

## 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 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592128

研究課題名（和文） 卵巣癌に対する新規がんウイルス・細胞療法の開発とそれを介した生体免疫系反応の解析

研究課題名（英文） The development of the new cancer virus, cell therapy for ovarian cancer and the analysis of immune system response.

研究代表者

那波 明宏 (Nawa Akihiro)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90242859

研究成果の概要（和文）：我々は独自の変異型弱毒化単純ヘルペスウイルスを用いたウイルス療法に着目し、難治性卵巣癌に対する臨床応用を進めている。腫瘍溶解性ウイルスを腹腔内投与する場合には、ウイルスに対する非特異的なインヒビターや中和抗体の存在が問題となる可能性が高い。本研究では卵巣癌腹膜播種病変に対するウイルス療法の効果増強の試みとして、不死化大網中皮細胞を作製し、この細胞を carrier cell として利用することで in vitro、in vivo ともに明らかな抗腫瘍効果の増強とウイルス中和抗体からの回避が達成できた。また卵巣癌がん幹細胞様細胞の遺伝子プロファイルを検討した。さらに薬剤耐性を克服するために OATP8 の機能解析を行った。今後の難治性卵巣癌に対するウイルス療法への重要な知見となる。

研究成果の概要（英文）：We have developed replication-competent, attenuated herpes simplex virus-1 (HSV-1) mutants, which have been evaluated for their oncolytic activities. However, the host immune system remains a significant obstacle to effective intraperitoneal administration of these viruses in the clinical setting. In this study, we investigated the use of these HSV-1 mutants as oncolytic agents against ovarian cancer and human peritoneal mesothelial cells as carrier cells for intraperitoneal therapy. Our results indicate that these HSV-1 mutants exerts a potent oncolytic effect on ovarian cancer, which may be further enhanced by the utilization of a carrier cell delivery system, based on amplification of viral load and possibly on avoidance of neutralizing antibodies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：がん幹細胞、CD133陽性細胞、OATP8遺伝子、タキソール、薬剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌患者の死亡数は年々増加傾向にある。その多くは進行・再発例が占めており、長期生存率は未だ30%程度である。このような腹

膜播種病変合併を伴う進行・再発症例に対しては薬物療法に頼らざるを得ない。従って癌が薬物耐性を獲得した後の再発・再燃に対しては有効な治療手段がないため新しい治療

戦略を確立する必要がある。分子標的薬として PI3kinase inhibitor、MMP inhibitor、mTOR inhibitor などが開発され、欧米で臨床治験が行われているが、卵巣癌治療における breakthrough に足るには至っていない。別の角度からの治療法の開発が要請される所以である。1991年ハーバード大学の Martuza らは、変異型 HSV を脳腫瘍治療に初めて応用し、腫瘍溶解性ウイルス (Oncolytic virus ; OV) によるがん治療法 (ウイルス療法) 開発への道を拓いた。その後、cancer gene therapy の研究分野は急速な展開を認め、現在へ至っている。ウイルス増殖、がん化、生体防御機構についての研究がこの数十年で著しく進展し、ウイルス療法も一時的な流行に終わらず、分子的基盤に基づく戦略的計画へ変貌してきている。現在まで様々な OV が開発されてきており、G207 ( $\gamma$ 34.5 ; UL39 欠損) や OncoVex<sup>GM-CSF</sup> などを使用した固形癌に対する臨床治験が進行中であるが、腫瘍の破壊効果は十分ではなくさらなる工夫が要求されている。これらの現状を踏まえ、我々は独自の変異型 HSV ; HF10 (LAT, UL56, UL55, UL43, UL49.5 欠損) などを開発し、それらの有効性、安全性を評価してきたが、今後さらにこの分野の研究を改良し、発展させていく事が重要である。そのためには①遺伝子改変により弱毒化しすぎた OV ではなく、腹膜播種に対する治療に適する性格を持つ OV の探索と投与法の検討が必要である。②腫瘍免疫を強化する GM-CSF などのサイトカインを搭載する OV、あるいは感染宿主細胞の細胞死を効率よく誘導するより強力な破壊メカニズムを有する OV、すなわち Arming vector の開発が望ましい。③さらに腹腔内の免疫応答制御については Th1/Th2 バランスの概念で説明されていたが、卵巣癌腹水中に多量に含まれる TGF- $\beta$ 、IL-6 などにより活性化が促進される制御性 T 細胞 (Treg) や Th17 などの腫瘍側バリアーをいかに排除するかについて、腹腔内の免疫応答について詳細に検討しその克服が必要である。④他方、2001年 Nature にて Reya らが癌組織中に「多分化能」を持つがん幹細胞が存在し、階層的な細胞社会を構成しているという新しい概念を提唱した。がん幹細胞は、SOX2、Nanog、Oct3/4 などの正常幹細胞と同様な自己複製機構に関与する分子を持ち、高い増殖ポテンシャルをもっているにもかかわらず多くのがん幹細胞は静止期にあると考えられているため、がん幹細胞の性質を考えると現行の主流を占めている化学療法は分裂速度の速い細胞をターゲットにしているため、極めて不十分であると考えられる。このような化学療法耐性細胞に対して新しいアプローチによる癌治療の開発を目指す事が強く望まれている。

