

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07219

研究課題名(和文)膵臓癌に対する癌特異的p53遺伝子治療を阻害する代謝因子の探索と個別化治療の開発

研究課題名(英文)Exploration of metabolic factors to inhibit tumor-specific p53 gene therapy in pancreatic cancer

研究代表者

田澤 大(TAZAWA, HIROSHI)

岡山大学・大学病院・准教授

研究者番号：90415513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子変異に応じたゲノム医療は癌患者に最適な個別化医療を提供することが期待される。しかし、KRAS/p53変異膵臓癌への治療法は未だ確立していない。本研究では、解糖系代謝の膵臓癌細胞が癌特異的に制限増殖するp53誘導性アデノウイルス製剤OBP-702に高感受性を示すことを明らかにした。さらに、ミトコンドリア代謝阻害剤の併用が非解糖系代謝の膵臓癌細胞に解糖系代謝を誘導してウイルス感受性を増強することを確認した。ミトコンドリア代謝はウイルス抵抗性を改善する治療ターゲットとなる可能性が示唆された。今後は膵臓癌の解糖系代謝を評価するバイオマーカーの開発が個別化治療の実現に重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、解糖系代謝が亢進した膵臓癌に対して癌特異的に制限増殖するp53誘導性アデノウイルスOBP-702を用いたp53遺伝子治療が抗腫瘍効果を発揮することを明らかにした。さらに、代謝調節剤を併用して解糖系代謝を誘導することでウイルスへの抵抗性を改善できる可能性も示した。膵臓癌に対する個別化治療の開発は膵臓癌患者の生命予後の改善につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Genomic medicine based on gene mutations is expected to provide precision medicine in cancer patients. However, genomic medicine against KRAS/p53-mutant pancreatic cancer remains to be developed. Here, we show that glycolytic pancreatic cancer cells were sensitive to tumor-specific replication-competent p53-inducing oncolytic adenovirus OBP-702. Moreover, combination of mitochondrial metabolism inhibitor promoted virus sensitivity in non-glycolytic pancreatic cancer cells by inducing glycolysis. Mitochondrial metabolism may be therapeutic target to improve resistance to virotherapy. Thus, the development of biomarker to evaluate glycolysis in pancreatic cancer is important for precision virotherapy.

研究分野：分子腫瘍学、遺伝子治療学

キーワード：膵臓癌 代謝サブタイプ 解糖系代謝 p53 アデノウイルス ミトコンドリア 個別化医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子変異に応じたゲノム医療は癌患者に最適な個別化治療を提供することが期待されている。膵臓癌はKRAS遺伝子変異(約95%)とp53遺伝子変異(約75%)が高頻度に存在するが、KRAS/p53変異膵臓癌に対する有効な治療法は未だ確立していない。申請者は癌細胞のp53機能異常を改善するために、癌特異的にp53を誘導するアデノウイルス製剤OBP-702を開発した。OBP-702はKRAS/p53変異膵臓癌細胞のp53機能回復とKRAS-ERK経路の抑制を介して浸潤能や腫瘍増殖を抑制することを明らかにし、膵臓癌への臨床応用を進めている。これまでの報告で膵臓癌細胞は網羅的な遺伝子発現解析によって解糖系と非解糖系の代謝サブタイプに分類されることが知られており、アデノウイルスに対する感受性は代謝サブタイプによって異なることが示唆されている。しかし、膵臓癌の代謝サブタイプとアデノウイルス感受性の関連は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、解糖系と非解糖系のヒト膵臓癌細胞を用いてOBP-702に対する感受性を阻害する代謝関連因子を網羅的に解析し、代謝調節剤を併用することでOBP-702抵抗性を改善する最適なOBP-702個別化治療の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 代謝サブタイプの異なる膵臓癌細胞における代謝関連マーカーの比較検討

解糖系のヒト膵臓癌細胞株2種類(MIAPaCa-2、PK-45H)と非解糖系のヒト膵臓癌細胞株2種類(PK-59、Capan-2)における代謝関連因子の発現をウェスタンブロット法で解析する。

