa T, Higashihara E, Kamidono S, Fujisawa M, Gotoh A. A pilot study of quality of life of patients with hormone-refractory prostate cancer after gene therapy. *Anticancer Res* 2009;29:1533-7. 査読有
- ③Terao S, Acharya B, Suzuki T, Aoi T, Naoe M, Hamada K, Mizuguchi H, Gotoh A. Improved gene transfer into renal carcinoma cells using adenovirus vector containing RGD motif. *Anticancer Res* 2009;29:2997-3001. 査読有
- ④後藤章暢, 寺尾秀治. 遺伝子治療の展望. *Urology View* 2009;7:102-8. 査読有

[学会発表] (計7件)

- ①寺尾秀治, Acharya B, 鈴木透, 後藤章暢. ヒト膀胱癌細胞株に対するIAI. 3Bプロモーターを組み込んだ制限増殖型アデノウイルスベクターの有用性の検討. 第98回日本泌尿器科学会総会 2010. 4. 28, 盛岡.
- ②寺尾秀治, Acharya B, 鈴木透, 濱田雄行, 後藤章暢. ヒト膀胱癌細胞株に対するIAI. 3Bプロモーターを組み込んだ制限増殖型アデノウイルスベクターの有用性の検討. 第59回日本泌尿器科学会中部総会 2009. 10. 29, 金沢.
- ③Terao S, Acharya B, Suzuki T, Gotoh A. Improved gene transfer into renal carcinoma cells using an adenovirus vector. The 19th Annual Meeting of the International Urological Conference of Taiwan 2009. 8. 28, Kaohsiung, Taiwan.
- ④寺尾秀治, Acharya B, 鈴木透, 濱田雄行, 水口裕之, 後藤章暢. 膀胱癌細胞株に対するアデノウイルスベクターの導入効率向上の試み. 第97回日本泌尿器科学会総会 2009. 4. 17, 岡山.
- ⑤寺尾秀治, 白川利朗, Acharya B, 鈴木透, 乃美昌司, 濱田雄行, 田川雅敏, 田中一志, 武中 篤, 藤澤正人, 後藤章暢. ヒト膀胱癌細胞に対するミドカインプロモーターを組み込んだ増殖制限型アデノウイルスベクター(ADMKE1a)の有用性の検討. 第46回日本癌治療学会総会,

2008.10.29, 名古屋.

- ⑥ Terao, S., Shirakawa, T., Acharya, B., Suzuki, T., Hamada, K., Tagawa, M., Tanaka, K., Takenaka, A., Fujisawa, M. and Gotoh, A. Therapeutic efficacy of midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus vector for targeting the midkine-expressing human bladder cancer cells. 2008 International Society for Cell and Gene Therapy of Cancer China Conference, 2008.9.20, Shijiazhuang, China.
- ⑦ Terao S., Shirakawa T., Tanaka K., Takenaka A., Kamidono S., Fujisawa M. and Gotoh A. Therapeutic efficacy of midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus vector for targeting the midkine-expressing human bladder cancer cells. American Urological Association 2008 Annual Meeting(AUA2008), 2008.5.18, Orlando. U.S.A.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺尾 秀治 (TERAO SHUJI)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：10457103

(2) 研究分担者

後藤 章暢 (GOTOH AKINOBU)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：70283885

(3) 連携研究者

藤澤 正人 (FUJISAWA MASATO)
神戸大学・医学部・教授
研究者番号：30243314

田川 正敏 (TAGAWA MASATOSHI)
千葉県がんセンター・病理研究部・部長
研究者番号：20171572