

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：32409
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26462024
研究課題名(和文) 新規消化管アデノウイルスに由来する腫瘍溶解療法の大腸癌幹細胞モデルを用いた評価

研究課題名(英文) Cancer-targeting virotherapy on human colon cancer stem-like cells by newly isolated human enteric adenoviruses

研究代表者
田代 浄 (Tashiro, Jo)
埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：40601258
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：新規消化管アデノウイルスAd65、Ad67の大腸癌細胞株に対する癌殺傷効果を腸管指向性から検討した。各種がん細胞株で大腸癌細胞由来細胞株に対して高い指向性を示した。ファイバー改変型ベクターAd5/65-CMV-EGFPを用いてreceptorを解析し、CAR-dependentとCAR-independentの2種の感染経路が関与していた。腸内環境におけるacid pHでの安定性はAd5とAd65に差を認めなかった。Colon cancer stem cellへの感染能(fiber-modified GFP vector)、増殖能(burst assay)の評価準備段階である。

研究成果の概要(英文)：Oncolytic viruses, which selectively kill colon cancer cells but not normal cells, were assessed from digestive tropism in newly isolated human enteric adenoviruses Ad65 Ad67. Higher tropism was shown for colorectal cancer cell lines selectively in various cancer cell lines. We constructed the fiber-modified adenoviral vector which is an Ad5-based replication defective vector having the Ad65 fiber knob. Using this vector, we showed that Ad65 used two types of CAR-dependent (coxsackie and adenovirus receptor) and CAR-independent as a cellular attachment receptors. The stability of the virion in the acid pH which was enteral environment did not show differences between Ad5 and Ad65. The evaluation of infection (fiber-modified GFP vector) and replication (burst assay) to colon cancer stem cell are preliminary stages.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 ウイルス治療 ウイルスペクター 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴う癌罹患率の増加や集学的治療による癌生存率の向上が見られ、更なる向上を目的とした新規治療法の開発や身体的に治療制限のある癌患者に対する副作用の少ない安全な癌特效薬として遺伝子治療に寄せられる期待は大きい。なかでも治療用の DNA を標的癌細胞に効率よく導入するためのアデノウイルスベクターを用いた臨床試験が多く試みられてきた。一方で癌細胞だけでなく正常細胞への遺伝子導入から副作用が発現する危険性もある。そこでウイルス自体の感染性と増殖能を利用した「ウイルス治療」が期待されるようになった。病原体であるウイルスは、標的臓器に感染すると自己複製し病原性を発揮する。ウイルス自体を癌細胞・組織に感染させて、細胞内で自己複製させることにより ウイルス毒性による直接的な癌細胞の殺傷効果 ウイルスの周囲組織への感染免疫賦活による抗腫瘍効果 癌免疫賦活による全身における抗腫瘍効果 正常細胞には感染しない制限増殖能などの特徴を持つ。

本研究で使用するアデノウイルスは新規の消化管(腸炎)アデノウイルスであり、これまでの遺伝子治療やベクターに利用された報告はない。消化管ウイルスと大腸癌との関係性を見出すことは、結果として消化管ウイルスとウイルス性腸炎発症の機序の解明に貢献する期待もある。新規消化管アデノウイルスベクターによる新たな癌幹細胞治療は難治性大腸癌患者の治療選択肢の一つになりえる。

2. 研究の目的

切除不能進行再発大腸癌に対する手術、抗癌剤、放射線による生存期間中央値は

23 か月と延長したが、更なる延長を期待する治療法はないのが現状である。そこで腸炎ウイルスに由来する「新規消化管アデノウイルスに由来する腫瘍溶解療法」は、正常細胞内では増殖できず、標的とする癌細胞の受容体へ選択的に感染し増殖するウイルスベクターを投与し、ウイルス自体による細胞溶解効果や抗腫瘍免疫の誘導、アポトーシスによる局所腫瘍縮小効果に加えて、全身感染による遠隔転移巣の抗腫瘍効果を期待した新しい治療法である。また癌治療の妨げとなる癌幹細胞において、iPS 細胞由来の大腸癌幹細胞モデルを構築し、本治療法による抗腫瘍効果を評価しオーダーメイド治療へ展開する事が目的である。

3. 研究の方法

- (1) 新規消化管アデノウイルスを用いたベクターの作製
- (2) 新規消化管アデノウイルス各血清型 (Ad61、Ad65、Ad67) の siRNA を用いたレセプター同定
- (3) iPS による大腸癌幹細胞様細胞・前駆細胞の培養、再生
- (4) 癌幹細胞様細胞における新規消化管アデノウイルスベクターの動物実験(マウス)

(1) - 1 新規消化管アデノウイルスベクターの作製。PCR により増幅した共通配列を持つ DNA 断端をベクターに組み込む方法は Gibson Assembly 法を用いた。36Kbp の大きな Easy-Track へ戻しサブクロニング、プラスミドの作製を経て新規アデノウイルスベクターを作製した。