## 2. 研究の目的

我々がこれまで進めてきた卵巣癌に対するがんウイルス療法の基礎研究から得た知見から、この治療法の現在の問題点を明示し、それらを改良・克服するために、今回詳細に研究を行い、トランスレーショナル研究への理論的根拠を確立する。具体的な本研究の目的は以下のごとくである。

(1)H19-20 年度科研費研究において腫瘍溶解性ウイルスの最適な carrier cell を探索中、HF10・Hh101 はヒト大網中皮細胞で効率よく増殖した。しかし、大網中皮初代培養細胞では継代を重ねるには限界があり、動物実験で評価するのに十分な細胞数が得られないこと、また細胞の性質が継代を重ねるに従って変化していく点において研究材料としての限界があった。そこで、ヒト大網中皮細胞の不死化細胞株を作製し、それをウイルスの carrier cell として用いた場合の in vitro、in vivo における生物学的特性、治療効果を詳細に検討する。がんではない不死化ウイルス感染大網中皮細胞を腹腔内投与すれば、使用するウイルスの減量や腹腔内腫瘍細胞への効率のよい cell-to-cell 感染が成立し、初期のウイルス感染排除に関連するマクロファージからの攻撃や中和抗体、補体の干渉からの回避が期待できる。さらに、患者自身の大網中皮細胞を使用すれば免疫拒絶反応の問題もない。

(2)がん細胞集団のなかに分化能と自己増殖能を有した幹細胞が存在しており、通常の化学療法では排除されない事がわかってきた。我々は現在までに yolk sac tumor の患者から NOY1、NOY2 の2種類の細胞株を樹立し、その株のうち CD133 陽性細胞群が CD133 陰性細胞群に比べ明らかにヌードマウスでの腫瘍形成能、腹膜播種形成能が亢進していることを突き止めている。また、iPS 細胞樹立の際に使用された Oct3/4 遺伝子の発現亢進も認めている。この細胞の遺伝子プロファイルを検討するとともに、CD133 陽性卵巣癌がん幹細胞様細胞株を含めた各種卵巣癌細胞株に対するウイルス療法の感受性について詳細に検討する。

