

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591951

研究課題名(和文) 制限増殖型アデノウイルスおよび化学療法剤との併用による消化器癌に対する抗腫瘍効果

研究課題名(英文) Combinatory use of replication-competent adenoviruses and chemotherapeutic agents produces anti-tumor effects on human esophageal carcinoma cells

研究代表者

田川 雅敏 (Tagawa, Masatoshi)

千葉県がんセンター(研究所)・がん治療開発グループ・部長

研究者番号：20171572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本邦における死亡の第一原因は癌であり、約半数の日本人がこれに罹患している。そのなかでも、消化器固形癌はその頻度が高く、手術適応とならない進行癌の症例では、有用な治療手段がなく緩和ケアに移行せざるを得ないのが現状である。そこで本研究では、従来の治療法とは全く異なる概念で、アデノウイルスの増殖による遺伝子医薬の有用性を検討し、従来の化学療法剤との併用効果があることを明らかにした。風邪ウイルスである同ウイルスの遺伝子を組換えて、その増殖をヒトの腫瘍で高発現を示す遺伝子の転写調節領域で制御させ、かつ感染効率を増強させた人工ウイルスを作製した。同ウイルスは動物実験でも食道癌に対して有用性を発揮した。

研究成果の概要(英文)：We examined a novel therapeutic strategy for intractable cancer in particular esophageal carcinoma. We replaced a transcriptional regulatory region of the E1 region-encoded genes in adenoviruses (Ad) with a 5' region of a gene that was highly expressed in human tumors but not in normal tissues such as midkine, survivin and cyclooxygenase-2. We also changed the fiber region of conventional type 5 Ad, which played a key role in infecting target cells, with a type 35-derived fiber region. The modification increased the viral infectivity since an expression level of the CAR molecules, which were a cellular receptor of type 5 Ad, were often down-regulated in human tumors. In contrast, the expression of CD46 molecules, which are the major receptor of type 35 Ad, is rather up-regulated in human tumors. The fiber replacement greatly enhanced Ad infectivity in CAR-low tumors and subsequently enhanced the Ad-mediated cytotoxicity, and produced combinatory effects with anti-cancer agents.

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：遺伝子 ウイルス 癌 受容体 化学療法 CD46 抗腫瘍効果

1. 研究開始当初の背景

消化器固形癌は日本人においてその頻度が高く、死亡者数としても常に上位を占める疾患である。早期発見の場合は、現在の治療法でも対応出来る症例も少なくないが、再発例や進行癌となった場合、さらに化学療法が無効になった症例では、有用な治療手段は残されていない。そこで、従来の治療方法とは全く異なる手段によって、直接的に殺細胞効果を狙う治療戦略を構築するために、風邪ウイルスであるアデノウイルスの遺伝子を組換えて、腫瘍に特異性を有して増殖し、その結果腫瘍を破壊する制限増殖型アデノウイルスの有用性について検討することにした。増殖性ウイルスによる細胞傷害活性は、従来の抗がん剤とその作用機序が異なると推定され、そのためウイルス製剤と化学療法との併用も可能と考えられる。このように新規治療法の開発は、現行の治療法の選択肢を拡大させることが可能であり、化学療法剤無効症例に対しても、一定療効果を発揮できる利点がある。当該組換え型アデノウイルスは、正常細胞等に感染しても、ウイルス増殖が起こらないように工夫されており、そのため腫瘍に特異性が高いため、比較的安全に投与することが可能であると考えられる。また、ウイルスの投与は特別な手技を必要とせず、通常の内視鏡で腫瘍局所に投与が可能であり、また抗がん剤とは異なり免疫応答を抑制することがないため、比較的高齢者であって、使用することが可能であり、ヒトに優しい治療法であると考えられる。

