

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月26日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390374

研究課題名（和文） 高分子ミセル内包RGD-TNF $\alpha$ を軸とする集学的がん遺伝子治療の開発研究課題名（英文） Multidisciplinary TNF- $\alpha$  based gene therapy using polyplex micelle

## 研究代表者

中野 賢二 (NAKANO KENJI)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・教授

研究者番号：00315061

## 研究成果の概要（和文）：

高分子ミセル型ベクターを用いて、TNF- $\alpha$ 遺伝子を軸として免疫遺伝子や転写因子 YB-1 RNA 干渉の併用治療を検討し、集学的がん遺伝子治療を開発することを目的とする。TNF- $\alpha$  遺伝子導入でがん細胞に活性酸素産生と細胞傷害が認められ、Rac-1 siRNA で活性酸素産生と細胞傷害は阻害され、がんを高発現する Rac-1 を介した活性酸素の産生が TNF- $\alpha$  遺伝子治療の作用機序と考えられた。腫瘍血管を標的化するリガンドの付いた RGD-hTNF- $\alpha$  と hTNF- $\alpha$  遺伝子治療で抗腫瘍効果を比較したところ、RGD-hTNF- $\alpha$  群が腫瘍の抑制が高かった。また、CD40L, GM-CSF 併用群が TNF- $\alpha$  単独群より抗腫瘍効果が高く、Th1 の指標：血中 IL-2, IFN- $\gamma$  濃度が高かったことから Th1 優位の免疫誘導が示唆された。更に、YB1-miRNA 治療は腹膜播種を有意に抑制し、YB-1 siRNA により血管内皮細胞にアポトーシス誘導、管腔形成能の抑制が生じ、皮下腫瘍においても YB-1 miRNA 治療により腫瘍の新生血管密度低下が認められた。腫瘍血管を標的とする汎用性の高い治療となる可能性が示唆された。マウス腹膜播種モデルの遺伝子治療で体重、血液検査で異常を認めなかった。更に、カンクイサルを用いた安全性評価は単回漸増法で施行し、臓器傷害、異常検査値を認めず、腹腔内投与での安全性が確認された。以上の結果より、高分子ミセル型ベクターの腹腔内投与による集学的がん遺伝子治療は、安全性に問題なく直接的抗がん効果のみならず抗腫瘍免疫も誘導できる治療法として期待できる。

## 研究成果の概要（英文）：

**Aim:** The purpose of this study is to examine the efficacy of TNF- $\alpha$ , immunogene and YB-1 miRNA multidisciplinary gene therapy on refractory cancers using non-viral vector of block co-polymer micelle. **Methods and Results:** TNF- $\alpha$  transduction produced reactive oxygen species through activated Rac-1 in cancer cells, resulting in cancer-preferential cytotoxicity. We constructed cyclic RGD ligand-fused TNF- $\alpha$  expression plasmid to examine the effect of targeting ligand for tumor vessels. The anti-tumor efficacy of RGD-hTNF- $\alpha$  gene therapy using polymer micelle for peritoneally disseminated cancer was greater than TNF- $\alpha$  gene therapy. Among various cytokine and chemokine genes, we found that the combined transduction of CD40L and GM-CSF induced the prolonged survival for mice with disseminated cancer compared with TNF- $\alpha$  alone and that serum concentrations of IL-2 and IFN- $\gamma$  were increased (Th1 dominant) by the combination therapy. Moreover, we designed RNA silencing of YB-1 by the miRNA expression to prevent cancer EMT triggered by TNF- $\alpha$ . YB-1 miRNA significantly inhibited tumor growth and prolonged the survival for mice with disseminated cancers. YB-1 siRNA induced apoptosis and inhibited tube formation for vascular endothelial cells in vitro, and YB-1 miRNA transduction decreased microvascular density of