(3)婦人科癌化学療法の主流であるタキソールの感受性を上昇させ薬剤耐性を克服するための工夫として、その細胞内への組み込みポンプを考えられている organic anion transporter-8 (OATP8) の機能解析を行い、さらにレンチウイルスシステムで CD133 陽性卵巣癌がん幹細胞様細胞をはじめとした各種婦人科癌細胞株に高発現させ、タキソール感受性の検討を行い、さらに OV との併用効果について in vitro、in vivo で詳細に検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 卵巣癌患者からの同意および名古屋大学医学部倫理委員会での承認事項に基づき、摘出した大網の一部を実験用に採取し、大網中皮細胞を初代培養する。共同研究者である国立がんセンターウイルス部 清野透博士により、レンチウイルスシステムを用い、同初代培養細胞に hTERT、Cdk4、Cyclin D1 の各遺伝子を導入し、不死化細胞を樹立する。これらの遺伝子は CMV プロモータードライブ (tet-off システム)、IRES で各遺伝子を接続してある。この導入については、国立がんセンター倫理委員会の承認も受けている。不死化細胞株の性質を調べるため、初代培養細胞との比較において以下の項目について検討する。④ サイトケラチンやビメンチンなどの中皮細胞マーカーの発現の確認および CXCR4 などのケモカインレセプター発現を確認する。⑤ 導入された 3 種類の遺伝子発現の確認を Cdk4 と CyclinD1 は Western blot、hTERT は trap assay にて評価する。HSV 中和抗体存在下での感染拡散実験として卵巣癌細胞株である SKOV3 に Hh101 を吸着させ (1h)、中和抗体存在下で培養し、ウイルス感染の拡散について評価する。これに対して、不死化大網中皮細胞に感染させた後にウイルス粒子として等価となる同細胞を SKOV3 と中和抗体存在下で共培養し、同様にウイルス感染の拡散について評価する。不死化大網中皮細胞、および Hh101 感染不死化大網中皮細胞と SKOV3 の接着性を検討する。実験前日に 96 穴プレートに subconfluent 状に播かれた SKOV3 の上に、蛍光色素を取り込ませた各細胞 (不死化大網中皮細胞、HF10 感染不死化大網中皮細胞および Vero 細胞) を SKOV3 細胞の 1/10-1/100 数で播く。0.5-3 時間培養し、PBS 洗浄後、接着細胞数を蛍光顕微鏡下でカウントする。Balb/c nu/nu (メス、6-7 週齢) に SKOV3 細胞 10<sup>7</sup> 個/body で腹腔内接種する。接種後に Hh101 10<sup>7</sup> pfu/body/回、あるいは Hh101 感染中皮細胞をウイルス量に換算して 10<sup>7</sup> pfu と等価の細胞数/body/回を④ day3 より 3 日毎に 3 回接種した場合、⑤ day6 より 3 日毎に 5 回接種した場合、さらに⑥ それぞれに HSV 中和抗体を前投与した場合の治療効果について検討した。

(2) yolk sac tumor の患者から樹立した細胞株 NOY1 の親株、CD133 陽性細胞群、CD133 陰性細胞群間における遺伝子発現プロファイルの違いについてマイクロアレイ法を用いて検討する。現段階ではこの CD133 陽性細胞群ががん幹細胞であるとの確証はない

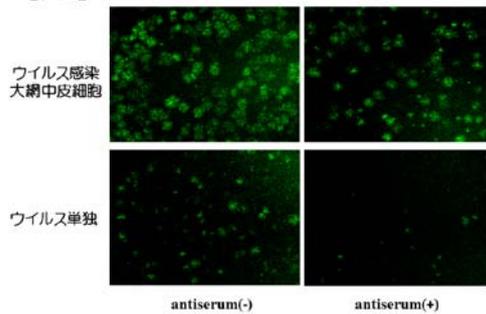
が、少なくともヌードマウスでの皮下腫瘍形成においては CD133 陽性細胞群では 75% であるのに対して、CD133 陰性細胞群では 0% であった。このため、この細胞をがん幹細胞様として OV の抗腫瘍効果を in vitro、in vivo において検討する。

(3) タキソールの organic anion transporter の 1 つである OATP8 遺伝子を、タキソール感受性が低い CD133 陽性細胞群を含む各種婦人科癌細胞株に、レンチウイルスシステムを利用して導入し、タキソールの取り込み量の経時的変化、抗細胞障害性の変化、さらには OV を併用することにより細胞障害性に関して増強効果があるかについて、in vitro、in vivo から検討する。ヒト OATP8 遺伝子は東北大学薬学部から供与を受けており、hTERT プロモータードライブ OATP8 発現レンチウイルスは Mission Lentiviral Packaging Mix (Sigma) を使用し作製する。

