

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430153

研究課題名(和文) 独自ベクター技術による癌幹細胞標的・同定と革新的治療の技術開発

研究課題名(英文) Development of the novel vector system targeting and identifying cancer stem cells for innovative cancer therapy

研究代表者

伊地知 暢広 (Ijichi, Nobhiro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：80380624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、以前独自開発した特定細胞系譜を同定単離可能な「ACT-SC法」を応用し、がんの難治性や再発と密接に関係する特異的プロモーターを指標とした、がん幹細胞の標的・同定と革新的な癌治療技術の開発を目的とした。まず、種々の遺伝子プロモーター制御下にCre酵素を発現する発現調節アデノウイルスと、Cre酵素依存的にEGFPを発現するレポーターアデノウイルスを構築した。次に、これらウイルスベクターを共感染したグリオblastoma由来細胞株の癌幹細胞分画をモデルとし、FACS解析及びSphere形成実験等を組み合わせることで癌幹細胞様性質と密接に関わるプロモーターを検討可能なスクリーニング系を確立した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed the novel adenoviral vector systems enabling to identify and target the cancer stem cells (CSCs), based on the adenoviral conditional targeting in stem cell (ACT-SC) method that we previously developed. We constructed the adenoviral vectors carrying two DNA constructs: the regulatory unit expressing the Cre recombinase under the transcriptional control of a various cell-specific promoter and a switching-expression unit that under normal conditions expresses an upstream neo gene but not a reporter gene. Using glioblastoma-derived cancer stem cell population as a model, we then established the screening system of the promoters possibly responsible for cancer stemness by FACS and sphere formation analyses without harmful effects.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腫瘍溶解性ウイルス がん遺伝子治療 癌幹細胞 アデノウイルス

1. 研究開始当初の背景

1) 癌治療の現状と癌幹細胞理論

癌は先進諸国における三大死因の一つであり、特に日本では最も高い死亡率となっている。現在の癌治療は主に手術療法であり、これに化学療法やホルモン療法、放射線療法などの補助療法を組み合わせで行われている。しかしながら、全ての癌細胞を死滅させることはできず、術後の再発、転移、悪性化などが深刻な問題となっている。この原因を説明する一つの仮説として近年、癌幹細胞という概念が提唱され、実証されつつある。癌幹細胞は抗癌剤排出能力、中和能力、DNA修復能力などを有すること、正常組織幹細胞と同様に微小環境(ニッチ)内で休眠状態として存在することなどから、増殖する細胞を標的とする従来のがん治療法では効果が期待できないとされている。しかしながら、癌幹細胞についての分子生物学的背景あるいは生理的な性質についてはよくわかっていない。その理由として、現在の癌幹細胞単離法は、主に癌幹細胞の性質における分子生物学的なメカニズムがほとんど分かっていない癌細胞表面抗原マーカーを指標としたFACS sortingによる濃縮方法に限られていることによる。したがって、癌幹細胞性質と密接に関わる内因性の因子を指標とした癌幹細胞単離・同定法を開発することで、癌幹細胞の性質、発生機序の理解ひいては癌の根治治療法の開発に繋がると期待される。

2) m-CRA を用いた癌遺伝子治療

癌治療法の有力候補の一つとして、1990年代から遺伝子治療が開発・臨床応用されてきた。1990年代前半に開発された *in vivo* 遺伝子治療は主に非増殖型アデノウイルスベクターであり、その結果安全性の確認はなされたものの、治療効果が不十分で癌再発の可能性が懸念された。その理由として、物理的に全ての癌細胞に遺伝子導入することが不可能であることが考えられる。そこで癌特異的にウイルスを増殖させてウイルスタンパク質を発現させることにより癌細胞を殺傷する CRA (conditionally replicating adenovirus: 増殖型アデノウイルス) が主流となってきた。しかし、既存の CRA は「単一因子」での不十分な癌特異化、治療遺伝子の搭載不可(ウイルス療法) 標準的作製技術の未開発に伴う長期作製時間などの問題があった。それらを克服する新たな方法として、当研究室の小沢らは、「多因子のウイルス増殖制御による精密かつ高度な癌特異化」、「治療遺伝子の自由な搭載」(ウイルス療法と遺伝子治療の融合)、「ウイルスゲノムの性質も容易に変更可能」といった種々の特性・改良を加えた、高性能な次世代型ベクターシステム、m-CRA (CRA with multiple tumor-specific factors) を開発した。この作製法は、「ウイルス骨格をパーツ化し、自由に組み合わせることでウイルスを作製可能」な、初

めての効率的標準化技術で、多種多様な高度 m-CRA を迅速に作製できるものである。この技術により開発された癌特異的因子 Survivin 反応性の m-CRA (Surv.m-CRA) は強力な癌治療効果を示した (Cancer Res 2005)。