subcutaneous tumor tissues. After YB-1 miRNA or TNF- $\alpha$  gene therapy using polymer micelle, body weight and blood examinations revealed no abnormal findings in dissemination mouse model. Dose-escalation test in macaca fascicularis also verified no injury for normal organs. **Conclusion:** Multidisciplinary gene therapy by TNF- $\alpha$ , immunogene and YB-1 miRNA transduction using block co-polymer micelle vector is a promising therapeutic strategy for intractable cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：TNF- $\alpha$ 、YB-1、CD40L、GM-CSF、高分子ミセル、miRNA、遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルスベクターを用いる遺伝子治療にはウイルス感染の副作用や創薬化の困難さが伴う。申請者は片岡、西山博士（東京大学工学部）らとの共同研究で、非ウイルス性の高分子ミセルを用いたがん遺伝子治療の有用性を動物実験で示した。

腫瘍壊死因子 TNF- $\alpha$ は多岐にわたる機能を持つサイトカインで、ROS産生を介した細胞傷害作用が知られる。[Berghe, et al: Mol Cell 2007; 26: 769-771] 全身投与による臨床試験は有害事象のため中止となったが、申請者は米国ピッツバーグ大学にて TNF- $\alpha$ 遺伝子治療の前臨床試験に従事し、膵がん、腹膜播種がんに対して TNF- $\alpha$ 遺伝子治療が高い抗腫瘍効果を呈することを見出した。

動物実験では正常組織に TNF- $\alpha$ 遺伝子治療による明らかな傷害は認められず、がんと正常組織の間に TNF- $\alpha$ シグナル応答性の相違が示唆される。Rac-1はROS産生に参与するNADPH oxidase活性をTNFR1シグナル下に亢進させる。膵がんや腹膜播種がんでは活性化しているRas、Srcの下流にRac-1はあるが、がんにおける関連性は未だ不明である。遺伝子治療による

持続的なTNF- $\alpha$ 発現がもたらすROS産生への影響を検討する必要がある。

TNF- $\alpha$ は腫瘍血管に傷害を与え高い抗腫瘍効果が期待できるが、同時にインテグリン $\alpha$ v $\beta$ 3を介した血管新生作用があり転移の誘発が懸念される。申請者はTNF- $\alpha$ にインテグリン $\alpha$ v $\beta$ 3特異的リガンド：RGDを融合させたRGD-TNF- $\alpha$ 遺伝子治療を開発し、より高い抗腫瘍効果があることを見出した。また、TNF- $\alpha$ を含めた治療による組織傷害は転移の要因：上皮間葉移行(EMT)を促進する。EMTの要因：Twist, YB-1やSnail RNAiによるEMT阻害の検討も重要となる。

TNF- $\alpha$ は免疫細胞の活性化を誘導するサイトカインでもあるが、がん組織へ免疫エフェクターが集積・浸潤しなければ抗腫瘍免疫は機能しない。本研究ではTNF- $\alpha$ に加えてケモカイン、サイトカインや可溶性TGF- $\beta$ 受容体等の複数の治療遺伝子による包括的な制御を試みる。癌局所浸潤樹状細胞の活性化で能動免疫を誘導すれば全身がんに対しても有効となる。

## 2. 研究の目的

高分子ミセルを用いたTNF- $\alpha$ 遺伝子治療の

作用機序や腫瘍血管標的化に関する検討を行うとともに、免疫遺伝子や転移因子に対する RNA 干渉の併用を検討し、集学的がん遺伝子治療を開発する。

1. 膵がん・腹膜播種に対してTNF- $\alpha$ 遺伝子治療が有効性を示す機序を解明。
2. インテグリン  $\alpha v \beta 3$  を標的とする RGD-TNF- $\alpha$  遺伝子治療の抗腫瘍効果と転移阻害を検討。
3. がんのEMTの要因のなかで最もがんでの発現頻度の高いYB-1を生体内で抑制するRNA干渉核酸治療の開発。
4. TNF- $\alpha$ と共同してがん拒絶免疫を賦活化させるサイトカイン・ケモカイン・可溶性治療分子の同時発現による遺伝子免疫療法の開発。
5. 高分子ミセルを用いたがん遺伝子治療の大動物安全性試験の施行。