2. 研究の目的

細胞融解性を有するウイルスのなかで、野生型のアデノウイルス(タイプ5型)は強力な融解能を保持している。そこで、このウイルスの初期応答遺伝子で、ウイルスや宿主細胞の遺伝子の転写を制御する E1 領域の遺伝子(E1A および E1B)を、正常細胞に比較して腫瘍組織においてより強力に発現させれば、腫瘍に特異性を有した細胞融解を引き起こすことができるはずである。すなわち腫瘍に比較的特異性を有し、かつ消化器癌に高頻度に発現上昇が見られる遺伝子の転写調節領域を用いて、E1 領域遺伝子の発現を制御させたウイルスを用いれば、消化器癌を効果的に融解させることが可能となるはずである。そこで本研究では、細胞増殖速度に応じて発現が上昇し消化器癌等で高頻度かつ高発現をみるミッドカイン(midkine) 遺伝子の転写調節領域、細胞周期の G2/M 期に発現が亢進し、細胞増殖に関連して転写調節が上昇するサバイビン(survivin) 遺伝子、消化器癌での発現上昇が著しい COX-2 (cyclooxygenase-2) 遺伝子の転写調節領域を E1 領域遺伝子の直前に配して、当該遺伝子の発現を制御させる組換えアデノウイルスを作製し、その抗腫瘍効果を検討する。

また、ウイルスの標的細胞への感染効率を

向上させるため、腫瘍細胞で高い発現を示す分子を受容体とするウイルスへと、その受容体結合構造の一部を変換する。従来のタイプ5型ウイルスの標的細胞への感染効率は、ウイルスの外殻蛋白の一種であるファイバー構造と細胞側の受容体である CAR 分子との結合に主に依存している。しかし、多くの消化器癌においては、この CAR 発現がしばしば低下しており、そのため腫瘍へのウイルス感染力が低下している。そこで、CAR 非依存性の感染を示すアデノウイルス 35 型のファイバー構造を、5 型のものと同置換したウイルスを作成する。35 型ウイルスの細胞受容体は、CD46 分子であることが明らかにされており、しかも CD46 分子の腫瘍における発現は、むしろ亢進している。すなわち、受容体との結合領域の遺伝子を従来のタイプ5型から35型へと組換えることによって、細胞表面の結合分子を CAR 分子より CD46 分子へと変換させ、腫瘍への感染効率の向上を図ることができるはずである。また抗がん剤との併用効果を、細胞死という観点から検討し、固形腫瘍への新規治療法開発に向けて、遺伝子治療と化学療法剤との併用の有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 制限増殖型でファイバー変換型アデノウイルスの作成:

食道癌をはじめとする消化器癌において、高い転写活性の有するミッドカイン、サバイビン、COX-2 遺伝子の転写調節領域(転写開始点より、5'上流側のそれぞれ604、521および387bpのゲノムDNA)を pShuttle2-PL/E1A-E1B ベクターを、用いて E1 領域遺伝子の上位に組み込んだ。さらに上記の DNA を制限酵素 P1-Sce I および I-Ceu I で切断後、外来性の転写調節領域 + E1 領域を有する DNA 断片を単離し、タイプ5型(pAdex)あるいはファイバー構造領域のみを5型から35型に置換したシャトルベクター(Adeno5/35F)と結合させた。これにより、E3領域一部を除いて、ウイルス産生に必要な全てのアデノウイルスの構造遺伝子を、単一のプラスミドDNAにクローニングできた。このDNAをパッケージング細胞HEK293細胞に導入し、細胞融解を繰り返し、当該アデノウイルスを精製した。

(2) ウイルスの感染効率の検討:

Green Fluorescence Protein (GFP)を発現させるタイプ5型ウイルス(Ad5-GFP)、タイプ35型のファイバー置換型ウイルスを用いて(AdF35-GFP)を一定のウイルス量で各種細胞に30分間感染させ、48時間後のGFP蛍光量をセル・ソータで検出して、感染効率を算出した。

(3) 制限増殖型アデノウイルスの抗腫瘍効果:

タイプ5型(Ad5)あるいはファイバー構造領域置換型(AdF)で、外来性の転写調節領域を含むアデノウイルスを、一定のウイルス量

でヒト食道癌細胞に感染させ、その後の細胞生存率に関して WST 法を用いて検討した。また、この時、感染細胞をプロピディムアイオダイドで染色し、その細胞周期についてセル・ソータ で検討した。また当該細胞について、アポトーシス関連蛋白、オートファジー関連蛋白等の発現をウエスタンブロット法等によって併せて検討し、ウイルス増殖と細胞周期の関連性を解析し、どのような機構・経路によって細胞死が誘導されるのかを検討した。

