

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460484

研究課題名(和文) 二重制御型腫瘍溶解アデノウイルスを用いた新しい播種性癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of oncolytic adenovirus as a new therapeutic agent for treating disseminated cancers

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：播種性癌は治癒困難な疾患であり、新規治療法の開発が急務である。我々はこれまでに、腫瘍細胞特異的なプロモーターによってウイルスの増殖を腫瘍細胞に限定する腫瘍溶解アデノウイルスを開発してきた。本申請研究では、更にウイルスファイバーの細胞受容体結合部を腫瘍細胞特異的に改変することで感染力と腫瘍特異性を向上させた二重制御型腫瘍溶解アデノウイルスを新たに開発し、その抗腫瘍効果について検討した。

研究成果の概要(英文)：Disseminated cancers are generally non-curative and novel therapeutic paradigms are urgently required. We developed dual-targeted oncolytic type 5 adenoviruses in which the viral replication was regulated by cancer-specific promoter and the receptor-binding site in the fiber was modified to target CD46 that was highly expressed in most cancer cells. We then examined the anti-tumor effects in various cancer models.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：遺伝子治療 腫瘍溶解ウイルス 癌

1. 研究開始当初の背景

我々は、腫瘍特異的なミッドカインプロモーターによってアデノウイルス初期転写産物である E1 遺伝子の発現を制御することで癌細胞のみでウイルスが増殖する腫瘍溶解アデノウイルス (MOA: Midkine promoter-regulated Oncolytic Adenovirus) を開発し、悪性中皮腫や膀胱癌皮下腫瘍モデルでの有効性を示してきた (引用文献①)。本ウイルスは腫瘍細胞内で増殖し細胞を溶解させ、周囲の腫瘍細胞へと拡散・感染し増殖・細胞溶解を繰り返す事で、最終的に腫瘍全体を破壊する。従って抗癌剤や分子標的薬が体腔内腫瘍に効率よく到達せず、予後不良である播種性癌に対して腫瘍溶解ウイルスは理想的な治療法と言える。しかし体腔内癌播種モデル (引用文献②③) において、通常用いられるヒト 5 型アデノウイルスを基盤にしたベクターでは十分な感染力と効果が得られない事が明らかになってきた。この原因の一つとして、我々は、5 型ウイルスの細胞受容体である Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) の発現が多くの腫瘍細胞株において低下していることを見出した。一方で、我々は、大腸癌・胃癌・悪性中皮腫・骨肉腫の培養細胞株において、3 5 型アデノウイルスのレセプターである CD46 (ほぼ全ての癌細胞株)、Epidermal growth factor receptor (EGFR) (多くの癌細胞株)、Human EGFR type 2 (HER2) (一部癌細胞株) の発現が増強していることを見出した (図 1)。

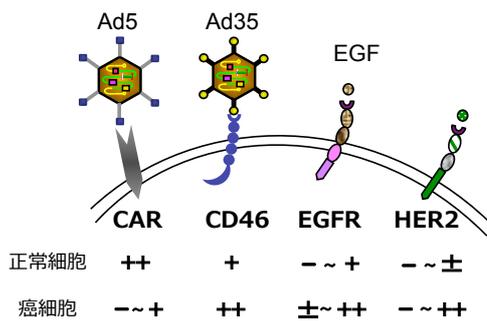


図 1 正常細胞及び癌細胞における CAR, CD46, EGFR 及び HER2 の発現

このため、さらに感染力を高め、治療効果を増強させる何らかの工夫が必要である。一方で播種性癌においては、治療用ウイルスの増殖と拡散がより一層腫瘍特異的に制御される事 (腫瘍特異性) が、安全性の点から重要になる。

2. 研究の目的

播種性癌に対する新規ウイルス医薬の開発を目的として、高い感染力と癌特異性を併せ持つ腫瘍アデノウイルスを開発する。その方法として、以下のような細胞への付着 (感染) 及び細胞内増殖の各過程で癌特異性を発揮する二重制御型腫瘍溶解アデノウイルスを作製する。

(1) 増殖制御: 癌特異的なミッドカインプロモーターでアデノウイルスの E1 遺伝子の転写制御を行う事によりウイルス増殖を腫瘍細胞のみに限定する。

(2) 感染制御: アデノウイルスのファイバーを改変することにより、大腸癌、胃癌、悪性中皮腫 (低 CAR、高 CD46、高 EGFR、一部で高 HER2) のような細胞においても、CAR に依存せず CD46、EGFR、HER2 に依存した感染経路で腫瘍細胞に効率よく感染させる。

