

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25年6月15日現在

機関番号：34519
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2010～2012
課題番号：22590370
研究課題名（和文） 腫瘍溶解アデノウイルスを用いた悪性中皮腫に対する新規治療法の開発
研究課題名（英文） Development of oncolytic adenovirus as a new therapeutic agent for treating human malignant mesothelioma
研究代表者
久保 秀司 (KUBO SHUJI)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10441320

研究成果の概要（和文）：

癌特異的なミッドカインプロモーターによりウイルスの複製及び自殺遺伝子の発現が制御される腫瘍溶解アデノウイルスを開発し、1) 悪性中皮腫細胞を初めとする多くの癌細胞特異的に細胞障害をきたす事、2) ヒト悪性中皮腫細胞株を皮下、胸腔内、腹腔内に移植した担癌マウスにおける抗腫瘍効果、3) 自殺遺伝子療法併用による抗腫瘍効果の増強を示した。本研究の成果は、我々が開発した本ウイルスが悪性中皮腫の新規治療法として臨床応用される道への第一歩である。

研究成果の概要（英文）：

Our new oncolytic adenovirus, in which adenoviral replication and HSV-TK suicide gene expression was transcriptional regulated by tumor-specific midkine promoter, achieved: 1) tumor-specific lytic spread of the virus, 2) anti-tumor effect in subcutaneous, intrathoracic, and intraperitoneal mesothelioma mouse models, and 3) enhanced anti-tumor effect by suicide gene activation. The midkine-promoter regulated oncolytic virus represents a promising general strategy for oncolytic virotherapy of cancers with upregulated midkine expression, including malignant mesothelioma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍、悪性中皮腫

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫は予後が極めて不良の悪性腫瘍である。未だ標準的治療法の確立されない本疾患に対し、我々は新規治療法として腫瘍溶解アデノウイルスの開発を目指した。本研究申請以前に我々は、正常細胞では発現しな

いミッドカインという成長因子が、ヒト悪性中皮腫や膀胱癌などの癌細胞株で高発現している事を発見した。そこで、ミッドカインプロモーターによって複製制御される増殖型アデノウイルス（腫瘍溶解アデノウイルス）のプロトタイプ（第1世代）を作製し、ヒト

膀胱癌細胞株の皮下移植ヌードマウスで抗腫瘍効果を検討したところ、従来の非増殖型ウイルスに比べ高い感染率が得られ、強力な腫瘍増殖抑制効果を得る事に成功した。この成果が悪性中皮腫治療に適応できるか否かを明らかにするために、第2世代の腫瘍溶解アデノウイルスを新たに作製した。本ウイルスには、抗腫瘍効果を増強するために自殺遺伝子(HSV-TK)を搭載させた。但し、腫瘍特異性を堅固に保つように、ウイルスの複製のみならず自殺遺伝子の発現もミッドカインプロモーターによって制御されるように設計した。この第2世代ウイルスは腫瘍細胞特異的なウイルスの複製と細胞障害性を発揮し、*in vitro*の予備実験において、ヒト正常細胞と比べ、ヒト悪性中皮腫細胞に対し $10^2\sim 10^5$ 倍以上強い細胞障害活性を示す事をいくつかの予備実験を行い確認を終えていた。

また当時、我々は大腸癌及び骨肉腫の転移・播種モデルにおける高感度 *in vivo* 蛍光イメージングに成功し、マウス体内に移植した蛍光標識腫瘍細胞をリアルタイムに観察できるようになっていた。

2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に作製した腫瘍溶解アデノウイルス(第2世代)の悪性中皮腫に対する有効性を動物実験モデルにおいて検討する事を主たる目的とした。このため、

- (1) *in vivo* 蛍光イメージングによる非侵襲的な診断・治療評価が可能な悪性中皮腫モデルマウスを作製し、このモデルを用いて、
- (2) 本ウイルスの抗腫瘍効果及び安全性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 蛍光蛋白発現ヒト悪性中皮腫細胞株と移植マウスの作製

①赤色蛍光蛋白発現細胞株の樹立: mCherry(組織透過性の高い赤色蛍光)で蛍光標識したヒト悪性中皮腫細胞株(MSTO-211H、ACC-MESO-1及びACC-MESO-4)を、レンチウイルスベクターを用いて作製する。細胞を限界希釈し継代を続け、安定して強い蛍光を発現する細胞クローンを選別し、後の実験に用いる。

