

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 1日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790648

研究課題名（和文） 胆道癌に対する分子標的化遺伝子導入法を用いた遺伝子化学療法の実験的解析

研究課題名（英文） Experimental Efficacy of Genechemotherapy for Biliary cancer using molecular target gene transduction method.

研究代表者

福田 邦明（FUKUDA KUNIAKI）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50447257

研究成果の概要（和文）：

胆道癌は根治の難しい予後不良な癌であり、遺伝子治療などの新規治療法の開発が望まれる。我々は、Z33ファイバー改変型アデノウイルスを用いた胆道癌に対する分子標的化遺伝子化学療法を開発を行った。まず、分子標的抗体を選定するために、複数の胆道癌細胞株の表面抗原をFACSで検証し、EGFRとEpCAMが胆道癌で多く発現していることを確認した。Z33ファイバー改変型アデノウイルスにEGFRおよびEpCAM抗体を結合させて遺伝子発現を見たところ、アデノウイルスレセプター（CAR）の発現に関わらず、胆道癌細胞株で遺伝子の発現を認めた一方、HeLa細胞や正常肝細胞においては認めなかった。次に、EGFR、EpCAM抗体を結合させたUPRT搭載Z33ファイバー改変型アデノウイルスを各種胆道癌細胞に感染させ、5FUを投与したところ、胆道癌細胞株で良好な殺細胞効果を認めた一方で、正常肝細胞に対しては安全性を示した。ヌードマウスを用いた胆道癌皮下移植モデルでの抗腫瘍効果を検証したところ、EGFRまたはEpCAM抗体を結合させたUPRT搭載Z33ファイバー改変型アデノウイルス感染後に5FUを投与した群は、コントロール群に比べ著明な抗腫瘍効果（ $p < 0.01$ ）を認めた。

本研究は、ファイバー改変型組換えアデノウイルスと分子標的抗体を用いることにより、正常細胞に対する安全性を確保しつつ癌に対する最大の治療効果を得る「腫瘍に標的化した遺伝子治療」が可能となり、従来、問題となっていた「腫瘍選択性」を飛躍的に向上した画期的な治療法である。また、抗癌剤治療や分子標的薬治療に遺伝子治療を併用することにより、治療成績のさらなる向上に繋がると考えられ、今後の臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Biliary cancers are highly malignant diseases with poor prognosis and thus development of new treatments such as gene therapy is necessary. Although adenovirus vectors are widely used for cancer gene therapy, conventional adenoviral vectors infect not only cancer cells but also normal cells. Therefore, a new method that allow more specific gene delivery to cancer cells needs to be developed to obtain more efficient anti-tumor effect and safety. We explored methods of retargeting adenovirus vectors for targeted gene therapy of human biliary cancers using the Ad incorporating an IgG Fc binding motif (Z33) from the Staphylococcus protein A (Ad-FZ33) combined with tumor specific antibodies. Flow cytometry analysis revealed high expression levels of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and epidermal growth factor receptor (EGFR) on human biliary cancer cells. Ad-FZ33 expressing LacZ combined with antibodies against EpCAM or EGFR, followed by β -gal assay, demonstrated highly efficient gene transduction in these biliary cancer cells, compared with the treatment with control antibody or without antibody. Ad-FZ33 expressing uracil phosphoribosyl transferase (UPRT), an enzyme which greatly enhances the toxicity of 5-fluorouracil (FU), combined with antibodies against EpCAM or EGFR, remarkably enhanced the sensitivity of biliary cancer cells to 5-FU. By contrast, the treatment didn't affect 5-FU sensitivity of the cells not expressing EpCAM or EGFR including normal hepatocytes. Finally, treatments with the UPRT-expressing Ad-FZ33 with antibodies against EpCAM or EGFR, followed by 5-FU administration, were significantly suppressed the growth of biliary cancer xenografts in nude mice. These results indicate that the molecular target genechemotherapy mediated by the Z33 fiber-modified adenovirus with anti-EpCAM or anti-EGFR antibodies offers a potentially effective therapeutic modality against biliary cancers, and can be expected in clinical applications fairly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野： 消化器病学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード： 胆道学, 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