### 3. 研究の方法

#### 1. TNF- $\alpha$ 遺伝子治療のがん選択的殺細胞効果の機序解明

- ① TNF- $\alpha$ シグナルと細胞傷害の関連因子のノックダウンにより遺伝子治療のがん高感受性の機序を解明。すなわち、がん細胞にRac1 siRNA導入した上で、TNF- $\alpha$  遺伝子導入し、Rac1ノックダウンの有無でROS産生並びに細胞傷害を比較。

#### 2. 標的化 RGD-TNF- $\alpha$ 遺伝子治療による抗腫瘍効果の向上と転移阻害に関する検討

- ① がんや腫瘍血管に高発現するインテグリン  $\alpha v \beta 3$  を標的とする cRGD ペプチドを TNF- $\alpha$ 分泌シグナル配列直後に挿入した RGD-hTNF- $\alpha$ 発現プラスミドを作製。
- ② 高分子ミセルを用いた RGD-hTNF- $\alpha$ と hTNF- $\alpha$ 遺伝子治療の抗腫瘍効果を腹膜播種マウスで比較。
- ③ 皮下腫瘍に RGD-hTNF- $\alpha$ または hTNF- $\alpha$ 遺伝子導入し、腫瘍の新生血管密度、EMT 形質発現を免疫染色で解析。

#### 3. YB-1 RNA 干渉治療の開発

- ① がんを高発現する YB-1 mRNA 干渉の核酸配列は同定済。発現プラスミドを構築する。

- ② 皮下腫瘍に高分子ミセルで導入し、抗腫瘍効果およびがん組織での YB-1 や EMT 形質 (N-cadherin, vimentin 等) の発現抑制を検討。
- ③ 腹膜播種モデルで hTNF- $\alpha$ 遺伝子治療と併用し、転移阻害効果の有無を検討。
- ④ 多剤耐性の抑制に繋がることから [Shiota M, et al: Cancer Res 68: 98-105, 2008]、抗がん剤との併用による治療効果も検討。

#### 4. TNF- $\alpha$ を軸とした複数の免疫遺伝子同時発現による特異的抗腫瘍免疫の検討

複数の免疫遺伝子の同時導入による拒絶免疫活性化で難治がん制御を試みる。

##### 治療遺伝子発現プラスミド作製

- ① TNF- $\alpha$ , IL-12, GM-CSF, CD40L, ケモカイン: LARC, SLC, RANTES 発現プラスミドは作製済み。
- ② TGF- $\beta$ 受容体 cDNA の細胞外ドメインをサブクローニングし、Echistatin と融合させ可溶性 TGF $\beta$ R-Echistatin 発現プラスミドを作製。

##### 動物実験での抗腫瘍効果判定

TNF- $\alpha$  と LARC, SLC, RANTES, IL-12, GM-CSF, 可溶性 TGF- $\beta$ R-Echistatin, CD40L 発現プラスミドを組合せて高分子ミセルに内包し、ルシフェラーゼ安定発現 CT26 大腸がんの腹膜播種マウス腹腔内に投与。抗腫瘍効果をルシフェラーゼ活性で評価。

##### 免疫学的動態の解析

- ① 治療遺伝子内包高分子ミセルを腹腔内投与した後に癌組織と脾臓・血液を採取。
- ② 癌組織のMHC、接着因子発現、サイトカイン・ケモカイン産生、リンパ球・NK・マクロファージ・樹状細胞集積に関して、免疫染色、RT-PCR, ELISA, FACS 分析にて検討。
- ③ 脾臓と血液中免疫細胞の表面マーカーFACS 解析および CTL 解析。