②ヒト悪性中皮腫致死性進行癌モデルマウスの作製: (1)-①で蛍光標識したヒト中皮腫細胞を、ヌードマウスの胸腔内(胸膜中皮腫モデル)、あるいは腹腔内(腹膜中皮腫モデル)に移植する。

(2) *in vivo* イメージングを用いた悪性中皮腫致死性進行癌モデルマウスの評価法の確立

①*in vivo* イメージングシステムによる蛍光

シグナルの検出: (1)-②で作製したマウスを *in vivo* imaging system (MAESTRO, CRi)を用い経時的に解析し、蛍光標識腫瘍細胞を追跡し、浸潤・遠隔臓器への転移を観察する。
②胸膜中皮腫モデル及び腹膜中皮腫モデルの評価: 上記マウスの一部を経時的に安楽死させ、病理組織学的検討を行い、イメージングで得られた情報との整合性を評価する。一方で、移植細胞数毎の腫瘍生着率、生存率、平均生存期間などを比較検討し、同モデルを確立する。

③ヒト悪性中皮腫致死モデルマウスにおける腫瘍溶解アデノウイルスの腫瘍内増殖伝播の評価: 腫瘍溶解アデノウイルスには感染細胞が *in vivo* イメージングなどで判別できるように GFP(緑色蛍光)発現単位を搭載させた。これにより腫瘍へのウイルスの感染効率と腫瘍内伝播効率を評価する。

(3) 悪性中皮腫モデルを用いた腫瘍溶解アデノウイルスの抗腫瘍効果判定と安全性評価

①皮下移植モデルにおける検討: ヒト悪性中皮腫細胞株をヌードマウスに皮下移植した動物モデルを作製し、ウイルスを腫瘍内接種する。抗腫瘍効果の判定は、イメージングの解析結果や病理組織学的に得られた腫瘍体積を比較検討する事により行う。

②悪性中皮腫致死モデルを用いた検討: (2)-②で確立した方法で得られた致死モデルマウスに、既に作製済みの下図に示す4種類のウイルスを接種(腹腔内あるいは胸腔内)する。抗腫瘍効果の判定は、イメージングの解析結果や病理組織学的に得られた腫瘍体積を比較検討する事により行う。また、生存期間の群間での差異についても検討する。

③自殺遺伝子療法併用効果検討: 腫瘍溶解アデノウイルスに搭載した自殺遺伝子 HSV-TK のプロドラッグであるガンシクロビルの投与で、抗腫瘍効果の増強が認められるかどうかを検討する。

④安全性評価: 腫瘍溶解アデノウイルス接種後、経日的に血清 AST、ALT、BUN、クレアチニン値を測定する。また、主要臓器を摘出し、臓器障害の有無を病理組織学的に検討する。

4. 研究成果

(1) 蛍光蛋白発現ヒト悪性中皮腫細胞株と移植マウスの作製

ヒト由来悪性中皮腫細胞にレンチウイルスベクターを用いて monomeric Cherry (mCherry; maximum excitation (Ex)/maximum emission (Em) = 587/610 nm)、monomeric red fluorescent protein (mRFP; Ex/Em = 584/607 nm)、monomeric Plum (mPlum; Ex/Em = 590/649 nm)、enhanced green

fluorescent protein (EGFP: Ex/Em = 488/507 nm)の4種類の蛍光標識したヒト悪性中皮腫細胞株を作製し、クローン化した。これらの蛍光標識中皮腫細胞株をヌードマウスにそれぞれ皮下接種したところ、腫瘍形成能及び増殖能には差異が認められなかったが、蛍光シグナルの発現はmCherryが他の蛍光タンパクに比べ強い事が解った (図1)。

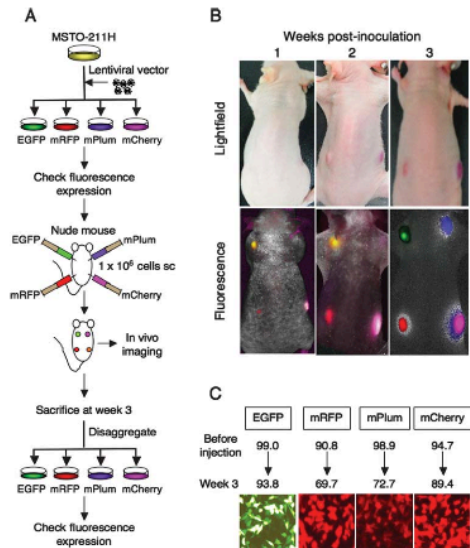


図1 Establishment of fluorescence-labeled human malignant mesothelioma cell lines and stability of fluorescence expression after *in vivo* passage in nude mice.