(4) 制限増殖型ウイルスと化学療法剤との併用効果：

ヒト食道癌細胞を用いて、代表的な抗がん剤である 5-FU あるいは CDDP 単独投与群と制限増殖型ウイルス単独投与群、および両者の併用群における *in vitro* 細胞傷害活性を WST 法によって検討した。また、ヌードマウスに食道癌細胞を接種し、腫瘍を形成させた後、ウイルスと抗がん剤を投与し、その併用効果を検討した。

4. 研究成果

(1) ファイバー変換型アデノウイルスの感染効率の向上：

GFP の遺伝子を組み込んだタイプ 5 型の Ad5-GFP、タイプ 35 型のファイバーを有するウイルス AdF35-GFP を用いて、ヒト食道癌株におけるアデノウイルスの感染効率を検討したところ、検討した 9 種類の細胞のすべてにおいて、35 型ウイルスの方が感染効率は良かった。特に、CAR 分子の発現レベルが殆んど検出できない YES-2 細胞ではタイプ 5 型ウイルスの感染は極めて困難であったが、ファイバー領域置換型では、その効率は他の細胞と変わらなかった。しかし、ファイバー領域置換型の感染効率そのものは、CD46 分子の発現と一定の相関性を示してはいなかった。これは、CD46 分子以外にもタイプ 35 型のウイルス受容体がある可能性を示している。またタイプ 5 型ウイルスでも、インテグリン分子が CAR 分子以外の受容体であることが知られおり、ファイバー領域置換型ウイルスもこのインテグリン分子の発現等が、感染効率に影響を与えていることが考えられる。

(2) 制限増殖型アデノウイルスの抗腫瘍効果：

9 種類の食道癌細胞株を用いて、タイプ 5 型あるいはファイバー領域置換型の制限増殖型ウイルスを用いて、細胞傷害活性を検討した。その結果、CAR 分子発現の低い細胞においては、ファイバー領域置換型ウイルスの方が、タイプ 5 型のものに比べて殺細胞効果は優れていた。しかし、CAR 分子発現が一定レベル以上のものは、双方のウイルスによる細胞傷害活性には差がなかった。以上の結果は、転写調節領域がミッドカイン、サバイピン、COX-2 のいずれであっても同じであったことから、CAR 分子の低発現株においてのみ、ファイバーの置換効果が検出でき、CAR 高発現

細胞では、通常タイプ 5 型のウイルスで支障ないことが判明した。さらに、このウイルス感染細胞の細胞周期を検討すると、まず G2/M 期が上昇し、G2/M 期よりもプロピディムアイオダイド染色が強い hyperploidy 分画の中に subG1 分画が上昇していた。この細胞傷害活性の経路を検討すると、カスプース 8 および 9 分子の分解が生じ、かつ TNF 分子の受容体発現が上昇しており、外因性さらに内因性アポトーシスが、細胞傷害活性に関与することが判明した。しかしオートファジー経路の活性化に関する Atg5、Beclin-1 分子の発現には差がなく、オートファジーは細胞死に関与しないと考えられた。

(3) 制限増殖型ウイルスと化学療法剤との併用効果：

ウイルス増殖に伴う細胞死の誘導は、アポトーシス経路によるものであったが、通常に化学療法剤との併用効果があるかどうかを WST 法によって検討した。この時、併用効果を判定するために、抗がん剤単独による IC50 値がアデノウイルスの併用によって、どのように減少するかを指標にした。その結果、用いた抗がん剤 5-FU, CDDP, MMC, VP-16 のいずれであっても、制限増殖型ウイルスとの併用によって、ごく少数の例を除いて、いずれのケースであっても、IC50 値は減少した。すなわち、このことは、通常抗がん剤とウイルス増殖に伴う細胞死は、並立し双方の併用は臨床的にも有用であるという可能性が示されてことを意味している。また、ヌードマウスのヒト食道癌細胞 TE-11 の腫瘍を形成させたのち、5-FU を腹腔内に、制限増殖型ウイルスを腫瘍局所に投与したところ、両者の併用は、それぞれ単独投与群に比較して、腫瘍が増殖が優位に低下していた。すなわち、*in vivo* 動物実験モデルにおいても、制限増殖型ウイルスと化学療法剤は併用効果を誘導した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