#### 5. 遺伝子治療の安全性の評価

担がんマウスに治療遺伝子内包高分子

ミセルを投与（腫瘍内、腹腔内）し、経時的に体重測定。組織と血液を採取し、血液一般、肝・腎機能検査と real-time RT-PCR による遺伝子発現解析を施行。また、体内動態を明らかにする為に、蛍光標識したポリマーミセルの組織分布および In vivo bioluminescence imaging (IVIS)により経時的なルシフェラーゼ発現解析で検討。

大動物サルでも同様に、腹腔内に遺伝子内包高分子ミセルを投与。（投与量はマウス実験結果から体重比を考慮し設定）体重、理学的所見、尿・血液検査を施行。

#### 4. 研究成果

##### 1. TNF- $\alpha$ 遺伝子治療のがん選択的殺細胞効果の機序解明

リコンビナント TNF- $\alpha$ 投与群と TNF- $\alpha$ 遺伝子導入群で膵がん細胞株の ROS 産生を比較した。更に、Rac1 siRNA を導入し、Rac1 の有無で ROS 産生と細胞傷害度を比較した。リコンビナント TNF- $\alpha$ 投与群では ROS は産生されなかったが、TNF- $\alpha$ 遺伝子導入群で明らかな ROS 産生と細胞傷害が認められ、Rac1 siRNA で ROS 産生と細胞傷害は阻害された。[産業財産権 #1 参照]

##### 2. 標的化 RGD-TNF- $\alpha$ 遺伝子治療による抗腫瘍効果の向上と転移阻害に関する検討

In vitro において RGD-hTNF- $\alpha$ と hTNF- $\alpha$ 遺伝子をはがん細胞に導入した場合、hTNF- $\alpha$ の発現効率は差を認めず、殺細胞効果に関しても有意な差を認めなかった。

一方、大腸がん腹膜播種マウスで抗腫瘍効果を RGD-hTNF- $\alpha$ と hTNF- $\alpha$ 遺伝子治療で比較したところ、明らかに RGD-hTNF- $\alpha$ 遺伝子治療群が hTNF- $\alpha$ 遺伝子治療群に比較して、腫瘍の抑制が認められた。現在、腫瘍の血管密度と EMT 関連分子の発現を、免疫染色で比較することを検討している。

[産業財産権 #1 参照]

##### 3. TNF- $\alpha$ を軸とした複数の免疫遺伝子同時発現による抗腫瘍免疫の検討

LARC, SLC, RANTES, IL-12, CD40L, GM-CSF 発現プラスミドを作成した。高分

子ミセルを用いて TNF- $\alpha$ 遺伝子と組合せて CT26 大腸がん腹膜播種マウスの腹腔内に投与し、抗腫瘍効果を比較した。TNF- $\alpha$ と CD40L, GM-CSF 併用群が TNF- $\alpha$ 単独群より抗腫瘍効果が高かった。

その機序に抑制性 T 細胞 (Treg)、CD11b+Gr1+suppressor 細胞、Th1/Th2 バランスの関与を検討した。CT26 大腸がん腹膜播種モデルを作成し、遺伝子治療 1 週間後に採取した血清中サイトカイン濃度をビーズアレイで測定したところ、TNF- $\alpha$ 、CD40L, GM-CSF 遺伝子併用群が TNF- $\alpha$ 遺伝子単独群に比較して、Th1 の指標となる IL-2, IFN- $\gamma$  が高値で、Th1 優位の免疫誘導が認められた。脾臓を採取してフローサイトメーターで解析した結果、TNF- $\alpha$  遺伝子治療により Treg の減少が示唆された。[産業財産権 #2 参照]

##### 4. YB-1 を標的とした miRNA 遺伝子治療

YB1-miRNA 発現プラスミドを作成。ヌードマウス大腸、胆嚢および卵巣がん腹膜播種モデルに高分子ミセルを用いて腹腔内投与し、抗腫瘍効果を検討した。TNF- $\alpha$ 遺伝子治療との併用ではなく、単独での遺伝子治療効果をまず検討したが、対照群と比較して明らかに腹膜播種の進展は抑制された。