(2) *in vivo* イメージングを用いた悪性中皮腫致死性進行癌モデルマウスの評価法の確立

mCherry 標識腫瘍細胞をヌードマウスの腹腔内接種し、Maestro を用いて経時的に解析する事で蛍光標識腫瘍細胞を追跡した。その結果、腫瘍の生着、浸潤の様子を経時的に観察する事に成功した (図2A, B)。

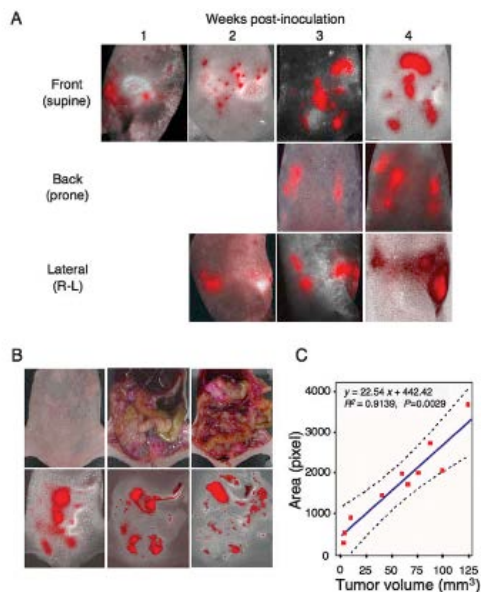


図2 Whole-body fluorescence imaging in an intraperitoneal mesothelioma xenotransplant model.

イメージングの解析結果と病理組織学的結果とを比較検討した結果、腹膜中皮腫モデルでは、イメージングの解析結果と病理組織学的に得られた腫瘍体積が相関する事が判明した (図2C)。また腫瘍細胞 (1×10^6 個) 移植後、全例の死亡が確認され、Median survivalは腹膜中皮腫モデルでは 35 日であった。

次に標識腫瘍細胞をヌードマウスの胸腔内接種し、同様の検討を行い、腫瘍の生着、浸潤の様子を経時的に観察する事に成功した。これによって 1mm大の微小腫瘍のシグナルが、胸骨や肋骨を通してでも感度よく検出できる事が解った。腫瘍細胞 (5×10^5 個) 移植後、全例の死亡が確認され、Median survivalは胸膜中皮腫モデルでは 26 日であった。

最後に悪性中皮腫の腹膜播種モデルマウスを作製し、腫瘍溶解ウイルス (GFP 陽性) を投与する実験を行った。この結果、イメージングにより、腫瘍 (mCherry 陽性) への効果的なウイルス感染と腫瘍内でのウイルス拡散の様子を観察する事ができた (図3)。

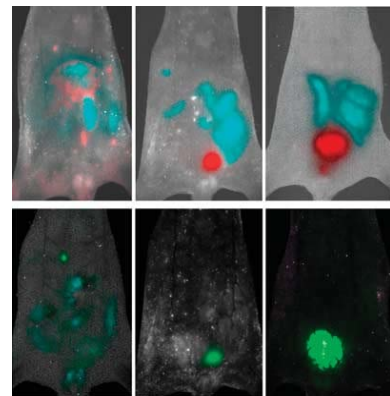


図3 In vivo spread of oncolytic virus in intraperitoneal xenograft

(3) 悪性中皮腫モデルを用いた腫瘍溶解アデノウイルスの抗腫瘍効果判定と安全性評価

①皮下移植モデルにおける検討

ACC-MESO-4 細胞株をヌードマウスに皮下移植した動物モデルでの検討では、腫瘍溶解ウイルスの腫瘍内投与により腫瘍の完全退縮 (消失) が認められた。また MSTO-211H 細胞株を用いた検討でも、腫瘍溶解ウイルスは強い抗腫瘍効果を示した。

②悪性中皮腫致死モデルを用いた検討

MSTO-211H 細胞株を用いた致死性進行癌モデルにおいて抗腫瘍剤シスプラチンの抗腫瘍効果がイメージングで判定できるかどうかを検討したが、シスプラチン単独では有意な

