

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23701062

研究課題名(和文) 癌幹細胞を標的治療するCD133反応性増殖型アデノウイルスの開発

研究課題名(英文) CD133-responsive conditionally replicating adenovirus targeting cancer stem cells

研究代表者

王宇清(Wang, Yuqing)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・特任研究員

研究者番号：20505143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、治療抵抗性の原因となる癌幹細胞を標的として、同定・診断・治療可能な増殖制御型アデノウイルスベクターの構築および検証をした。細胞表面発現する糖タンパク質CD133は、近年、脳腫瘍、大腸癌など幾つかの癌の癌幹細胞マーカーとして知られて、今回、多因子制御する増殖型アデノウイルスベクター作製技術を用いて、新たな「癌幹細胞を標的治療する増殖型アデノウイルスm-CRA」(CD133反応性m-CRA)を開発した。CD133.m-CRAはヒト神経癌幹細胞を標的に殺傷し、腫瘍マウスモデルにおける腫瘍抑制効果も得られた。難治性癌の標的治療と再発予防を現実に進めるものであると期待している。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells has been note as an important therapeutic target in cancer, and gene therapy such as by virotherapy focused on cancer stem cell maybe provides a novel therapeutic approach to anticancer. CD133 is known as a cancer stem marker expressed in nervous system tumors, colon cancer and prostate cancer, etc. A novel conditionally replicating adenovirus vector CD133pr.m-CRA was constructed and showed cancer stem cell-specific therapy effect in vitro and in vivo tumor model without toxicity to normal cells. Our date indicate that CD133.m-CRAs is a useful strategy for treating cancer stem cells.

研究分野：総合生物

キーワード：腫瘍生物学 癌幹細胞 遺伝子治療 アデノウイルス

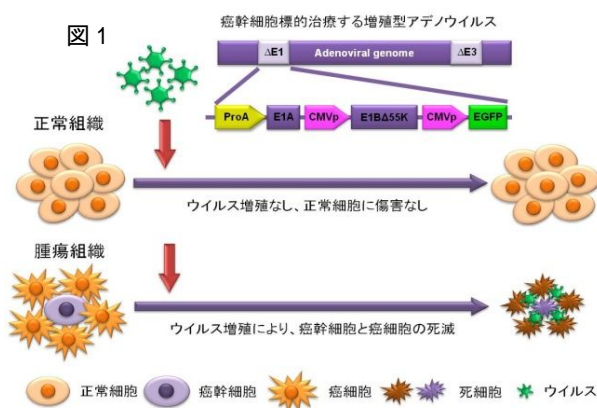
1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞とは転移や腫瘍形成能が高く、また様々な抗がん剤や放射線療法に抵抗性を示すため癌再発の原因であり、癌が難治性について、今後は癌幹細胞を標的とした治療法の開発が必須である。しかし、癌幹細胞を同定、標的治療する技術は未だ開発されていない。遺伝子治療、あるいは増殖型ウイルスを使った癌幹細胞の治療という研究も未だ報告されていない。

現在、固形癌において、癌幹細胞を濃縮する最有力の細胞マーカーとして、細胞膜糖タンパク CD133 が報告されているが、その生物学的意義や確実性、汎用性(一般化)などは、確定していない。

2. 研究の目的

上述の現状を踏まえ、よって、本研究の目的は、治療抵抗性の原因となる癌幹細胞を標的として、同定・診断・治療可能な増殖制御型アデノウイルスベクターを構築、検証するものであって、本研究室独自に開発した m-CRA の作製法を基盤として、癌幹細胞標的治療する増殖型アデノウイルス (CD133 反応性 m-CRA) を開発し、癌幹細胞分離技術と融合し、新たな革新的、安全な癌遺伝子治療法の確立を目指す(図1)。



