

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670717

研究課題名(和文) 増殖制限型アデノウイルスを用いた遺伝子導入による頭頸部癌治療法の開発

研究課題名(英文) Gene therapy for head and neck cancer using replication-selective adenoviral vector

研究代表者

丹生 健一 (Ken-ichi, Nibu)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20251283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍内で特異的に発現しているMidkineをプロモーターとした増殖制限型アデノウイルスベクターAd-MKを作成し、さらに腫瘍増殖に関与するVEGFのmRNAに対するsiRNAを組み込んだAs-MK-sVEGFを作成した。in vitro studyでは、Midkineを高発する頭頸部扁平上皮癌の培養細胞株に対して、非増殖型アデノウイルスベクターに比べて、Ad-MK-siRNAは明らかに強力な腫瘍増殖抑制効果が得られた。

研究成果の概要(英文)：A conditional replication-selective adenovirus vector in which the expression of E1a and E1b, required for viral replication, are controlled by the Midkine promoter, Ad-MK-E1, was generated.

To further enhance the oncolytic activity of Ad-MK-E1a, we integrated gene-expressing siRNA against VEGF to Ad-MK-E1 and generated Ad-MK-siVEGF. In vitro assays showed significant growth suppression not only in the cell lines expressing strong Midkine but also in the cell lines expressing weak Midkine, in comparison with adenoviral vector containing LacZ.

研究分野：耳鼻咽喉科頭頸部外科

キーワード：gene therapy head and neck cancer adenoviral vector replication-selective siRNA VEGF Midkine

## 1. 研究開始当初の背景

### 【増殖制限型アデノウイルスベクターによる腫瘍溶解ウイルス治療】

現在、遺伝子導入の研究や治療に用いられているアデノウイルスベクターの大半は、安全を考慮しウイルスの自己複製に必要な遺伝子の一部E1aを取り除かれた非増殖型のものである。これらのウイルスは目標となる細胞に感染し、組み込まれた遺伝子を細胞内で発現することにより効果を発現するが、ウイルスは人体の免疫機構により処理されるため、その効果は限定される。そこで、我々は、より大きな効果を得るために、目的とする腫瘍細胞において特異的に発現している遺伝子COX2をプロモーターとして、自己複製を抑制するために取り除かれていた遺伝子E1aを非増殖型アデノウイルスベクターに組み込んで、ターゲットとする細胞の中でのみ特異的に増殖する能力を持たせた増殖制限型アデノウイルスベクターAd-COX2の、腫瘍溶解性ウイルスとしての抗腫瘍効果を培養細胞ならびにマウスモデルを用いて報告してきた。

### 【増殖制限型アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入による遺伝子治療】

本計画では、これまでの経験をもとに、多くの腫瘍細胞内で高い発現がみられるMidkineをプロモーターとして制限増殖型アデノウイルスベクターAd-Midkineを作成し、このウイルスベクターに腫瘍増殖に関わる遺伝子EGFRやVEGFに対するsiRNAを組み込むことにより、正常組織に有害な副作用を与えることなく、ターゲットとする腫瘍細胞内で増殖し、EGFRやVEGFの発現を押しやえ込むことによる抗腫瘍作用を狙った新たな治療法の開発を目的に本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

我々はこれまで、非増殖型アデノウイルスベクターに、頭頸部癌などの悪性腫瘍に特異的に高発現しているCOX2をプロモーターとしてウイルスの自己増殖に必要なE1a遺伝子を

組み込んだCOX2を発現している腫瘍細胞の中でのみ特異的に増殖可能な増殖制限型アデノウイルスベクターAd-COX2の腫瘍溶解性ウイルスとしての有効性を報告してきた。本研究計画では、Midkineをプロモーターとして腫瘍特異的増殖型ウイルスベクターを作成し、更に、このウイルスベクターにRNAポリメラーゼIII系のU6をプロモーターとして、腫瘍の増殖に関わる遺伝子(EGFR, VEGF)に対するsiRNAを組み込むことにより、より強力な抗腫瘍効果を持つ腫瘍特異的に増殖可能なアデノウイルスベクターを開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

非増殖型アデノウイルスベクターに、頭頸部癌などの悪性腫瘍に特異的に高発現しているMidkineをプロモーターとしてウイルスの自己増殖に必要なE1a遺伝子を組み込み、Midkineを発現している腫瘍細胞の中でのみ増殖可能な増殖制限型アデノウイルスベクターAd-Midkineを作成する。Ad-Midkineはそれ自体、腫瘍細胞内で増殖して腫瘍細胞を破壊し腫瘍溶解性ウイルスとして抗腫瘍効果を発揮するが、本研究計画では、このウイルスベクターにsiRNA発現に有効なU6をプロモーターとして腫瘍の増殖に関わる遺伝子(EGFR, VEGF)に対するsiRNAを組み込むことにより、更に強力な抗腫瘍効果を持つ腫瘍特異的に増殖可能なアデノウイルスベクターを作成する。作成された腫瘍特異的に増殖可能なアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療の効果を培養細胞ならびにマウス頭頸部癌モデルを用いて評価する。