抗腫瘍効果が得られなかった。しかし、腹膜中皮腫モデルにおける腫瘍溶解アデノウイルスを用いた予備的治療実験においては、腫瘍の縮小及び生存期間の延長が得られた。今後実験の規模を拡大して結論を確定づけ、さらにその有効性を示して行くとともに、抗癌剤との併用効果などについても研究を進めて行きたい。

③自殺遺伝子療法の併用効果検討

MSTO-211H 細胞株を用いた致死性進行癌モデル治療実験において、同ウイルスは自殺遺伝子療法の併用（プロドラッグ投与）により、腫瘍増殖の抑制と生存期間の延長が示された（図4）。

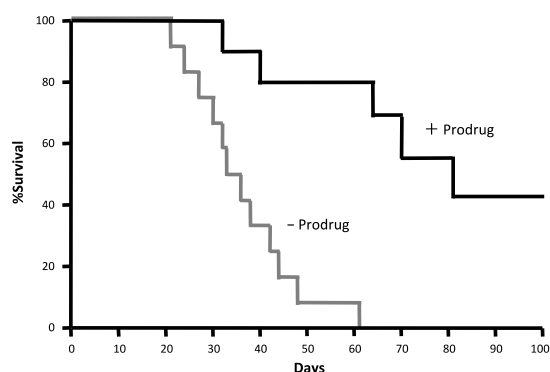


図4 Survival after intraperitoneal inoculation of MSTO-211 cells pretransduced with the oncolytic virus

また皮下腫瘍モデルにおける検討で、MSTO-211H 細胞株を用いたモデルでは、プロドラッグ投与により抗腫瘍効果の増強が得られた。一方、ACC-MESO-4 細胞株を用いたモデルでは、腫瘍溶解ウイルス単独で腫瘍の完全退縮を認めるものが多く、プロドラッグ投与によりむしろ抗腫瘍効果が抑制される傾向が見られ、プロドラッグの早期投与により、ウイルスの増殖及び腫瘍内伝播がむしろ抑制される場合がある事が示唆された。今後、ウイルス接種後のガンシクロビル投与開始時期、投与量、投与期間などについても条件検討を行いたい。

④安全性評価

腫瘍特異的なミッドカインプロモーター及び普遍的に発現する CMV プロモーターによって複製制御される増殖型アデノウイルスをヌードマウスに静脈内投与 3 日後及び投与前の血清 AST、ALT、BUN、クレアチニン値を測定した。BUN、クレアチニン値にはいずれも有意な変化・差異を認めなかった。一方、AST、ALT 値に関しては、ミッドカインプロモーター制御型腫瘍溶解ウイルスについては有意な変化を認めなかったが、CMV プロモーター制御型ウイルスを投与後に著明な上昇を認めた。摘出肝を病理組織学的に検討したところ、CMV プロモーター制御型ウイルスを投与後したマウスの肝臓では著明な肝細胞死（TUNEL 陽性）が生じていた

が、ミッドカインプロモーター制御型ではほぼ正常であり、ミッドカインプロモーター制御型腫瘍溶解ウイルスの特に肝臓に対する安全性が示された。

以上の結果を纏めると、癌特異的なミッドカインプロモーターによりウイルスの複製及び自殺遺伝子の発現が制御される腫瘍溶解アデノウイルスは、1) 正常細胞には傷害を与えないが、悪性中皮腫細胞に細胞障害をきたす事、2) ヒト悪性中皮腫細胞株を皮下、胸腔内、腹腔内に移植した担癌マウスにおける抗腫瘍効果、3) 自殺遺伝子療法併用による抗腫瘍効果の増強、4) 肝臓に対する安全性向上等を示し、悪性中皮腫の新規治療法として期待された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Hybrid Vectors as Trojan Horses; Adventure with Adenovirus for Successful Gene Therapy. Kubo S Acta Med. Hyogo 2012;37:95-104. 査読有
- ② Replication-competent retrovirus vector-mediated prodrug activator gene therapy in experimental models of human malignant mesothelioma. Kawasaki Y, Tamamoto A, Takagi-Kimura M, Maeyama Y, Yamaoka N, Terada N, Okamura H, Kasahara N, Kubo S. Cancer Gene Ther. 2011;18:571-8. doi: 10.1038/cgt.2011.25. 査読有
- ③ Adenovirus-retrovirus hybrid vectors achieve highly enhanced tumor transduction and antitumor efficacy in vivo. Kubo S, Haga K, Tamamoto A, Palmer DJ, Ng P, Okamura H, Kasahara N. Mol Ther. 2011;19:76-82. doi: 10.1038/mt.2010.182. 査読有
- ④ Complete regression of human malignant mesothelioma xenografts following local injection of midkine promoter-driven oncolytic adenovirus. Kubo S, Kawasaki Y, Yamaoka N, Tagawa M, Kasahara N, Terada N, Okamura H. J Gene Med. 2010;12:681-92. doi: 10.1002/jgm.1486. 査読有
- ⑤ Establishment of in vivo fluorescence imaging in mouse models of malignant mesothelioma. Yamaoka N, Kawasaki Y, Xu Y, Yamamoto H, Terada N, Okamura H, Kubo S. Int J Oncol. 2010;37:273-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20596654> 査読有

