

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890130

研究課題名(和文)陽イオンリポソームを用いた全身投与可能な腫瘍選択的増殖型アデノウイルス製剤の開発

研究課題名(英文)Development of systemically-deliverable oncolytic adenovirus

研究代表者

黒田 新士(Kuroda, Shinji)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：60633758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：我々が以前開発した腫瘍選択的増殖型アデノウイルス製剤(Telomelysin)の投与は現時点では局所投与に限定されるが、その全身投与の可能性を検討するために、GFP蛋白を発現するTelomelysin(TelomeScan)のプラスミドDNAを、リポソームに包埋した複合体(Lipo-TelomeScan-pDNA)の治療効果をin vitroにおいて検討したところ、種々のヒト固形腫瘍に対して抗腫瘍効果を認めた。中でもHCT-116(ヒト大腸癌細胞株)に対してはコントロールプラスミドDNAと比較し容量依存的に有意に高い抗腫瘍効果を認め、現在マウス背部皮下腫瘍に対して治療効果確認中である。

研究成果の概要(英文)：We previously established telomerase-specific oncolytic adenovirus (Telomelysin). Since the application of Telomelysin is basically restricted to local injection because of nonspecific capture in the liver and inactivation by immune system, we investigated the possibility of systemic delivery of Telomelysin by combining with one of the common nanomaterials, liposomes. TelomeScan, modified Telomelysin expressing green fluorescent protein (GFP), was alternatively used in this study. TelomeScan plasmid DNAs encapsulated by liposomes (Lipo-TelomeScan-pDNA) showed potent cytotoxic effects in vitro study against various types of cancer cells by yielding vigorous virus progenies. Especially, Lipo-TelomeScan-pDNA produced significantly strong cytotoxic activity against HCT-116, a human colon cancer cell line, compared to control plasmid DNA encapsulated by liposomes. In vivo examination is ongoing to evaluate the availability of Lipo-TelomeScan-pDNA for systemic delivery.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：腫瘍選択的増殖型アデノウイルス ウイルス療法 陽イオンリポソーム ナノテクノロジー 全身投与

1. 研究開始当初の背景

腫瘍内でのみ選択的に増殖するアデノウイルスを用いたがんウイルス療法は、既存の放射線や抗癌剤とは異なるメカニズムで細胞死を誘導する新規治療法のひとつである。しかしながら、中和抗体の存在や肝臓への取り込みのために全身投与による治療効果は乏しく、その使用が腫瘍内投与に限られているのが現状である。一方、ドラッグデリバリー分野ではナノサイズ(数十~数百 nm)のキャリアの有効性が示されており、様々なナノデバイスを用いたドラッグキャリアが開発されている。

我々は、腫瘍内で特異的に活性の高いヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) のプロモーターにより増殖を制御される腫瘍選択的増殖型アデノウイルス製剤 (Telomelysin、テロメライシン) を開発し (Kawashima T et al. Clin Cancer Res. 2004)、近年米国にて各種固形腫瘍に対する第 Ⅲ 相臨床試験を終え、その人体における安全性・体内動態を確認した。現在岡山大学において頭頸部・胸部悪性腫瘍に対する放射線との併用による臨床研究を申請中であるが、これは申請者が行ったテロメライシンと放射線との併用効果の研究 (Kuroda S et al. Cancer Res. 2010) (Kuroda S et al. Acta Med Okayama. 2012) に基づいて立案されたものである。

申請者は近年、陽イオンリポソームのひとつである DOTAP コレステロールを用いた遺伝子治療の研究や、他のナノデバイスを用いた癌治療の研究に携わって来ており (Kuroda S et al. Pan Stanford Publishing Pte Ltd. 2011) (Yokoyama T et al. PLoS One. 2011)、このたびこれらの経験と知識を生かしてテロメライシンをナノデバイスを用いることで全身投与可能や製剤へと発展させることが可能ではないかという発想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、核酸 (DNA や RNA など) のデリバリーに適した陽イオンリポソームを用いてアデノウイルス DNA のナノキャリアを作成し、がんに対する全身投与での治療効果を検討する。

3. 研究の方法

本研究では蛍光顕微鏡にて視覚的にウイルスの増殖を確認することができる、GFP 蛋白を発現する Telomelysin である TelomeScan を使用した。

(1) TelomeScan-pDNA の作成と複製

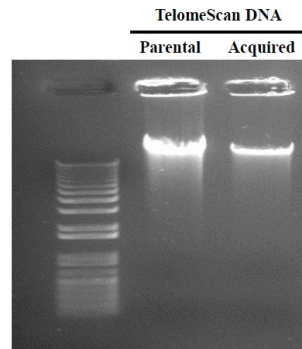
(2) H1299 (ヒト肺癌細胞株) に対する TelomeScan-pDNA とリポソームの複合体 (Lipo-TelomeScan-pDNA) の感染性と凍結融解法による活性を有するウイルス産生の確認