(2) 代謝サブタイプの異なる膵臓癌細胞の in vitro におけるウイルス感受性の比較検討

解糖系のヒト膵臓癌細胞株2種類と非解糖系のヒト膵臓癌細胞株2種類におけるp53搭載型OBP-702やp53非搭載型OBP-301に対する感受性をXTTアッセイで解析する。さらに、緑色蛍光タンパク質(GFP)搭載型のOBP-401によるGFP誘導を蛍光顕微鏡で観察する。

(3) 代謝サブタイプの異なる膵臓癌細胞におけるウイルス受容体やインテグリンの比較検討

解糖系のヒト膵臓癌細胞株2種類と非解糖系のヒト膵臓癌細胞株2種類におけるウイルス感受性の違いのメカニズムを明らかにするために、細胞表面のコクサッキー・アデノウイルス受容体(CAR)やインテグリン α V β 3、 α V β 5の発現をFACS法で解析する。

(4) 代謝サブタイプの異なる膵臓癌細胞におけるウイルスE1A、p53、細胞死誘導の比較検討

解糖系のヒト膵臓癌細胞株2種類と非解糖系のヒト膵臓癌細胞株2種類を用いてウイルス感染後のE1A遺伝子の発現レベルをPCR法で確認する。ウイルス感染後のp53、アポトーシス、オートファジーの誘導変化はウェスタンブロット法で解析する。

(5) 代謝調節剤で処理した場合の in vitro におけるウイルス感受性の変化の検討

解糖系のヒト膵臓癌細胞株2種類と非解糖系のヒト膵臓癌細胞株2種類を用いて代謝調節剤で処理した場合のウイルス感受性の変化をXTTアッセイで解析する。代謝調節剤の処理による代謝関連因子やウイルス関連因子の発現変化はウェスタンブロット法やPCR法で解析する。

(6) 代謝サブタイプの異なる膵臓癌細胞の in vivo におけるウイルス感受性の比較検討

解糖系のヒト膵臓癌細胞株(MIAPaCa-2)と非解糖系のヒト膵臓癌細胞株(PK-59)をそれぞれヌードマウスに皮下移植した腫瘍動物モデルを用いて in vivo におけるウイルス感受性の違いを確認し、腫瘍組織の代謝環境を免疫組織染色法やPET-CTで解析する。

(7) 代謝調節剤で処理した場合の in vivo におけるウイルス感受性の変化の検討

ウイルス抵抗性を示す非解糖系のヒト膵臓癌細胞株(PK-59)をヌードマウスに皮下移植した腫瘍動物モデルを用いてウイルスと代謝調節剤を併用した場合の治療効果を確認する。

4. 研究成果

(1) 代謝サブタイプの異なる膵臓癌細胞における代謝関連マーカーの比較検討

解糖系のヒト膵臓癌細胞株2種類(MIAPaCa-2、PK-45H)と非解糖系のヒト膵臓癌細胞株2種類(PK-59、Capan-2)における代謝関連因子の発現をウェスタンブロット法で解析し、解糖系の膵臓癌細胞は非解糖系に比べてピルビン酸から乳酸への変換を触媒する乳酸脱水素酵素-A(LDHA)の発現レベルが高いことを確認した。一方、細胞内へのグルコースの取り込みに関わるグルコーストランスポーター1(GLUT1)の発現レベルは関連しなかった。

(2) 代謝サブタイプの異なる膵臓癌細胞の in vitro におけるウイルス感受性の比較検討

解糖系と非解糖系のヒト膵臓癌細胞株を用いて OBP-702 に対する感受性を XTT アッセイで解析し、解糖系の膵臓癌細胞は非解糖系に比べてウイルス感受性が高いことを確認した。ウイルス感受性の違いは p53 非搭載型の OBP-301 でも同様の結果であった。さらに、GFP 搭載型の OBP-401 による GFP 誘導の違いも同様の結果であった。