本課題は以下の3点について明らかにする予定。癌幹細胞の表面マーカーと報告された CD133 が真の癌幹細胞マーカーであることの確認。癌幹細胞の細胞学

的・遺伝子学的特徴の解明。癌幹細胞に標的治療する増殖制御型アデノウイルスベクター (CD133 反応性 m-CRA) の構築と検証。

3. 研究の方法

- 1) 今まで報告されている CD133 を転写制御する5種類のプロモーターのクローニングし、CD133の5種類のプロモーターを非増殖型アデノウイルスベクターに組み込んで、Ad.CD133pr-LacZを構築した。それを用いて、X高発現する消化器癌細胞株と臨床グリオブラストーマから浮遊細胞塊形成法で濃縮してきた神経癌幹細胞 [Soeda et al (2008)] における CD133 プロモーターの制御活性を解析する。
- 2) CD133 遺伝子発現癌幹細胞をターゲットティングする増殖型アデノウイルスベクター (CD133 反応性 m-CRA) を構築し、各種の CD133 発現する消化器癌細胞株と臨床グリオブラストーマから浮遊細胞塊形成法で濃縮してきた神経癌幹細胞に CD133.m-CRA を感染させ、生細胞測定法 WST assay を用いて、*in vitro* の殺傷効果を評価する。
- 3) ヒト肺由来正常線維芽細胞と皮膚由来正常線維芽細胞における CD133.m-CRA の毒性影響を上記2)と同様生細胞測定法 WST assay を用いて確認する。
- 4) NOD-SCID 免疫不全マウスを用いて、*ex vivo* と *in vivo* の動物実験で、CD133.m-CRA の癌幹細胞標的治療効果は腫瘍形成能と腫瘍抑制効果で評価する。

4. 研究成果

- 1) 臨床グリオブラストーマから浮遊細胞塊形成法で濃縮してきた神経癌幹細胞の未分化細胞は分化細胞より内因性の

CD133 の発現が高い。また、未分化細胞の CD133 陽性分画も陰性分画より CD133 の発現が高い。神経癌幹細胞の未分化マーカー Nanog と Oct4 の発現も確認された。In vivo で NOD-SCID 免疫不全マウスに未分化の神経癌幹細胞を皮下移植後、腫瘍の形成が確認され、腫瘍のサイズが移植した細胞数に依存する。一方、分化した神経幹細胞の腫瘍形成は認めなかった。

- 2) CD133 高発現する消化器癌細胞株と臨床グリオブラストーマから浮遊細胞塊形成法で濃縮してきた神経癌幹細胞における CD133 プロモーターの制御活性解析に、癌細胞より癌幹細胞には CD133 のプロモーター活性が顕著に高いと示され、その中にあるプロモーター領域の活性は最も高かった。
- 3) CD133 発現癌細胞株と癌幹細胞に CD133.m-CRA は有意な癌細胞と癌幹細胞の殺傷効果が示された。
- 4) 一方、正常細胞 2 種に CD133.m-CRA の毒性は見られず、in vitro の安全性も示された。
- 5) CD133.m-CRA に感染した神経幹細胞を ex vivo の実験で NOD-SCID 免疫不全マウスに皮下移植し、コントロール群に比べると、腫瘍の形成は有意に抑制された。

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 4 件)

- 1) Tanoue K, Wang Y, Ikeda M, Mitsui K, Irie R, Setoguchi T, Komiya S, Natsugoe S, Kosai K.: Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus kills rhabdomyosarcoma stem cells more efficiently than their progeny. J Trans Med. 2014 Jan 27;12:27. (査読あり)

- 2) Hino S, Sakamoto A, Nagaoka K, Anan K, Wang Y, Mimasu S, Umehara T, et al. FAD-dependent lysine-specific demethylase-1 regulates cellular energy expenditure. Nat Commun 2012;3:758. (査読あり)
- 3) Horikawa Y, Wang Y, Nagano S, Kamizono J, Ikeda M, Komiya S, Kosai KI. Assessment of an altered E1B promoter on the specificity and potency of triple-regulated conditionally replicating adenoviruses: implications for the generation of ideal m-CRAs. Cancer Gene Ther 2011;18:724-733. (査読あり)
- 4) Kamisasanuki T, Tokushige S, Terasaki H, Khai NC, Wang Y, Sakamoto T, Kosai K. Targeting CD9 produces stimulus-independent antiangiogenic effects predominantly in activated endothelial cells during angiogenesis: a novel antiangiogenic therapy. Biochem Biophys Res Commun 2011;413:128-135. (査読あり)

[学会発表](計 11 件)