(3) in vitro における種々のヒト消化器固形腫瘍に対する Lipo-TelomeScan-pDNA の治療効果の検討

(4) in vivo における HCT-116 マウス背部皮下腫瘍に対する Lipo-TelomeScan-pDNA の治療効果の検討

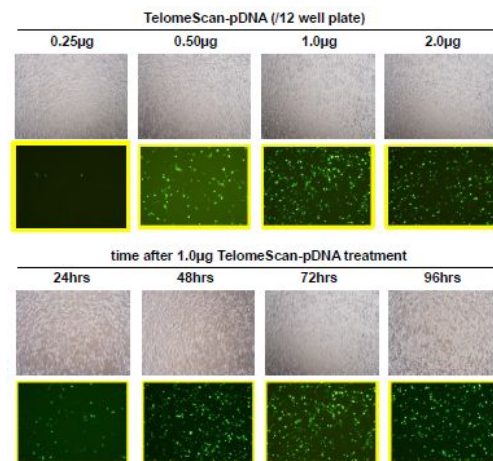
4. 研究成果

(1) 大腸菌を用いて TelomeScan-pDNA の複製を行い、電気泳動にてその質の評価を行った。 < 図 1 >



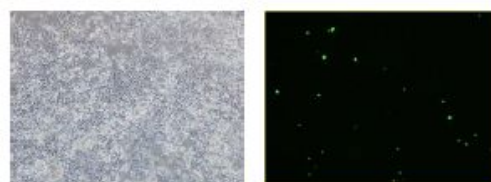
< 図 1 > TelomeScan-pDNA の複製

(2) H1299 (ヒト肺癌細胞株) に対する Lipo-TelomeScan-pDNA の感染性は容量依存的に増大し、感染後 72 時間で最大となった。 < 図 2 >



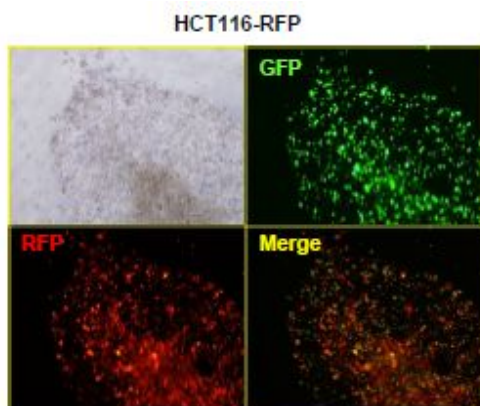
< 図 2 > H1299 に対する Lipo-TelomeScan-pDNA の感染性

また、凍結融解法 (Freeze-thaw procedure) にて、Lipo-TelomeScan-pDNA 感染細胞内で生物学的活性を有する TelomeScan (アデノウイルス) が産生されていることを確認した。 < 図 3 >

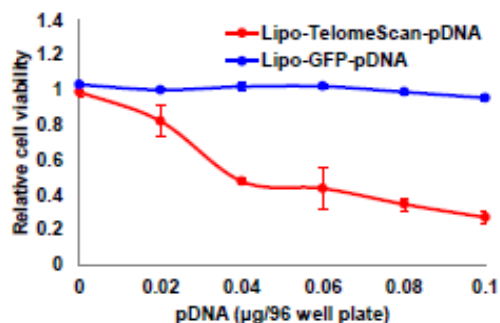


< 図 3 > 凍結融解法による活性ウイルス産生の確認

(3) 種々のヒト消化器固形腫瘍に対する Lipo-TelomeScan-pDNA の感染性、細胞障害活性を幅広く検討し、最も効果の期待できる HCT-116 (ヒト大腸癌細胞株) に対する細胞障害活性を GFP 発現コントロールプラスミドとリポソームの複合体 (Lipo-GFP-pDNA) と比較検討したところ、Lipo-TelomeScan-pDNA が容量依存性に有意に細胞増殖を抑制した。<図 4> <図 5>



< 図 4 > Lipo-TelomeScan-pDNA の HCT116 細胞株に対する感染性



< 図 5 > Lipo-TelomeScan-pDNA の HCT-116 細胞株に対する細胞障害活性

(4) BALB/c ノードマウスに HCT-116 細胞の背部皮下腫瘍を作成し、Lipo-TelomeScan-pDNA の腫瘍内投与による治療効果を Lipo-GFP-pDNA と比較検討中である。

今後、通常免疫を有する BALB/c マウスを用いて、Lipo-TelomeScan-pDNA 全身投与後のアデノウイルス中和抗体価を、アデノウイルスである TelomeScan 全身投与後の中和抗体価と比較する予定である。

in vivo における追加の検討が必要な状況ではあるが、本研究において、腫瘍選択的増殖型アデノウイルスのプラスミド DNA をナノキャリアを用いて投与することで、ウイルス自体と同様の治療効果を期待できることを確認できたことは、我々の開発したテロメライシンの適応拡大につながるだけでなく、ウイルス療法全体の癌治療に対する適応拡大

に寄与する可能性を秘めている。

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 0 件)
現在鋭意作成中

[学会発表](計 1 件)

Development of systemically-deliverable telomerase-specific oncolytic adenovirus
Katsuyuki Aoyama, Shinji Kuroda, Hiroshi Tazawa, Shunsuke Kagawa, Toshiyoshi Fujiwara
American Association for Cancer Research
2014 年 04 月 05 日 ~ 2014 年 04 月 09 日
San Diego, California, USA

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
岡山大学医歯薬学総合研究科消化器外科学
ホームページ
<http://www.ges-okayama-u.com/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 新士 (KURODA, Shinji)
岡山大学医学部・客員研究員
研究者番号: 60633758

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：