3) 癌幹細胞特異的プロモーターの探索

一方我々は以前、特定細胞系譜を同定・単離可能な「ACT-SC 法」を独自開発した (Mol Ther. 2006) 。これは、特定細胞系譜特異的プロモーター制御下に Cre 組換え酵素を発現するアデノウイルス(発現調節ベクター)と、Cre 酵素依存的に EGFP を発現するアデノウイルス(レポーターベクター)を構築・共感染させ、FACS 法などで EGFP 発現を指標に特定細胞系譜を同定・単離するというものである。本研究では、癌幹細胞を標的とした新たな m-CRA 開発のための新規プロモーターを探索するに当たり、本法を応用できると着想するに至った。

2. 研究の目的

このような背景から、癌幹細胞特異的 m-CRA の開発へ向け、独自開発した特定細胞系譜の同定・単離法を応用し、がんの難治性や再発と密接に関係する癌幹細胞特異的プロモーターを指標とした癌幹細胞の標的・同定技術の開発を目的とする。

3. 研究の方法

1) 癌幹細胞モデルとして、臨床サンプルより浮遊細胞塊形成法にて濃縮されたグリオプラストーマ細胞株を用いた (Soeda, et al., 2008) 。本細胞株は癌幹細胞細胞表面マーカーの 1 つ、CD133 が陽性であることが明らかとされている。さらに、癌幹細胞との機能的関連が注目されている CD133 の 5 種の alternative promoters を癌幹細胞特異的プロモーター候補とした。

2) 次に、癌幹細胞特異的プロモーターの同定を可能とする新たなベクターシステムを構築するため、上記 1) の各プロモーター制御下に Cre 酵素を発現するアデノウイルス(発現調節ベクター)と、Cre 酵素依存的に EGFP を発現するアデノウイルス(レポーターベクター)を作製した。

3) グリオプラストーマに上記 2) のウイルスを共感染後、FACS 解析により、CD133 表面抗原陽性/陰性分布及び EGFP 発現陽性/陰性分布を検討した。

4) 癌幹細胞特異的プロモーターの評価系として、感染細胞の Sphere 形成実験を行い、EGFP 陽性率との相関を検討した。

4. 研究成果

1) 癌幹細胞特異的プロモーター探索のため

のベクターシステム及び評価系の構築：

まず、癌幹細胞特異的プロモーターモデルとして、CD133 遺伝子の 5 種の alternative プロモーターそれぞれの制御下に Cre 組換え酵素を発現するアデノウイルス（発現調節ベクター）を構築した。加えて、2 つの loxP 配列に挟まれた EGFP 遺伝子が Cre 酵素依存的に発現するアデノウイルス（レポーターベクター）も構築した。

次に、グリオブラストーマ細胞株をモデルとし、アデノウイルスの感染効率及び細胞傷害効果を検討した。その結果、100%の感染率且つ細胞傷害効果が見られない至適感染 MOI を選定した。

さらに、アデノウイルスを共感染後、FACS による sorting を行った細胞において、Sphere 形成能を検討した。これにより、CD133 陽性/陰性細胞の Sphere 形成能の違いを指標にしながら、Sphere 形成能を損なわない、至適な感染・培養・assay 条件を確立した。

以上の検討から、癌幹細胞の幹細胞様性質を規定する内因性因子（特異的プロモーター）を簡便且つ網羅的に同定・評価可能なベクターシステム及びアッセイ系を構築した。

2) 癌幹細胞特異的プロモーターとしての検証：

上記 1) のベクターシステム・アッセイ系を用いて、特異的プロモーター候補とした CD133 の 5 種の alternative promoter の検証を行った。5 種のプロモーターいずれのウイルスにおいても、感染細胞における細胞傷害性は見られなかった。一方、そのうちの 2 種のプロモーターについては、EGFP 陽性分画の割合が高く、これは以前のプロモーターアッセイの結果と一致していた。さらに、Sphere 形成能を検討したところ、Sphere を形成した細胞集団における EGFP 陽性率がコントロールに比べ、先の 2 種のプロモーターにおいて高い傾向が得られたものの、有意差を得るには至らなかった。これらの結果から、2 種のプロモーターは癌細胞様性質と密接に関連する可能性はあるものの、確定的な判断を下すには至らず、in vivo の皮下移植実験等での評価がさらに必要であると示唆された。

以上のことから、特定細胞系譜を同定単離可能な独自開発の「ACT-SC 法」を応用し、癌幹細胞特異的プロモーターを同定・評価可能なベクターシステム及びアッセイ系を構築できた。本技術は、これまであまり同定されていなかった、癌幹細胞様と密接に関連する内因性因子（プロモーター）の網羅的な検討・評価を可能とするものであり、癌幹細胞の分子生物学的な理解や、我々の m-CRA 技術との融合による革新的な癌幹細胞標的医薬の開発につながる成果であると期待される。加えて、m-CRA 医薬の第一弾である Surv.m-CRA は、がんへの革新的医薬として、実用化を目指した医師主導型治験を実施中