- 1) 宮崎 優美、王 宇清、三井 薫、丁 強、政 幸一郎、松原 修一郎、小賤 健一郎、高尾 尊身。Immunohistochemical comparative analysis of the sphere cells of CD133-positive pancreatic cancer cells with iPS cells. CD133+膵がん Sphere 形成細胞と iPS 細胞の免疫組織学的比較解析。第 72 回日本癌学会学術総会 (2013.10)
- 2) 王 宇清、田上 聖徳、池田 美奈子、

- 小賤 健一郎等。
Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus efficiently kills rhabdomyosarcoma-initiating cells: a promising m-CRA strategy for treating cancer stem cells. 独自開発のサバイピン依存性増殖型アデノウイルスベクターは横紋筋肉腫幹細胞に対して有効な治療薬として期待できる。平成25年度 がん若手研究者ワークショップ (2013.9)
- 3) 田上 聖徳、王 宇清、瀬戸口 啓夫、小賤 健一郎等。独自開発のサバイピン依存性増殖型アデノウイルスベクターは横紋筋肉腫幹細胞に対して有効な治療薬として期待できる。第71回日本癌学会学術総会 (2012.9)
- 4) 小賤 健一郎、三井 薫、王 宇清、高橋 知之。ヒトES/iPS細胞での再生医療の課題を克服する独自のアデノウイルスベクターと発現技術の開発。第11回日本再生医療学会総会 (2012.6)
- 5) 田上 聖徳、王 宇清、池田 美奈子、小賤 健一郎等。独自開発の増殖型アデノウイルスベクターで癌幹細胞は効果的に治療できる。第11回日本再生医療学会総会 (2012.6)
- 6) Kiyonori Tanoue, Yuqing Wang, Minako Ikeda, Ken-ichiro Kosai, *et al.* Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus efficiently kills rhabdomyosarcoma-initiating cells: a promising m-CRA strategy for treating cancer stem cells. (第18回日本遺伝子治療学会アンジェス賞受賞) 第18回日本遺伝子治療学会 (2012.6)
- 7) Kiyonori Tanoue, Yuqing Wang, Minako Ikeda, Ken-ichiro Kosai, *et al.* Efficient treatment of Rhabdomyosarcoma-initiating cells by surviving-responsive conditionally replicating adenovirus: Promising m-CRA strategy for treating cancer stem cells. American Society of Gene & Cell Therapy (ASGCT) 15th Annual Meeting (2012.5)
- 8) 王 宇清、堀川 良治、永野 聡、小賤 健一郎等。Assessment of an altered E1B promoter on the specificity and potency of triple-regulated conditionally replicating adenoviruses (CRA) - Implications for the generation of ideal m-CRAs. 平成23年度 がん若手研究者ワークショップ (2011.8)
- 9) Ken-ichiro Kosai, Yoshiharu Horikawa, Yuqing Wang, *et al.* Assessment of an altered E1B promoter on the specificity and potency of triple-regulated conditionally replicating adenoviruses (CRA). 17th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (2011.7)
- 10) Kouichi Sakamoto, Nign Cin Khai, Yuqing Wang, Rie Maezono, Kiyonori Tanoue, Hitoshi Matsufuji, Hideo Takamatsu, Ken-ichiro Kosai. HB-EGF/HGF Hepatic Gene Therapy For Bile Duct Ligated Cholestatic Liver Injury in Mice: Their Different and/or Synergic Therapeutic Effects. 第17回日本遺伝子治療学会学術集会 (2011.7)
- 11) (Ken-ichiro Kosai, Kouichi Sakamoto, Nign Cin Khai, Yuqing Wang, *et al.* HB-EGF/HGF Hepatic Gene Therapy Effectively Inhibits Bile Duct Ligated Cholestatic Liver Injury in Mice in Their Different Therapeutic Modes.

American Society of Gene & Cell
Therapy (ASGCT) 14th Annual Meeting
(2011.5)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

- 1) 名称：癌幹細胞を標的とするウイルス
ベクター (VIRAL VECTOR
TARGETING CANCER STEM
CELLS)

発明者：小賤 健一郎、王 宇清

権利者：鹿児島大学

種類：

番号：PCT/JP2012/002031

出願年月日：

国内外の別：

国内：2011年3月25日

米国：2013年12月24日

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 王 宇清 (Yuqing Wang)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 特任
研究員

研究者番号：20505143