(3) 代謝サブタイプの異なる膵臓癌細胞におけるウイルス受容体やインテグリンの比較検討

ウイルス感受性の違いのメカニズムを明らかにするために、解糖系と非解糖系のヒト膵臓癌細胞株の細胞表面の CAR やインテグリン $\alpha V\beta 3$ 、 $\alpha V\beta 5$ の発現を FACS 法で解析したが、大きな違いは認めなかった。

(4) 代謝サブタイプの異なる膵臓癌細胞におけるウイルス E1A、p53、細胞死誘導の比較検討

解糖系と非解糖系のヒト膵臓癌細胞株を用いてウイルス感染後の E1A、p53、アポトーシス、オートファジーの誘導変化を PCR 法とウェスタンブロット法で解析し、OBP-702 による E1A、p53、アポトーシス、オートファジーの誘導効果は解糖系より非解糖系で著明に低下していることを確認した。

(5) 代謝調節剤で処理した場合の in vitro におけるウイルス感受性の変化の検討

解糖系のヒト膵臓癌細胞株に解糖系代謝を阻害する ERK 阻害剤 (SCH772984) やグルコースの取り込みを阻害する薬剤 (2DG) で処理したところ、ウイルス感受性が低下した。一方、非解糖系のヒト膵臓癌細胞株に解糖系代謝を誘導する低酸素暴露、低グルコース培養、ミトコンドリア代謝阻害剤 (CPI-613) で処理したところ、ウイルス感受性が改善した。ウイルス感受性の変化に一致して、LDH-A、ウイルス E1A、p53、アポトーシス、オートファジーの誘導も変化していた。

(6) 代謝サブタイプの異なる膵臓癌細胞の in vivo におけるウイルス感受性の比較検討

解糖系のヒト膵臓癌細胞株 (MIAPaCa-2) と非解糖系のヒト膵臓癌細胞株 (PK-59) をそれぞれヌードマウスに皮下移植した腫瘍動物モデルを用いてウイルス感受性を検討した。OBP-702 あるいは PBS を 1 日おきに 3 回腫瘍内投与し、治療開始から 28 日目まで週 2 回で腫瘍体積を計測した。解糖系の MIAPaCa-2 腫瘍は OBP-702 治療により著明に腫瘍が縮小したが、非解糖系の PK-59 腫瘍は OBP-702 治療に抵抗性を示した。解糖系と非解糖系の腫瘍を免疫組織染色法で解析し、解糖系腫瘍は非解糖系腫瘍より LDHA 発現が増強していた。一方、非解糖系腫瘍の低酸素領域に LDHA 発現が高いことを確認した。さらに、PET-CT で LDHA 発現と相関する代謝パラメーターを確認した。

(7) 代謝調節剤で処理した場合の in vivo におけるウイルス感受性の変化の検討

非解糖系のヒト膵臓癌細胞株 (PK-59) をヌードマウスに皮下移植した腫瘍動物モデルを用いてミトコンドリア代謝阻害剤 (CPI-613) と OBP-702 の併用効果を検討した。OBP-702 あるいは PBS を 1 日おきに 3 回腫瘍内投与し、CPI-613 あるいは溶媒をウイルス初回投与時に 1 回腹腔内投与した。治療開始から 14 日目まで週 2 回で腫瘍体積を計測した。OBP-702 あるいは CPI-613 の単独治療は腫瘍増殖を抑制しなかったが、OBP-702 と CPI-613 の併用治療はコントロール群や単独治療群よりも有意に腫瘍増殖を抑制することを確認した。