Gotoh A, Nagaya H, Kanno T, Tagawa M, Nishizaki T.: Fiber-substituted conditionally replicating adenovirus Ad5F35 induces oncolysis of human bladder cancer cells in *in vitro* analysis. 査読有 Urology. 81:920.e7-920.e11, 2013. DOI: 10.1016/j.urology.2012.12.023

Tagawa M., Tada, Y., Shimada H. and Hiroshima, K.: Gene therapy for malignant mesothelioma: Current prospects and challenges. 査読有 Cancer Gene Ther. 20; 150-156, 2013. DOI:10.1038/cgt.2013.1

Takagi-Kimura, M., Yamano, T., Tamamoto, A., Okamura, N., Okamura, H., Hashimoto-Tamaoki, T., Tagawa M., Kasahara, N. and Kubo, S.: Enhanced antitumor efficacy of fiber-modified, midkine promoter-regulated oncolytic

adenovirus in human malignant mesothelioma. 査読有 Cancer Sci. 104: 1433-1439, 2013, DOI: 10.1111/cas.12267

Ma, G., Kawamura, K., Yang, S., Okamoto, S., Li, Q., Namba, M., Shingyoji, M., Tada, Y., Tatsumi, K., Hiroshima, K., Shimada, H. and Tagawa, M.: Combination of adenoviruses expressing melanoma differentiation-associated gene-7 and chemotherapeutic agents produces enhanced cytotoxicity on esophageal carcinoma. 査読有 Cancer Gene Ther. 21: 31-37, 2014. DOI:10.1038/cgt.2013.79

Hamada, K., Yoshihara, C., Ito, T., Tani, K., Tagawa, M., Sakuragawa, N., Itoh, H. and Koyama, Y.: Antitumor effect of chromatin sulfate-coated ternary macrophage-colony-stimulating factor plasmid complex for ovarian cancer. 査読有 J. Gene Med. 14:120-127, 2012. DOI: 10.1002/jgm.1647.

Nagakawa, H., Shimozato, O., Yu, L., Wada, A., Kawamura, K., Li, Q., Chada, S., Tada, Y., Takiguchi, Y., Tatsumi, K and Tagawa, M.: Expression of a murine homologue of apoptosis-inducing human IL-24/MDA-7 in murine tumors fails to induce apoptosis or produce anti-tumor effects. 査読有 Cell. Immunol. 275; 90-97, 2012. DOI: 10.1016/j.cellimm.2012.02.010

Shimada, H., Yajima, S., Oshima, Y., Hiwasa, T., Tagawa, M., Matsushita, K. and Nomura, F.: Impact of serum biomarkers on esophageal squamous cell carcinoma. 査読有 Esophagus. 9: 131-140, 2012. DOI 10.1007/s10388-012-0332-x

Nagaya, H., Tagawa, M., Hiwasa, K., Terao, S., Kanno, T., Nishizaki, T. and Gotoh, A.: Fiber-substituted conditionally replicating adenovirus for oncolysis of human renal carcinoma cells. 査読有 Anticancer Res. 32: 2985-2990, 2012. <http://ar.iiarjournals.org/content/32/7/2985.abstract>

Tagawa, M., Kawamura, K., Li, Q., Tada, Y., Hiroshima, K. and Shimada, H.: A possible anti-cancer agent, type III interferon, activates cell death pathways and produces anti-tumor effects. 査読有 Clin. Dev. Immunol. 2011: 1-6, 2011. Article ID 479013, 2011. DOI:10.1155/2011/479013

Fujie, H., Tanaka, T., Tagawa, M., Kaijun, N., Watanabe, M., Suzuki, T., Nakayama, K. and Numasaki, M.: Antitumor activity of type III interferon alone or in combination with type I interferon against human non-small-cell lung cancer. 査読有 Cancer Sci. 102: 1977-1990, 2011. DOI:

10.1111/j.1349-7006.2011.02079

Li, Q., Kawamura, K., Okamoto, S., Fujie, H., Numasaki, M., Namba, M., Nagata, M., Shimada, H., Kobayashi, H. and Tagawa, M.: Adenoviruses-mediated transduction of human esophageal carcinoma cells with the interferon- λ genes produced anti-tumor effects. 査読有 Br. J. Cancer. 105: 1302-1312, 2011. DOI:10.1038/bjc.2011.379

Li, Q., Kawamura, K., Okamoto, S., Yamanaka, M., Yang, S., Yamauchi, S., Fukamachi, T., Kobayashi, H., Tada, Y., Takiguchi, Y., Tatsumi, K., Shimada, H., Hiroshima, K. and Tagawa, M.: Upregulated p53 expression activates apoptotic pathways in wild-type p53-bearing mesothelioma and enhances cytotoxicity of cisplatin and pemetrexed. 査読有 Cancer Gene Ther. 19: 218-228, 2012 DOI:10.1038/cgt.2011.86.

〔学会発表〕(計12件)

Yuki Yamamoto その他: A Cancer-targeting ligand strongly enhances oncolytic activity of a conditionally replicative adenovirus. 16th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, May 18, 2013, Salt Lake City, USA

Shuji Kubo その他: Development of doubly regulated oncolytic adenovirus for human malignant mesothelioma. 16th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, May 18, 2013, Salt Lake City, USA

Masatoshi Tagawa その他: Updated gene therapy for malignant mesothelioma: Challenges for the intractable cancer. 19th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, July 6, 2013, Okayama

Shuji Kubo その他: Midkine promoter-driven oncolytic adenovirus with Ad35 fiber modification achieves enhanced transduction of human osteosarcoma cells. 19th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, July 6, 2013, Okayama

柴寛 その他: An HSP90 inhibitor, which blocks p53 degradation, suppresses adenoviruses-mediated p53 production and the apoptosis. 第72回日本癌学会学術総会 平成25年10月5日、横浜市

楊珊 その他: Cytotoxicity of replication-competent adenoviruses in esophageal carcinoma was enhanced by forced p53 expression. 第71回日本癌学会学術総会 平成24年9月20日、札幌市

久保秀司 その他: Development of doubly regulated oncolytic adenovirus for human malignant mesothelioma. 第71回日本癌学会学術総会 平成24年9月20日、札幌市

島田英昭 その他: Analysis of serum

anti-galectin-1 antibody in stage I/II gastroenterological carcinomas. 第71回日本癌学会学術総会 平成24年9月20日、札幌市

田川雅敏 その他 : Bisphosphonates induce apoptosis through the suppression of Rab and produce combinatory effects with anti-cancer agents. 第71回日本癌学会学術総会 平成24年9月20日、札幌市

Masatoshi Tagawa その他: Gene therapy for malignant mesothelioma with restored p53 functions. International Society for Cell and Gene Therapy of Cancer 2012 Singapore Conference, October 5, 2012, Singapore

Masatoshi Tagawa その他 : Promoter-mediated replication of adenoviruses induces apoptosis-independent cell death in p53-null pancreatic carcinoma cells. 14th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, May 21, 2011, Seattle, USA

Masatoshi Tagawa その他 : Up-regulated p53 expression activates apoptotic pathways in wild-type p53-bearing mesothelioma and enhances cytotoxicity of the first-line chemotherapeutic agents. 19th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, October 27-31, 2011, Brighton, UK

〔図書〕(計1件)

Tagawa, M., Tada, Y., Hiroshima, K. and Shimada, H.: Type III interferon family-mediated anti-tumor responses through multiple mechanisms. In: Cellular and genetic practices for translational medicine. ed. by Jong-Young Kwak and Jin-Yeong Han. Research Signpost, Kerala, India. p247-260, 2011.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)
なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyujo/institute/organization/cell-therapy/index.html>

<http://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyujo/institute/projects/007.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田川 雅敏 (TAGAWA, masatoshi)

千葉県がんセンター・研究所・がん治療開発

グループ・部長

研究者番号 : 20171572

(2) 研究分担者

島田 英昭 (SHIMADA, hideaki)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号 : 20292691

(3) 連携研究者

なし