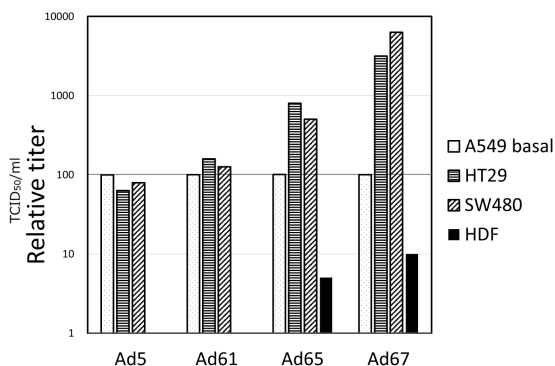
(2) - 1 レセプターの同定は、確実に簡易な siRNA を用いておこない、分子生物学的手法を組み合わせた。dsg2 siRNA (h),

CD46 siRNA (h), CAR siRNA (h)

- (3) - 1 大腸癌幹細胞の培養、AdV 感染能力の検討、ウイルス力価の最適化を行う。マウスへ移植し癌幹細胞、前駆細胞の再生実験を行い、癌幹細胞に対する抗腫瘍実験 in vitro へ移行する。
- (4) - 1 癌組織再生から自己癌細胞を再生し、新規消化管アデノウイルスベクターを投与し抗腫瘍効果を解析する。Receptor Booster kit による感染効率の比較実験を行い、更なるレセプターターゲティング治療の精度を上げる。
- (5) - 1 新規消化管アデノウイルスベクターへ遺伝子導入を行う。治療用の遺伝子として抗腫瘍サイトカイン (GM-CSF など) の遺伝子をコードした DNA を用いた遺伝子治療へ移行する。担癌マウスに 1 日おきに 5 回腫瘍局所内投与し、マウス大腸癌の局所、転移巣に対する本治療による免疫賦活経路と抗腫瘍評価を行う。異なる投与方法による免疫発現状況から機能経路を解析し、免疫賦活、発現消退、効果持続を把握し、全身への投与方法、回数を検討する。

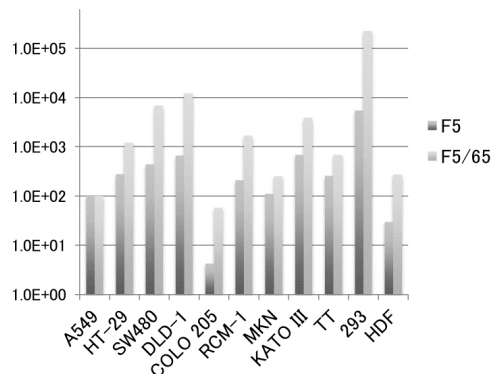
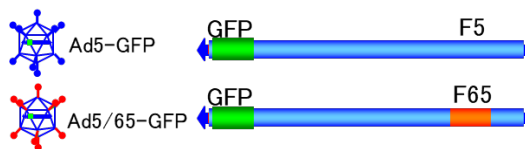
4. 研究成果

各種がん細胞株を用いた TCID₅₀ では、大腸癌細胞由来細胞株に対して高い指向性を示した。

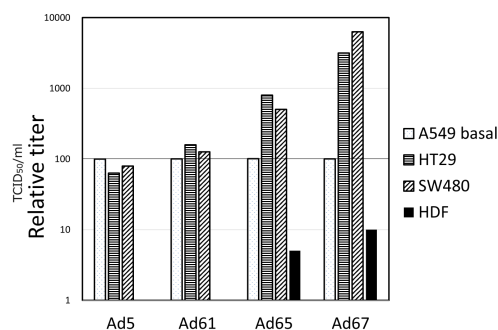


ファイバー改変型ベクター Ad5/65-CMV-EGFP を用いた FACS 解析により Ad65 は Ad5 の感染

パターンに類似していた。



fiber の real time PCR でウイルス量を測定し、A549では同じ腸管親和性を有する Ad9 のプラークサイズは Ad65 よりも小さかった。更にファイバー改変型ベクター Ad5/65-CMV-EGFP を用いて attachment receptor を解析し、HeLa や SW480 では主に CAR を用いていることが明らかとなった。Ad65 は Ad9 と同様、CAR-dependent と CAR-independent の 2 種の感染経路があることがわかり、CAR-independent として、ITGAV-KO hiPSCs を用いた実験から ITGAV が示唆された。腸内環境での安定性や細胞内での複製効率が腸管 tropism を規定しているかについて検討し、acid pH の安定性は Ad5 と Ad65 とではっきりした差を認めなかった。



本研究をより大腸癌へ特化するために、Colon cancer stem cell への感染能

(fiber-modified GFP vector)、増殖能 (burst assay) の評価が必要で準備段階である。また野生型 Ad40, Ad5, Ad61, Ad65, Ad67 などの腸内環境 acidic pH や腸内細菌叢における virion の安定性を検討する予定である。

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)

[学会発表] (計 0 件)

[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]

ホームページ等 : なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

田代 浄 (TASHIRO, Jo)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 40601258

(2) 研究分担者

三谷 幸之介 (MITANI, Kohnosuke)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 10270901

山口 茂樹 (YAMAGUCHI, Shigeki)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 30254220