### 4. 研究成果

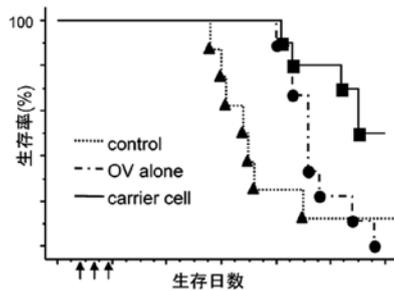
(1) ヒト大網中皮細胞の不死化細胞株を作製し、それをウイルスの carrier cell として用いた場合の in vitro、in vivo における生物学的特性、治療効果を検討した。不死化ウイルス感染大網中皮細胞を腹腔内投与すれば、使用する free ウイルスの減量する事が可能であると考えられる。また、腹腔内腫瘍細胞への効率のよい cell-to-cell 感染が成立し、初回のウイルス感染排除に関連するマクロファージからの攻撃や中和抗体・補体の干渉からの回避も期待しうる。さらに、患者自身の大網中皮細胞を使用すれば免疫拒絶反応の問題も無いと考えられる。まず、摘出大網の一部より大網中皮細胞を培養し、この初代培養細胞に、レンチウイルスシステムを用い、hTERT、Cdk4、Cyclin D1 の各遺伝子を導入し、不死化細胞を樹立した (HOmMC)。変異型 HSV である Hh101 の HOmMC での増殖は初代培養大網中皮細胞あるいは卵巣癌細胞株 SKOV3 での増殖に比べて感染後 24 時間の評価では約 10 倍高く、carrier cell として最適であると判断された。また卵巣癌細胞株と HSV 中和抗体との共培養においても、ウイルス単独投与の場合と異なり、ウイルス感染 carrier cell を投与した場合、より短時間でより広範囲に腫瘍細胞変性効果を認めた (図 1)。ヒト卵巣癌腹膜播種ヌードマウスモデルを用いた治療成績では、3 回治療した場合はウイルス単独治療群の平均生存期間が 46 日であったのに対し、ウイルス感染 carrier cell を投与した治療群では 55 日と有意に生存期間の延長を認めた ( $p < 0.05$ ) (図 2)。

【図1】



【図2】

SKOV3腹膜播種マウスモデルでの生存解析



(2)yolk sac tumor の患者から樹立した細胞株 NOY1 を FACS を用いて CD133 陽性細胞群、CD133 陰性細胞群に分け、これらの細胞群間における遺伝子発現プロファイルの違いについてマイクロアレイ法を用いて検討を行った。mRNA の発現が 2 倍以上亢進していた遺伝子は 296 個あり、主なものは ALDH (aldehyde dehydrogenase)、BMP5、FGFR (fibroblast growth factor receptor)、CCL20、MMP1、MMP24 などであった。一方で発現が 0.5 倍以下に低下していた遺伝子は 212 個あり、主なものは ADMA19、IGFBP (insulin-like growth factor binding protein)、IL-11 などであった。

(3)タキソールの取り込みに関与するとされる OATP8 遺伝子の機能を解析する目的で、レンチウイルスシステムで各種婦人科細胞株に同遺伝子を導入し、タキソール取り込み量の経時的変化、抗細胞障害性の変化を検討することとした。レンチウイルス作製のためのプラスミド DNA コンストラクションが終了したところである。OATP8 発現評価については、各種市販の抗体を検討した。HEK293T 細胞との OATP8-stable transfectant を用い Western blot 法にて発現を比較したところ、明確な特異バンドが得られなかったため、現在、適した抗体を検討中である。代替の発現評価方法として、realtime-RT-PCR を用いて検討した。HEK293T-OATP8、Hela 細胞株において OATP8 発現が高いことが判明した。OATP8 低発現細胞株に OATP8 発現レンチウイルスを感染させることによる抗細胞障害性の変化を現在検討している。また、HEK293T-OATP8

細胞株に OATP8 siRNA で処理した場合、OATP8 の発現減弱とタキソールに対する感受性の低下を認めた。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

那波 明宏 (Nawa Akihiro)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90242859

### (2)研究分担者

吉川 史隆 (Kikkawa Fumitaka)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40224985