以上の研究成果から、ヒト膵臓癌細胞のウイルス感受性には解糖系代謝の誘導が重要であることが示唆された。一方、ミトコンドリア代謝は非解糖系の膵臓癌細胞にウイルス抵抗性を誘導する治療ターゲットとなる可能性が示唆された。今後は膵臓癌の解糖系代謝を評価するバイオマーカーの開発が OBP-702 を用いた個別化治療の実現に重要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kakiuchi Y, Kuroda S, Kanaya N, Kagawa S, Tazawa H, Fujiwara T	4. 巻 27
2. 論文標題 Exosomes as a drug delivery tool for cancer therapy: a new era for existing drugs and oncolytic viruses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Expert Opin Ther Targets	6. 最初と最後の頁 807-816
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14728222.2023.2259102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hori N, Tazawa H, Li Y, Okura T, Kikuchi S, Kuroda S, Ohara T, Noma K, Nishizaki M, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T	4. 巻 43
2. 論文標題 Intraperitoneal administration of p53-armed oncolytic adenovirus inhibits peritoneal metastasis of diffuse-type gastric cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 4809-4821
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.16678	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamura S, Tazawa H, Hori N, Li Y, Yamada M, Kikuchi S, Kuroda S, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T	4. 巻 18
2. 論文標題 p53-armed oncolytic adenovirus induces autophagy and apoptosis in KRAS and BRAF-mutant colorectal cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0294491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0294491	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto M, Kuroda S, Kanaya N, Kadowaki D, Yoshida Y, Sakamoto M, Hamada Y, Sugimoto R, Yagi C, Ohtani T, Kumon K, Kakiuchi Y, Yasui K, Kikuchi S, Yoshida R, Tazawa H, Kagawa S, Yagi T, Urata Y, Fujiwara T	4. 巻 130
2. 論文標題 Long-term activation of anti-tumor immunity in pancreatic cancer by a p53-expressing telomerase-specific oncolytic adenovirus	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Br J Cancer	6. 最初と最後の頁 1187-1195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-024-02583	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uotani K, Tazawa H, Hasei J, Fujiwara T, Yoshida A, Yamakawa Y, Omori T, Sugiu K, Komatsubara T, Kondo H, Morita T, Kiyono M, Yokoo S, Hata T, Kunisada T, Takeda K, Urata Y, Fujiwara T, Ozaki T	4. 巻 19
2. 論文標題 Fluorescence-guided assessment of bone and soft-tissue sarcomas for predicting the efficacy of telomerase-specific oncolytic adenovirus	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0298292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0298292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa T, Kikuchi S, Tabuchi M, Mitsui E, Une Y, Tazawa H, Kuroda S, Noma K, Ohara T, Kagawa S, Urata Y, Fujiwara T	4. 巻 25
2. 論文標題 Modulation of cancer-associated fibroblasts by oncolytic adenovirus-mediated p53 gene therapy overcomes peritoneal metastasis of gastric cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Ther Oncolytics	6. 最初と最後の頁 249-261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2022.04.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Araki H, Tazawa H, Kanaya N, Kajiwara Y, Yamada M, Hashimoto M, Kikuchi S, Kuroda S, Yoshida R, Umeda Y, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T	4. 巻 27
2. 論文標題 Oncolytic virus-mediated p53 overexpression promotes immunogenic cell death and efficacy of PD-1 blockade in pancreatic cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Ther Oncolytics	6. 最初と最後の頁 3-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2022.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kajiwara Y, Tazawa H, Yamada S, Kanaya N, Fushimi T, Kikuchi S, Kuroda S, Ohara T, Noma K, Yoshida R, Umeda Y, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T	4. 巻 72