であり、GMP 製造から GLP 非臨床試験、規制当局対応から治験承認までの経験・ノウハウを蓄積している。これらを生かし、癌幹細胞を標的とした新たな視点からの革新的医薬の実用化も迅速に行えると期待される。

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 12 件)

Kosai K. (全 7 名, 6 番目); Efficient elimination of pancreatic cancer stem cells by Hedgehog/GLI inhibitor GANT61 in combination with mTOR inhibition. **Molecular Cancer**. 15(1):49, 2016. (査読有) doi: 10.1186/s12943-016-0534-2.

Kosai K. (全 7 名, Last); Heparin-Binding Epidermal Growth Factor - Like Growth Factor and Hepatocyte Growth Factor Inhibit Cholestatic Liver Injury in Mice Through Different Mechanisms. **Int J Mol Med**. 38:1673-1682, 2016. (査読有) doi: 10.3892/ijmm.2016.2784.

小賤健一郎; 多因子増殖制御型アデノウイルスの開発と実用化の展望：独自開発の技術を本邦発の革新医薬へ。 **実験医学**, 34(1): 19-25, 2016. (査読無)

三井 薫、小賤健一郎; 多能性幹細胞の腫瘍化原因細胞をがん特異的制限増殖型アデノウイルスにより特異的に除去する新技術。 **BIOINDUSTRY**, 33(2):11-25, 2016. (査読無)

三井 薫、小賤健一郎; iPS 細胞培養からがん化の恐れのある細胞を死滅させる方法。 **PHARMSTAGE**. 15(12):10-15, 2016. (査読無)

Kosai K. (全 15 名, 14 番目); Intravenous administration of endothelial colony-forming cells overexpressing integrin $\beta 1$ augments angiogenesis in ischemic legs. **Stem Cells Trans Med**. 5(2):218-26, 2016. [cover] (査読有) doi: 10.5966/sctm.2015-0096.

Kosai K. (全 6 名, Last); Conditionally replicating adenovirus prevents pluripotent stem cell-derived teratoma by specifically eliminating undifferentiated cells. **Mol Ther Methods Clin Dev**. 2:15026, 2015. [Featured Article] [EDITORIAL] (査読有) doi: 10.1038/mtm.2015.26.

Kosai K. (全 15 名, 13 番目); Disturbance of cardiac gene expression and cardiomyocyte structure predisposes

Mecp2-null mice to arrhythmias. **Sci Rep.** 5:11204, 2015. (査読有) doi: 10.1038/srep11204.

Kosai K. (全 7 名, Last); Intramuscular injection of adenoviral hepatocyte growth factor at a distal site ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. **Int J Mol Med.** 33(5):1064-1074, 2014. (査読有) doi: 10.3892/ijmm.2014.1686.

Kosai K. (全 9 名, Last); Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus kills rhabdomyosarcoma stem cells more efficiently than their progeny. **J Transl Med.** 12:27, 2014. (査読有) doi: 10.1186/1479-5876-12-27.

Ijichi N. (全 12 名, First); Association of Positive EBAG9 Immunoreactivity With Unfavorable Prognosis in Breast Cancer Patients Treated With Tamoxifen. **Clinical Breast Cancer.** 13(6):465-470, 2013. (査読有) doi: 10.1016/j.clbc.2013.08.015.

Ijichi N. (全 4 名, First); FOXP1 and estrogen signaling in breast cancer. **Vitam. Horm.** 93:203-212, 2013. (査読無) doi:10.1016/B978-0-12-416673-8.00006-X.

[学会発表](計 10 件)

伊地知 暢広、川上 広高、小宮 節郎、小賤 健一郎；増殖制御型アデノウイルスによる癌・再生医学研究へのハムスターモデルの開発(ポスター)第 122 回日本解剖学会総会全国学術集会, 2017 年 3 月 28-30 日(長崎大学坂本キャンパス/長崎県長崎市)

小賤 健一郎、三井 薫、井手 佳菜子、伊地知 暢広、入江 理恵；遺伝子治療、再生医療の独自開発技術の臨床応用と発生学への展望(シンポジウム)第 122 回日本解剖学会総会全国学術集会, 2017 年 3 月 28-30 日(長崎大学坂本キャンパス/長崎県長崎市)

伊地知 暢広、田上 聖徳、小賤 健一郎；独自開発の多因子制御によるがん特異的増殖型アデノウイルスの肝癌幹細胞への革新的治療作用(一般演題 口演)第 16 回日本再生医療学会総会, 2017 年 3 月 7-9 日(仙台国際センター/宮城県仙台市)