[学会発表] (計 16 件)

- ① 久保秀司 悪性中皮腫に対する二重制御型腫瘍溶解アデノウイルスの開発. 第 71 回

日本癌学会学術総会 2012年9月20日 札幌市

- ② 久保秀司 Replication-competent retrovirus vector-mediated suicide gene therapy in experimental models of human malignant mesothelioma. 11th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group 2012年9月12日 Boston (米国)
- ③ 久保秀司 悪性中皮腫に対する二重制御型(転写制御+ファイバー置換)腫瘍溶解アデノウイルスの開発. 第19回日本遺伝子診療学会大会 2012年7月27日 千葉市
- ④ 久保秀司 Hybrid vector as Trojan horses; Adventure with adenovirus for long-term gene expression through permanent chromosomal integration. 第18回日本遺伝子治療学会学術集会(招待講演) 2012年6月30日 熊本市
- ⑤ 久保秀司 Enhanced transduction of human malignant mesothelioma cells by midkine promoter-driven oncolytic adenovirus with Ad35 fiber modification. 第18回日本遺伝子治療学会学術集会 2012年6月29日 熊本市
- ⑥ 久保秀司 Midkine promoter-driven oncolytic adenovirus with Ad35 fiber modification achieves enhanced transduction of human malignant mesothelioma cells in vitro and in vivo. 15th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy 2012年5月17日 Philadelphia (米国)
- ⑦ 久保秀司 Adventure of gene therapy with adenovirus. 第14回外科分子細胞治療研究会(招待講演) 2012年4月12日 千葉市
- ⑧ 久保秀司 Midkine promoter-regulated oncolytic adenovirus achieved complete and sustained tumor regression of human malignant mesothelioma xenografts in athymic mice. 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月14日 横浜市
- ⑨ 久保秀司 In vivo fluorescence imaging of malignant mesothelioma in mice for the evaluation of cancer gene therapy using replication-competent virus. 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月14日 横浜市
- ⑩ 久保秀司 増殖型ウイルスを用いた悪性中皮腫に対する自殺遺伝子療法. 日本人類遺伝学会第56回大会 2011年11月10日 千葉市
- ⑪ 久保秀司 Replication-competent retrovirus vector-mediated prodrug activator gene therapy in experimental models of human malignant mesothelioma. 第17回日本遺伝子治療学会 2011年7月15

日 福岡市

- ⑫ 久保秀司 Complete and sustained tumor regression of human malignant mesothelioma xenografts in athymic nude mice following local injection of midkine promoter-regulated oncolytic adenovirus. 14th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy 2011年5月20日 シアトル (米国)
- ⑬ 久保秀司 Establishment of in vivo fluorescence imaging models for human malignant mesothelioma in mice. 第33回日本分子生物学会年会 2010年12月9日 神戸市
- ⑭ 久保秀司 制限増殖型アデノウイルスを用いた悪性中皮腫に対する腫瘍溶解療法 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月23日 大阪市
- ⑮ 久保秀司 Complete and sustained tumor regression of human malignant mesothelioma xenografts in athymic mice following local injection of midkine promoter-regulated oncolytic adenovirus. The 10th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group 2010年9月2日 京都市
- ⑯ 久保秀司 Midkine promoter-driven oncolytic adenovirus achieves effective targeting of human malignant mesothelioma cells in vitro and in vivo. 第16回日本遺伝子治療学会 2010年7月1日 栃木市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 秀司 (KUBO SHUJI)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10441320

(2) 研究分担者

岡村 春樹 (OKAMURA HARUKI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60111043
寺田 信行 (TERADA NOBUYUKI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50150339

(3) 連携研究者

なし