3. 研究の方法

(1) 二重制御型腫瘍溶解アデノウイルスの構築、大量調整及びウイルス学的評価

これまでのミッドカインプロモーター制御型腫瘍溶解アデノウイルス (MOA5) のファイバー先端の細胞受容体結合部位を以下のように改変したウイルスを作製する (図 2)。

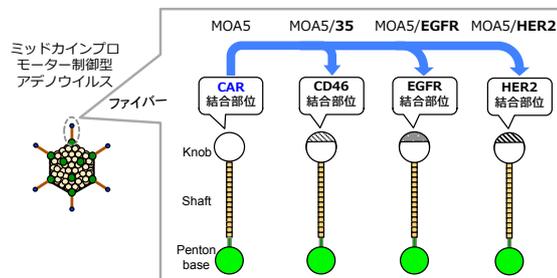


図 2 アデノウイルス ファイバーの改変 (概略図)

① 5/35 型ファイバー置換型 (MOA5/35): アデノウイルス 5 型のファイバーノブの CAR 結合部位を 35 型の CD46 結合部位と置換。

② EGFR 標的化 (MOA5/EGFR): アデノウイルス 5 型のファイバーノブの CAR 結合部位を EGFR の EGFR 結合部位と置換。

③ HER2 標的化 (MOA5/HER2): HER2 結合型キメラ蛋白 (Affibody) 遺伝子を Got-a-Gene AB 社 (Sweden) より入手しており、これを基に HER2 標的化ファイバーを作製。

上記のファイバーコンストラクトを基に二重制御型腫瘍溶解アデノウイルスゲノムのプラスミドを作製する。293細胞を用い

てウイルスを大量調整し、塩化セシウム密度勾配遠心法にて濃縮・精製する。ウイルスを作製後、タイターなどのウイルス学的な評価を行う。

(2) 二重制御型腫瘍溶解アデノウイルスの培養細胞株での抗腫瘍効果評価

MOA5/35、MOA5/EGFR、MOA5/HER2、及び5型ファイバーを保持するウイルス (MOA5) を種々の腫瘍細胞 (大腸癌 4 種、胃癌 5 種、悪性中皮腫 6 種；既に CAR、CD46、EGFR、HER2 の発現を検討済みで、胸水・腹水産生株を含む) 及び正常細胞に感染させ、各ウイルスによる殺細胞効果を MTS 法及びクリスタルバイオレット法にて比較検討する。

(3) 二重制御型腫瘍溶解アデノウイルスを用いた皮下腫瘍モデルでの治療実験

ヌードマウスの背側皮下にヒト消化器癌及び悪性中皮腫細胞株を移植し、腫瘍径が 5mm になった時点で、MOA5/35、MOA5/EGFR、MOA5/HER2、MOA5 (対照群) を腫瘍内投与する。定期的に腫瘍径を測定し、抗腫瘍効果を比較検討する。観察期間終了時点でマウスを安楽死させ、病理組織学的検討を行う。

(4) 二重制御型腫瘍溶解アデノウイルスを用いた体内癌播種致死性マウスモデルにおける治療実験

① in vivo イメージングが可能な播種性癌致死モデルの作製

mCherry で蛍光標識したヒト消化器癌及び悪性中皮腫細胞株を、ヌードマウスの腹腔内及び胸腔内にそれぞれ移植することで播種性癌致死モデルを作製する。

② 播種性癌致死モデルマウスを用いた治療実験

作製した上記の致死モデルに、既に作製済みの MOA5/35、MOA5/EGFR、MOA5/HER2、MOA5 を腹腔内及び胸腔内投与する。定期的に体重を測定、in vivo イメージングシステム (Maestro, Cambridge Research & Instrumentation, Inc) を用いて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。また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 (赤色蛍光) へのウイルスの感染効率と腫瘍内伝播効率を評価する。抗腫瘍効果の判定は、腹水量、イメージングの解析結果、病理組織学的所見を比

較検討する事により行なう。また、群間での生存期間の差異についても検討する。

4. 研究成果

(1) 二重制御型腫瘍溶解アデノウイルスの構築、大量調整及びウイルス学的評価

ミッドカイン制御型腫瘍溶解アデノウイルス (MOA5) に以下の 3 種類のアデノウイルスファイバーの改変を加えたウイルスを作製した (図 2)。①CD46 標的化 (5/35 型ファイバー置換型：MOA5/35)、②EGFR 標的化 (MOA5/EGFR)、③HER2 標的化 (MOA5/HER2)。これら 3 種類のウイルスのうち、MOA5/EGFR については HEK293 細胞でウイルスの大量調整を 5 度試みたが、結果的に高いウイルス力価を持つものを作製できなかった。作製したファイバーを組み込んだウイルスゲノムサイズが大きく効率的にパッケージングされないことが推測された。以後、ウイルスの大量調整に成功した MOA5/35 及び MOA5/HER2 について検討を進めた。