進行胆道癌は、診断時には既に根治手術困難なことが多く、化学療法、放射線療法などを含む集学的治療を行っても、予後不良な癌の一つである。そのため、分子標的治療や遺伝子治療といった新規治療法の開発が期待されるが、研究は乏しい。我々は、これまでに胆道癌に対するアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療の実験的有効性と安全性および5-FUとの併用効果について報告してきた (Fukuda, et al. *Cancer Res.* 2003; 63: 4434-40.)。さらに、5-FU を 5-fluorouridylic acid (FUMP) に代謝活性化する酵素 Uracil phosphoribosyltransferase (UPRT)の遺伝子を搭載したアデノウイルスベクターが胆道癌細胞の5-FU感受性を著しく改善し、5-FU との併用による「遺伝子化学療法」が抗癌剤耐性を克服するのに有効であることを報告した (Seo, et al. *Cancer Res.* 2005; 65: 546-52.)。しかし、これらのベクターは、癌細胞選択的に増殖するものの、正常細胞にも感染し、若干の遺伝子を発現してしまう問題点があった。

一方、近年、EGFR や VEGF などに対する特異抗体 (セツキシマブ, ベバシズマブ) を用いた分子標的治療が種々の癌治療に導入され注目されている。しかし、分子標的治療の抗腫瘍効果の限界も明らかとなりつつあり、さらなる抗腫瘍効果の増強が望まれている。

そこで我々は、最近開発されたプロテイン A の抗体結合ドメイン (Z33) をファイバーに導入した Z33 ファイバー改変アデノウイルスに注目した (*J Virol.* 2003; 77: 2093-104, *J Virol.* 2003; 77:12931-40.)。このウイルスに腫瘍特異

的分子標的抗体の Fc 部分を結合させることにより、癌細胞特異的な遺伝子導入、すなわち分子標的化遺伝子治療が可能となることが報告されたが、*in vivo* での効果を検証した報告は少なく、胆道癌に対する検討は全くない。

2. 研究の目的

本研究では、胆道癌細胞に選択的に結合する分子標的抗体を探索し、これを Z33 ファイバー型アデノウイルスに結合させることにより、胆道癌に対する分子標的化遺伝子導入法を開発する。さらに、この標的抗体結合 Z33 ファイバー型アデノウイルスに UPRT 遺伝子を搭載させたベクターを用いて腫瘍特異的な UPRT 発現を誘導した後に、抗癌剤 5-FU を投与し、抗腫瘍効果と正常細胞に対する安全性を評価することにより、この分子標的化遺伝子化学療法胆道癌に対する有効性と安全性を実験的に解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞

・胆道癌細胞株

胆嚢癌由来細胞 (3種類) :
TGBC-1TKB , TGBC-2TKB ,
TGBC-44TKB

胆管細胞癌由来細胞 (1種類) :
KMC-1

・非胆道癌細胞株

子宮頸癌由来細胞 (1種類) :
HeLa 細胞

・ヒト正常細胞

正常肝細胞(初代培養)

・ウイルス調整用細胞

ヒト胎児腎 293 細胞

(2) ウイルス

・ Z33 ファイバーアデノウイルス

UPRT 搭載 Z33 ファイバー改変型アデノウイルス (Ax3CAUP-FZ33),

LacZ 搭載 Z33 ファイバー改変型アデノウイルス (Ax3CAZ3-FZ33)

・ 野生型ファイバーアデノウイルス

UPRT 搭載野生型ファイバー (非改変型) アデノウイルス (AxCAUP)

① Z33 ファイバー改変型アデノウイルスの作成

Protein A の Z33 モチーフをファイバーノブ HI ループ領域に挿入したカセットコスミドに LacZ または UPRT 遺伝子を挿入してアデノウイルスを作製し精製する。

② 各種胆道癌細胞における各種分子標的抗体・腫瘍特異抗体のスクリーニング

各種胆道癌細胞株および正常細胞株の細胞表面における EGFR, EpCAM, erbB2, CD24, CD56 などの発現を FACS で解析した。

③ 標的抗体結合 Z33 ファイバー改変型アデノウイルスによる遺伝子導入効率の検討 (β ガラクトシダーゼアッセイ)

LacZ 搭載 Z33 ファイバー改変型アデノウイルスに複数種類の EGFR, EpCAM 抗体を結合させ、各種肝胆道癌株, Hela, 正常細胞株などに感染させ β ガラクトシダーゼアッセイを行い、分子標的化遺伝子導入法による遺伝子発現効率を検証した。

④ 標的抗体結合 Z33 ファイバー改変型アデノウイルスによる遺伝子導入効率の検討 (UPRT 発現)

UPRT 搭載 Z33 ファイバー改変型アデノウイルスに EGFR, EpCAM 抗体を結合させたものと、ウイルスだけを EGFR および EpCAM 発現胆道癌細胞株に感染させた。72 時間後に細胞を回収し UPRT の発現をウエスタンブロットアッセイで確認した。

⑤ 標的抗体結合 Z33 ファイバー改変型 UPRT 発現アデノウイルスが各種胆道癌細胞株の 5-FU 感受性に与える殺細胞効果および正常肝細胞に対する安全性の検討