小賤 健一郎；多因子増殖制御型アデノウイルス(m-CRA)による腫瘍溶解・免疫/遺伝子ウイルス治療への開発(シンポジウム)第 16 回日本再生医療学会総会, 2017 年 3 月 7-9 日(仙台国際センター/宮城県仙台市)

小賤 健一郎；癌への多因子増殖制御型アデノウイルス(m-CRA)の医師主導治験と

免疫遺伝子ウイルス治療への展望(シンポジウム)第 14 回日本免疫治療学研究会学術集会, 2017 年 2 月 11 日(東京大学 伊藤国際学術研究センター/東京都文京区)

小賤 健一郎；がんへの多因子増殖制御型アデノウイルス薬の開発と実用化の展望(特別講演・市民公開講座)日本臨床腫瘍薬学会学術大会 2016 2016 年 3 月 12 日(鹿児島サンロイヤルホテル/鹿児島県鹿児島市)

Kosai K.; Development of the original survivin-responsive conditionally replicating adenovirus toward the investigator-initiated GCP clinical trial. (招待シンポジウム)第 21 回日本遺伝子治療学会学術集会, 2015 年 7 月 24-26 日(大阪国際会議場/大阪府大阪市)

小賤 健一郎；増殖制御型アデノウイルスによる革新的癌治療法の独自開発を臨床応用への展望(特別講演)第 29 回日本整形外科基礎学術集会 2014 年 10 月 9-10 日(城山観光ホテル/鹿児島県鹿児島市)

永野 聡、小賤 健一郎、小宮 節郎；革新的癌治療薬を目指した増殖制御型アデノウイルスの独自開発から医師主導治験へ(シンポジウム)第 29 回日本整形外科基礎学術集会 2014 年 10 月 9-10 日(城山観光ホテル/鹿児島県鹿児島市)

小賤 健一郎；新しい遺伝子治療ウイルスベクターの開発と基礎・臨床への応用(ランチョンセミナー)第 91 回日本生理学会大会 2014 年 3 月 16 日(鹿児島大学/鹿児島県鹿児島市)

[図書](計 2 件)

伊地知 暢広、小賤 健一郎；『第 3 節 独自開発の多因子増殖制御型アデノウイルス(m-CRA)技術による遺伝子・ウイルス治療薬の臨床開発と実用化の展望』(第 III 編 第 3 章ウイルス治療薬開発)次世代がん治療. 249-257, 2017 ((株)エヌ・ティー・エス 2017.6.8 発刊)

三井 薫、小賤 健一郎；『第 5 節 ウイルスを用いたがん化細胞(腫瘍化原因細胞)の除去技術の開発』(第 1 章 iPS 細胞作製・培養時における細胞のがん化メカニズムと検出・評価) iPS 細胞の安全・高品質な作製技術. 38-45, 2016 (技術情報協会 2016.10.31 発刊)

[産業財産権]

出願状況(計 2 件)

名称：幹細胞における腫瘍化原因細胞の新たな標識法と治療法
発明者：小賤 健一郎、三井 薫、井手 佳菜子
権利者：鹿児島大学

種類：特許権
番号：PCT/JP2015/000138
取得年月日：2015年1月14日
国内外の別：国外

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号：90258418

名称：幹細胞における腫瘍化原因細胞の新たな標識法と治療法
発明者：小賤健一郎、三井薫、井手佳菜子
権利者：鹿児島大学
種類：特許権
番号：特願 2014-004262
取得年月日：2014年1月14日
国内外の別：国内

取得状況（計 3 件）
名称：サービピン (Survivin) プロモーターを含む増殖型ベクターを有効成分とする癌治療薬
発明者：小賤健一郎、神園純一、永野聡
権利者：小賤健一郎
種類：特許権
番号：特許第 5574284 号
取得年月日：2014年7月11日
国内外の別：国内

名称：Drug Comprising As The Active Ingredient Proliferative Vector Containing Survivin Promoter.
発明者：小賤健一郎、神園純一、永野聡
権利者：小賤健一郎
種類：特許権
番号：US 8,709,812
取得年月日：2014年4月29日
国内外の別：国外

名称：増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法及びその作製用キット
発明者：小賤健一郎、永野聡
権利者：財団法人 名古屋産業科学研究所（中部 TLO）
種類：特許権
番号：EP 1662004
取得年月日：2013年11月20日
国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~anatomy2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊地知 暢広 (IJICHI, Nobuhiro)
鹿児島大学・医歯学域医学系・助教
研究者番号：80380624

(2) 研究分担者

小賤 健一郎 (KOSAI, Ken-ichiro)