(2) 二重制御型腫瘍溶解アデノウイルスの培養細胞株での抗腫瘍効果評価

種々の腫瘍細胞 (悪性中皮腫 6 種、骨肉腫 5 種、大腸癌 4 種、胃癌 5 種) において MOA5/35 及び MOA5/HER2 は、ファイバー改変前の MOA5 に比べ、それぞれ低 CAR 発現細胞株 (MNNG-HOS 及び MG-63 など) 及び低 CAR/HER2 陽性細胞株に置いて感染導入効率と細胞障害性の増強が得られた (図 3 及び未発表データ)。

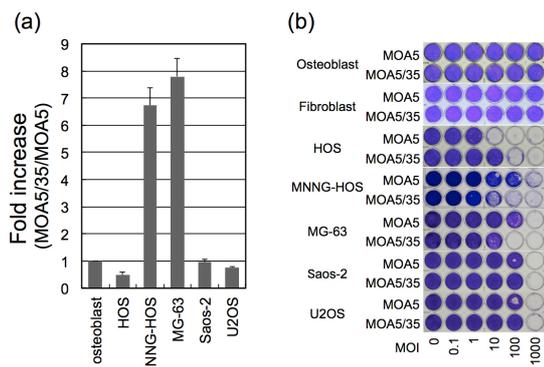


図3 アデノウイルスのファイバー改変による感染導入効率(a)と細胞障害性(b)の増強

(3) 二重制御型腫瘍溶解アデノウイルスを用いた皮下腫瘍モデルでの治療実験

種々の腫瘍細胞 (悪性中皮腫 2 種、骨肉腫 1 種、大腸癌 1 種、胃癌 2 種) において、MOA5/35 及び MOA5/HER2 は、ファイバー改変前の MOA5 に比べ、それぞれ低 CAR 発現細胞

株 (MNNG-HOS 及び MG-63 など) 及び低 CAR/HER2 陽性細胞株を用いた皮下腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果の増強が確認された (図 4 及び未発表データ)。

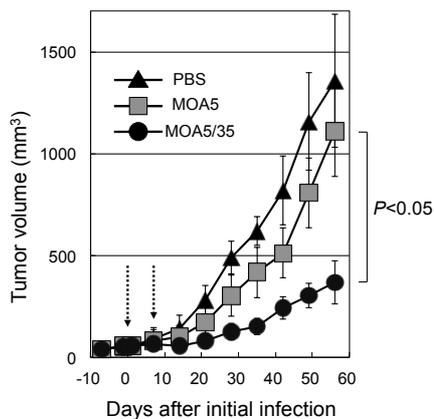


図4 アデノウイルスのファイバー改変による抗腫瘍効果の増強 (MG-63皮下移植モデル)

(4) 二重制御型腫瘍溶解アデノウイルスを用いた体腔内癌播種致死性マウスモデルにおける治療実験

播種性癌に対する効果検討するためのモデルとして、in vivo イメージングが可能な播種性癌致死マウスの作製に成功した (悪性中皮腫 3 細胞株、骨肉腫 2 株、大腸癌 2 株)。このうち悪性中皮腫細胞株 MST0-211H を用いたモデルにおいて、MOA5/35 の治療効果を検討する実験を繰り返したが、腫瘍の縮小を認めた個体が存在するものの、群としては有意な抗腫瘍効果及び生存期間延長効果を示すことができなかった。この主たる原因の一つとして、複数 (~無数) の全腫瘍にあまねく治療ウイルスを到達・感染させることが増殖型ウイルスを持ってしても困難であることが考えられた。そこで免疫賦活因子 (インターフェロンなど) や血管新生抑制因子などと併用することで抗腫瘍効果をさらに増強させる治療戦略が必要と考え検討を重ねたところ、血管新生抑制作用を持つエンドスタチン及び NK4 などが有効であることを見出し、これら併用療法の研究を進めている。

以上の結果を纏めると、本研究で作製した二重制御型腫瘍溶解アデノウイルスは、ファイバー改変により、1) 癌細胞株に対する感染導入効率と細胞障害性の増強、2) 皮下腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果の増強が得られたが、3) 体腔内癌播種致死性マウスモデルにおいては生存期間の延長効果が得られ

ず、さらなるウイルスの改良、特に治療遺伝子を搭載したウイルスの構築が望まれる。

<引用文献>

- ① 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(8): 681-92.
- ② 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(2):273-9.
- ③ 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(8): 571-8.