更に、膵がん腹膜播種モデルにおいて治療効果の再現性を確認した。驚くことに、In vitro での増殖抑制効果が認められない MiaPaCa-2 膵がんに対しても、マウス腹膜播種モデルでは、有意な播種進展の抑制が認められ、がんに対する直接的効果だけではなく、周囲の微小環境（腫瘍血管、腫瘍関連マクロファージ）に対する効果が作用機序として示唆された。

In vitro の解析を行ったところ、YB-1 siRNA により血管内皮細胞のアポトーシス、細胞周期静止の増加、管腔形成能の抑制が生じることを見出した。皮下腫瘍においても YB-1 miRNA 遺伝子治療により腫瘍組織の新生血管密度 (CD31 染色陽性) が低下することを明らかにした。腫瘍血管を標的とする癌腫によらない汎用性の高い治療となる

可能性が示唆された。[特許申請準備中]

## 5. 高分子ミセルを用いた遺伝子治療の安全性の検討

マウス腹膜播種モデルにおいて、腹腔内投与による高分子ミセル内包 TNF- $\alpha$  遺伝子治療薬の安全性に関する検討を行った。体重、血液一般、血液生化学検査の結果は、24 時間後一過性の軽度肝機能上昇以外は、明らかな異常を認めず、安全性に問題が無いことが示唆された。

また、生体内の分布に関して、蛍光標識した高分子ミセルを用いて検討し、腫瘍組織と脾臓、肝臓、リンパ節にミセル局在が多く認められ、遺伝子発現は腫瘍組織が最も高いことを明らかにした。この結果の一部は J Control Release (Kumagai M, et al: in press) に報告した。[雑誌論文 #1 参照]

カニクイサルを用いた大動物安全性評価は、外部委託の形で一部施行した。単回漸増投与(雄 2 匹、雌 2 匹; 体重 2-4 kg) のプロトコールはプラスミド遺伝子の投与量を 1 mg/5kg BW, 3 mg/5kg BW, 10 mg/5kg BW に 1 週間毎の休薬期間において漸増する方法で、遺伝子プラスミドのリン酸基 1 に対してポリマーのカチオン性アミン基 10 の割合 (NP 比 10) でミセルを作成し腹腔内に投与した。食事摂取量と体重は経時的に測定した。投与後 1 日目に採血し、血液一般、血液生化学、血液凝固能検査を行った。理学的所見を観察し、最大投与量を投与した後に剖検し、臓器に異常所見がないか検索した。投与後、血中のフィブリノーゲン値が軽度上昇した以外は、明らかな異常所見、異常値は認めなかった。[論文投稿準備中]

## 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 8 件)

1) Kumagai M, Shimoda S, Wakabayashi R, Kunisawa Y, Ishii T, Osada K, Itaka K, Nishiyama N, Kataoka K and Nakano K: Effective transgene expression without toxicity by intraperitoneal administration of PEG-detachable polyplex micelles in mice with peritoneal dissemination. J Control Release (in press, 2012)

2) Nakano K, Kobayashi M, Nakamura K, Nakanishi T, Asano R, Kumagai I, Tahara H, Kuwano M, Cohen JB, Glorioso JC: Mechanism of HSV infection through soluble adapter-mediated virus bridging to the EGF receptor. Virology 413 (1), 12-18, 2011.

3) Xu R, Nakano K, Iwasaki H, Kumagai M, Wakabayashi R, Suzuki H, Yamasaki A, Mibu R, Onishi H, Katano M: Dual blockade of phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways overcomes paclitaxel resistance in colorectal cancer. Cancer Lett 306 (2); 151-60, 2011.

4) Kitaura Y, Chikazawa N, Tasaka T, Nakano K, Tanaka M, Onishi H, Katano M: Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Contributes to the Invasiveness of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells Through the Regulation of CD24 Expression. Pancreas 40(7): 1034-42, 2011.