EpCAM 抗体や EGFR 抗体, 非特異的抗体を結合させた UPRT 発現 Z33 ファイバー改変型アデノウイルスを、胆道癌細胞株と HeLa

細胞, 正常肝細胞に感染させ、4 日後に 5FU を投与して胆道癌細胞株に対する殺細胞効果と、HeLa と比較した特異性の評価, および正常ヒト細胞株に対する安全性について検証した。

⑥ 胆道癌皮下移植ヌードマウスにおける検討

ヌードマウスの皮下に胆道癌細胞を移植し、一定の腫瘍径に達した時点で、a) EpCAM 抗体結合 Z33 ファイバー改変 UPRT 搭載アデノウイルス+5FU 群, b) EGFR 抗体結合 Z33 ファイバー改変 UPRT 搭載アデノウイルス+5FU 群, c) 非特異的抗体結合 Z33 ファイバー改変 UPRT 搭載アデノウイルス+5FU 群, d) 野生型ファイバー UPRT 搭載アデノウイルス+5FU 群, e) EpCAM 抗体+5FU, f) EGFR 抗体+5FU, g) 5FU 単独投与群, h) コントロール (PBS) 群 の 8 群に分け、それぞれ 6 匹のヌードマウスを用いて治療効果を検証した。治療スケジュールは、ウイルスの腫瘍内局注を 3 日間連日で行い、5FU 投与群は 5FU の腹腔内投与を 4 日目から 8 日目まで行った。

4. 研究成果

① Z33 ファイバー改変型アデノウイルスの作成

Protein A の Z33 モチーフをファイバーノブ HI ループ領域に挿入したカセットコスミドに LacZ または UPRT 遺伝子を挿入してアデノウイルスを作製し精製した。

② 各種肝胆道癌細胞における各種分子標的抗体・腫瘍特異抗体のスクリーニング

各種胆道癌細胞株の EGFR, EpCAM, erbB2, CD24, CD56 などの発現を FACS で解析したところ、胆道癌細胞株では、EGFR および EpCAM を発現しているものが多いことが判明した (TGBC-1TKB, TGBC-2TKB, TGBC-44TKB, KMC-1)。そのため、分子標的抗体として EGFR 抗体および EpCAM 抗体を用いることとした。EGFR は細胞の増殖や分化に関わる膜貫通型受容体であり、erbB ファミリーに属する。一方、EpCAM は癌細胞の基底側面部表面に広く発現する細胞接着に関与する糖タンパクである。

③ 標的抗体結合 Z33 ファイバー改変型アデノウイルスによる遺伝子導入効率の検討 (β ガラクトシダーゼアッセイ)

LacZ 搭載 Z33 ファイバー改変型アデノウ

ウイルスに複数種類の EGFR, EpCAM 抗体を結合させ、各種肝胆道癌株 (TGBC-1TKB, TGBC-2TKB, KMC-1), HeLa, 正常細胞株などに感染させ β ガラクトシダーゼアッセイを行ったところ、FACS での発現同様に EGFR や EpCAM を発現している胆道癌細胞株において、CAR の発現に関係なく容量依存的に遺伝子導入効率が高い結果となったが、特に CAR の発現に乏しい TGBC-1TKB と KMC-1 において顕著であった。一方で、HeLa や正常細胞株での遺伝子導入効率は低かった。

④ 標的抗体結合 Z33 ファイバー改変型アデノウイルスによる遺伝子導入効率の検討 (UPRT 発現)

UPRT 搭載 Z33 ファイバー改変型アデノウイルスに EGFR, EpCAM 抗体を結合させ、EGFR および EpCAM 発現胆道癌細胞株 (TGBC-1TKB, KMC-1) に感染させた。72 時間後に細胞を回収し、ウエスタンブロットアッセイを行ったところ、いずれの細胞株でも UPRT の発現を確認した。一方、これら抗体を結合させずに感染させたところ、UPRT の発現を認めなかった。

⑤ 標的抗体結合 Z33 ファイバー改変型 UPRT 発現アデノウイルスが各種胆道癌細胞株の 5-FU 感受性に与える殺細胞効果および正常肝細胞に対する安全性の検討

上記③、④の結果より、発現効率の良い EGFR 抗体(1B7)と EpCAM 抗体(MOC31)を用いることとした。EpCAM 抗体や EGFR 抗体、非特異的抗体を結合させた UPRT 発現 Z33 ファイバー改変型アデノウイルスを胆道癌細胞株 TGBC-1TKB, KMC-1 と HeLa 細胞、正常肝細胞に感染させ、4 日後に 5FU を投与して殺細胞効果を検証したところ、2 つの胆道癌細胞においては EpCAM 抗体や EGFR 抗体を結合させた群で有意に 5FU の殺細胞効果が増強された。一方で、HeLa 細胞と正常ではいずれの抗体でも殺細胞効果は軽微であった。胆道癌に対する特異的な抗腫瘍効果および正常肝細胞への安全性が示された。