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 Combinatorial anti-angiogenic gene therapy in a human malignant mesothelioma model. Kubo S, Takagi-Kimura M, Kasahara N. *Oncol Rep.* 2015;34(6):633-8. doi: 10.3892/or.2015.4058. 査読有
- ② Oncolytic virotherapy for osteosarcoma using midkine promoter-regulated adenoviruses. Takagi-Kimura M, Yamano T, Tagawa M, Kubo S. *Cancer Gene Ther.* 2014;21(3):126-32. doi: 10.1038/cgt.2014.7. 査読有
- ③ Highly efficient tumor transduction and antitumor efficacy in experimental human malignant mesothelioma using replicating gibbon ape leukemia virus. Kubo S, Takagi-Kimura M, Logg CR, Kasahara N. *Cancer Gene Ther*

2013;20(12):671-7. doi: 10.1038/cgt.2013.67. 査読有

- ④ Enhanced antitumor efficacy of fiber-modified, midkine promoter-regulated oncolytic adenovirus in human malignant mesothelioma. Takagi-Kimura M, Yamano T, Tamamoto A, Okamura N, Okamura H, Hashimoto-Tamaoki T, Tagawa M, Kasahara N, Kubo S. *Cancer Sci.* 2013; 104(11): 1433-9. doi: 10.1111/cas.12267. 査読有

[学会発表] (計 17 件)

- ① 久保秀司, 木村美智, 山野智基, 玉置知子, 田川雅敏, ミッドカインプロモーター制御型アデノウイルスを用いた骨肉腫に対する腫瘍溶解療法, 日本人類遺伝学会第 59 回大会, 2014 年 11 月 20 日 タワーホール船掘 (東京都・江戸川区船掘)
- ② Kubo S, Takagi-Kimura M, Kasahara N, Enhanced transduction and antitumor efficiency of fiber-modified, midkine promoter-regulated oncolytic adenovirus in human malignant mesothelioma, The 12th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group, 2014 年 10 月 23 日 Cape Town (South Africa)
- ③ Kubo S, Takagi-Kimura M, Tamamoto A, Tagawa M, Enhanced transduction and antitumor efficiency of fiber-modified, midkine promoter-regulated oncolytic adenovirus in human malignant mesothelioma, The 11th International Adenovirus Meeting, 2014 年 7 月 18 日 San Diego (USA)
- ④ 久保秀司, 木村 (高木) 美智, Logg Christopher R, 笠原 典之, 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, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 5 日 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- ⑤ 久保秀司, 木村美智, 玉本敦子, 山野智基, 玉置知子, 笠原典之, 田川雅敏, 二重制御型アデノウイルスを用いた骨肉腫に対する腫瘍溶解療法の開発, 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 2013 年 11 月 22 日 江陽グランドホテル (宮城県・仙台市)
- ⑥ 久保秀司, ヘルペスウイルスチミジン

キナーゼを用いた癌自殺遺伝子治療を最適化する腫瘍融解ウイルスの開発, 第 39 回日本応用酵素協会研究発表会, 2013 年 11 月 18 日 ホテル阪急インターナショナル大阪 (大阪府・大阪市)

- ⑦ Kubo S, Takagi-Kimura M, Yamano T, Yoshikawa Y, Emi M, Tagawa M, Kasahara N, Hashimoto-Tamaoki T, Dual targeted adenovirus for oncolytic virotherapy in experimental human osteosarcoma, 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 6 日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑧ Kubo S, Takagi-Kimura M, Tamamoto A, Tagawa M, Kasahara N, Hashimoto-Tamaoki T, Midkine promoter-driven oncolytic adenovirus with adenovirus 35 fiber modification achieves enhanced transduction of human osteosarcoma cells, 第 19 回日本遺伝子治療学会学術集会, 2013 年 7 月 6 日 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)
- ⑨ Kubo S, Takagi-Kimura M, Tamamoto A, Hashimoto-Tamaoki T, Kasahara N, Tagawa M, Development of dual targeted oncolytic adenovirus for human malignant mesothelioma, The 16th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy, 2013 年 5 月 18 日 Salt Lake City (USA)

他 8 件

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

山野 智基 (YAMANO, TOMOKI)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号: 00599318

大山 秀樹 (OHYAMA, HIDEKI)
兵庫医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 90280685