5) Zhao G, Wakabayashi R, Shimoda S, Fukunaga Y, Kumagai M, Tanaka M, Nakano K: Impaired activities of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) -responsive element binding protein, protein kinase A and calcium-independent phospholipase A2 are involved in deteriorated regeneration of cirrhotic liver after partial hepatectomy in rats. Hepatology Res 41 (11); 1110-9, 2011.

6) Suzuki H, Onishi H, Wada J, Yamasaki A, Tanaka H, Nakano K, Morisaki T, Katano M: VEGFR2 is selectively expressed by FOXP3<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> Treg. Eur J Immunol 40 (1); 197-203, 2010.

7) Basaki Y, Taguchi K, Izumi H, Murakami Y, Kubo T, Hosoi F, Watari K, Nakano K, Kawaguchi H, Ohno S, Kohno K, Ono M, Kuwano M: Y-box binding protein-1 (YB-1) promotes cell cycle progression through CDC6-dependent pathway in human cancer cells. Eur J Cancer 46 (5); 954-65, 2010.

8) Kashihara M, Azuma K, Kawahara A, Basaki Y, Hattori S, Yanagawa T, Terazaki Y, Takamori S, Shirouzu K, Aizawa H, Nakano K, Kage M, Kuwano M, Ono M: Nuclear Y-box binding protein-1, a predictive marker of prognosis, is correlated with expression of HER2/Erb2 and HER3/Erb3 in non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol 4 (9); 1066-74, 2009.

[学会発表] (計 4 件)

① 中野賢二：非ウイルスベクターを用いた癌遺伝子・核酸治療：臨床試験への展開（シンポジウム）。第 24 回日本バイオセラピー学会学術集会総会 2011 年 12 月 1 日、和歌山市

② 中野賢二、熊谷康顕、下田真也、若林里衣、西山伸宏、片岡一則：ブロックポリマーを用いた播種癌に対する遺伝子治療：臨床試験に向けての展望。第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 4 日、名古屋市

③ Nakano K, Kumagai M, Shimoda S, Wakabayashi R, Nishiyama N, Kataoka K: Block co-polymer based gene therapy for disseminated cancer: Perspective to Clinical Trials. 17<sup>th</sup> 日本遺伝子治療学会 2011 年 7 月 16 日、福岡市

④ 岩崎寛智、中野賢二、他 14 名：ナノ高分子ミセルを用いた癌局所免疫修飾モデルの確立と抑制免疫制御に向けての試み。第 22 回日本バイオセラピー学会学術集会総会（シンポジウム）2009 年 11 月 27 日、大阪市

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：TNF- $\alpha$  遺伝子治療剤  
発明者：中野賢二、片岡一則、西山伸宏他  
権利者：東京大学  
種類：特許  
番号：特願2009-158282/PCT/JP2010/061312  
出願年月日：2009/7/2/2010/7/2  
国内外の別：国内/国外

名称：TNF- $\alpha$ 、CD40L 及び GM-CSF 併用遺伝子治療剤  
発明者：中野賢二、片岡一則、西山伸宏  
権利者：九州大学、東京大学  
種類：特許  
番号：特願2010-294035/PCT/JP2011/080515  
出願年月日：2010/12/28/2011/12/28  
国内外の別：国内/国外

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 賢二 (NAKANO KENJI)  
九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・教授  
研究者番号：00315061

(2) 研究分担者

田原 秀晃 (TAHARA HIDEAKI)  
東京大学・医科学研究所・教授  
研究者番号：70322071

西山 伸宏 (NISHIYAMA NOBUHIRO)  
東京大学・医学系研究院・准教授  
研究者番号：10372385

(3) 連携研究者

研究者番号：  
片岡 一則 (KATAOKA KAZUNORI)  
東京大学・工学系研究科・教授  
研究者番号：00130245

研究者番号：  
谷 憲三朗 (TANI KENZABUROU)  
九州大学・生体防御医学研究所・教授  
研究者番号：00183664

研究者番号：  
桑野 信彦 (KUWANO MICHIIHIKO)  
九州大学・薬学系研究院・教授  
研究者番号：80037431