⑥ 胆道癌皮下移植ヌードマウスにおける検討

ヌードマウスの皮下に胆道癌細胞株 KMC-1 を移植し、腫瘍体積が 150 mm^3 に達した時点で、a) EpCAM 抗体結合 Z33 ファイバー改変 UPRT 搭載アデノウイルス + 5FU 群、b) EGFR 抗体結合 Z33 ファイバー

改変 UPRT 搭載アデノウイルス + 5FU 群、c) 非特異的抗体結合 Z33 ファイバー改変 UPRT 搭載アデノウイルス + 5FU 群、d) 野生型ファイバー UPRT 搭載アデノウイルス + 5FU 群、e) EpCAM 抗体 + 5FU、f) EGFR 抗体 + 5FU、g) 5FU 単独投与群、h) コントロール(PBS)群 の 8 群に分け、それぞれ 6 匹のヌードマウスを用いて治療効果を検証したところ、a)群と b)群は他の群と比べ抗腫瘍効果が顕著であった。

総括：

- 1). 本研究は、プロテイン A の Z33 モチーフが抗体 (IgG) の Fc 部分と結合する性質を利用し、胆道癌特異的な細胞表面抗原に対する分子標的抗体を用いて、癌細胞特異的に薬物代謝酵素を発現させ、癌細胞のみに抗癌剤の効果を増強することを目的とした治療法の開発である。
- 2). まず、胆道癌特異抗原を解析すべく多数の胆道癌細胞と各種抗体を用いて、FACS および遺伝子導入効率の検討を行った。EGFR と EpCAM は多くの胆道癌細胞株で発現を認めたのに対し、初代培養ヒト正常肝細胞や HeLa 細胞においては発現が乏しかった。
- 3). UPRT 搭載 Z33 ファイバー改変型アデノウイルスと EGFR 抗体、EpCAM 抗体、5FU を用いた分子標的化遺伝子化学療法は、胆道癌細胞株で殺細胞効果が著明だったのに対し、正常肝細胞や HeLa 細胞では明らかな殺細胞効果を認めず、ヌードマウスの胆道癌異種移植モデルを用いた動物実験においても、EGFR、EpCAM いずれの抗体を用いても他の群に比べ明らかな抗腫瘍効果を示した。
- 4). 本法は、抗腫瘍効果の増強のみならず、ウイルス治療、抗癌剤治療の双方においてより安全性を向上させるものであった。
- 5). 以上、本研究により、胆道癌に対する分子標的化遺伝子化学療法の有効性が示された。

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 2 件) 全て査読有り

1. Kawashima R, Abei M, Fukuda K, Nakamura K, Murata T, Wakayama M, Seo E, Hasegawa

- N, Mizuguchi H, Obata Y, Hyodo I, Hamada H, Yokoyama KK. EpCAM- and EGFR-targeted selective gene therapy for biliary cancers using Z33-fiber modified adenovirus. Int. J Cancer 129(5): 1244-1253, 2011.
2. Fukuda K, Abei M, Ugai H, Kawashima R, Seo E, Wakayama M, Murata T, Endo S, Hamada H, Hyodo I, Yokoyama KK. E1A, E1B double-restricted replicative adenovirus at low dose greatly augments tumor-specific suicide gene therapy for gallbladder cancer. Cancer Gene Ther. 16(2): 126-36, 2009.

〔学会発表〕（計3件）

1. Kawashima R, Abei M, Fukuda K, Nakamura K, Murata T, Hyodo I, Hamada H, Obata Y, Yokoyama KK. Effective gene therapy for biliary cancers by using Z33 fiber modified adenovirus with tumor specific antibodies. 第15回日本遺伝子治療学会, 2009年7月10日 大阪.
2. 川島玲, 安部井誠人, 福田邦明, 村田武英, 濱田洋文, 兵頭一之介. Z33 アデノウイルスと腫瘍特異抗体を用いた胆道癌の標的化遺伝子治療の開発. 第45回日本胆道学会, 2009年9月19日 千葉.
3. Kawashima R, Fukuda K, Abei M, Nakamura K, Murata T, Yokoyama KK, Hamada H, Hyodo I. Targeted gene therapy for cancers by using Z33 fiber modified adenovirus vector with tumor specific antibodies. 20th Asia Pacific Cancer Conference, 2009年11月12日 つくば.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 邦明 (FUKUDA KUNIAKI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：50447257