2. 論文標題 Oncolytic virus-mediated reducing of myeloid-derived suppressor cells enhances the efficacy of PD-L1 blockade in gemcitabine-resistant pancreatic cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother	6. 最初と最後の頁 1285-1300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-022-03334-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirakawa Y, Tazawa H, Tanabe S, Kanaya N, Noma K, Koujima T, Kashima H, Kato T, Kuroda S, Kikuchi S, Kagawa S, Katsui K, Kanazawa S, Urata Y, Fujiwara T	4. 巻 153
2. 論文標題 Phase I dose-escalation study of endoscopic intratumoral injection of OBP-301 (Telomelysin) with radiotherapy in oesophageal cancer patients unfit for standard treatments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur J Cancer	6. 最初と最後の頁 98 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejca.2021.04.043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masuda T, Tazawa H, Hashimoto Y, Ieda T, Kikuchi S, Kuroda S, Noma K, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T	4. 巻 76
2. 論文標題 Overexpression of adenovirus E1A reverses transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition in human esophageal cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Med Okayama	6. 最初と最後の頁 203-215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18926/AMO/63425	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tazawa H, Shigeyasu K, Noma K, Kagawa S, Sakurai F, Mizuguchi H, Kobayashi H, Imamura T, Fujiwara T	4. 巻 113
2. 論文標題 Tumor targeted fluorescence labeling systems for cancer diagnosis and treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 1919-1929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15369	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 田澤大、梶原義典、菊地覚次、黒田新士、野間和広、浦田泰生、香川俊輔、藤原俊義
2. 発表標題 ゲムシタピン耐性膵臓癌に対するp53搭載腫瘍融解ウイルスと抗PD-L1抗体を併用した複合免疫療法の開発
3. 学会等名 第44回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 永井康雄、田澤大、菊地覚次、黒田新士、野間和広、浦田泰生、香川俊輔、藤原俊義
2. 発表標題 膵臓癌が誘導する癌関連線維芽細胞に対する腫瘍融解ウイルス療法の治療効果
3. 学会等名 第44回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤田脩斗、田澤大、梶原義典、菊地覚次、黒田新士、野間和広、浦田泰生、香川俊輔、藤原俊義
2. 発表標題 膵癌に対するp53誘導腫瘍融解ウイルスと免疫チェックポイント阻害剤を用いた複合免疫療法
3. 学会等名 第36回日本バイオセラピー学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 陶守貴人、田澤大、山田元彦、菊地覚次、黒田新士、野間和広、浦田泰生、香川俊輔、藤原俊義
2. 発表標題 p53感作樹状細胞ワクチンとp53武装化ウイルス免疫療法の併用によるアブスコパル効果の誘導
3. 学会等名 第36回日本バイオセラピー学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 庄司良平、田澤大、菊地覚次、黒田新士、吉田龍一、浦田泰生、香川俊輔、藤原俊義
2. 発表標題 難治性膵臓癌に対する代謝調節剤を併用したp53武装化アデノウイルス療法の治療戦略
3. 学会等名 第43回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shoji R, Tazawa H, Kikuchi S, Kuroda S, Yoshida R, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T
2. 発表標題 Metabolic reprogramming by anti-mitochondrial agent promotes sensitivity to oncolytic adenoviruses in non-glycolytic pancreatic cancer
3. 学会等名 第28回日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 庄司良平、田澤大、菊地覚次、黒田新士、吉田龍一、浦田泰生、香川俊輔、藤原俊義
2. 発表標題 難治性膵臓癌に対するミトコンドリア阻害剤と腫瘍融解ウイルスの併用療法
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shoji R, Tazawa H, Nagai Y, Yamada M, Kajiwara Y, Kikuchi S, Kuroda S, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T
2. 発表標題 Metabolic reprogramming by anti-mitochondrial agent promotes the antitumor efficacy of telomerase-specific oncolytic adenoviruses against virotherapy-resistant pancreatic cancer
3. 学会等名 14th International Oncolytic Virotherapy Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 庄司良平、田澤大、梶原義典、李云成、山田元彦、井上弘章、永井康雄、菊地覚次、黒田新士、吉田龍一、浦田泰生、香川俊輔、藤原俊義
2. 発表標題 膵臓癌の代謝サブタイプが腫瘍融解アデノウイルスに対する感受性を運命づける
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 庄司良平、田澤大、吉田龍一、浦田泰生、香川俊輔、藤原俊義
2. 発表標題 膵臓癌の代謝サブタイプに基づくp53誘導性腫瘍融解ウイルス療法の治療戦略
3. 学会等名 第34回日本バイオセラピー学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	庄司 良平 (Shoji Ryohei) (90963041)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------