### 制限増殖型アデノウイルスの作製と *in vitro* での抗腫瘍効果の検討実験

1) 非増殖型アデノウイルスベクターに、頭頸部癌などの悪性腫瘍に特異的に発現しているMidkineをプロモーターとしてウイルスの自己増殖に必要なE1a遺伝子を組み込み、

Midkine を発現している腫瘍細胞の中でのみ増殖可能な増殖制限型アデノウイルスベクター Ad-Midkine を作成する。

2) 同様に非増殖型アデノウイルスベクターに U6 をプロモーターとして腫瘍の増殖に関わる遺伝子 EGFR, VEGF の siRNA 配列を導入し、またはコントロールとして siRNA 配列のスクランブル配列を組み込んだ

Ad-iEGFR, Ad-iVEGF, Ad-control を作成する。

3) Ad-Midkine はそれ自体、腫瘍細胞内で特異的に増殖して腫瘍細胞を破壊し腫瘍溶解性ウイルスとして抗腫瘍効果を発揮するが、このウイルスベクターの E1a 遺伝子の下流に U6 をプロモーターとして腫瘍の増殖に関わる遺伝子 EGFR, VEGF に対する siRNA を組み合わせることにより、更に強力な抗腫瘍効果を持つ腫瘍特異的増殖型アデノウイルスベクター Ad-Midkine-iEGFR, Ad-Midkine-iVEGF を作成する。

4) 作成された Ad-Midkine, Ad-iEGFR(iVEGF, control), Ad-Midkine-iEGFR(iVEGF, control)の単独で投与した場合の抗腫瘍効果を培養細胞で検討する。その後、Ad-Midkine と Ad-iEGFR(iVEGF, control)を同時投与した場合と、Ad-Midkine-iEGFR(iVEGF, control)を投与した場合との効果の比較を培養細胞レベルで検討する。

【E1a 遺伝子を組み込んだ増殖制限型アデノウイルスベクターの作成】

1. 基本ベクターとなる pAxcwit2 に Midkine プロモーター下で E1a を発現するプラスミド pAxcwit2-Midkine-E1a を作製する。

2. 293 細胞に形質移入し、増殖制限型アデノウイルスベクター(Ad-Midkine)を生産、精製する。

3. 頭頸部扁平上皮癌細胞株に感染させ、単独での抗腫瘍効果があることを確認する

【EGFR に対する siRNA 遺伝子を組み込んだ非

増殖型アデノウイルスベクターの作成】

1. 基本ベクターとなる pAxcwit2 に U6 プロモーター下で EGFR の siRNA となる iEGFR を発現するプラスミド pAxcwit2-U6-iEGFR を作製する。

2. 293 細胞に形質移入し、非増殖型アデノウイルスベクター(Ad-iEGFR)を生産、精製する。

3. 頭頸部扁平上皮癌細胞株に感染させ、単独での抗腫瘍効果があることを確認する。

【EGFR に対する siRNA 遺伝子を組み込んだ増殖制限型アデノウイルスベクターの作成】

1. pAxcwit2-U6-iEGFR から U6 プロモーターと iEGFR 領域を切り出し、既に作製されているプラスミド pAd-Midkine に挿入し、最終目的産物である制限増殖型アデノウイルスベクター Ad-Midkine-iEGFR を産生するプラスミド pAd-Midkine-iEGFR を得る。

2. これを上述同様 293 細胞に形質移入し、制限増殖型アデノウイルスベクター Ad-Midline-iEGFR を生産、精製する。

3. 頭頸部扁平上皮癌細胞株に感染させ、単独での抗腫瘍効果を検討する。

4. 研究成果

腫瘍内で特異的に発現している Midkine をプロモーターとした増殖制限型アデノウイルスベクター Ad-MK を作成し、さらに腫瘍増殖に関与する VEGF の mRNA に対する siRNA を組み込んだ As-MK-sVEGF を作成した。in vitro study では、Midkine を高発する頭頸部扁平上皮癌の培養細胞株に対して、非増殖型アデノウイルスベクターに比べて、Ad-MK-siRNA は明らかに強力な腫瘍増殖抑制効果が得られた。

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 2 件)

Saito H, Ando S, Morishita N, Lee KM, Dator D, Dy D, Shigemura K, Adhim Z, Nibu

K, Fujisawa M, Shirakawa T. A combined lymphokine-activated killer (LAK) cell immunotherapy and adenovirus-p53 gene therapy for head and neck squamous cell carcinoma. Anticancer Res. 2014;34:3365-70.

Adhim Z, Otsuki N, Kitamoto J, Morishita N, Kawabata M, Shirakawa T, Nibu K. Gene silencing with siRNA targeting E6/E7 as a therapeutic intervention against head and neck cancer-containing HPV16 cell lines. Acta Otolaryngol. 2013 Jul;133(7):761-71.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

丹生健一 (Ken-ichi Nibu)  
神戸大学大学院・医学研究科・教授  
研究者番号：20251283

### (2)研究分担者

大月直樹 (Naoki Otsuki)  
神戸大学大学院・医学研究科・准教授  
研究者番号：40343264

### (3)連携研究者

白川利朗 (Toshirou Shirakawa)  
神戸大学大学院・保健学研究科・准教授  
研究者番号：70335446