

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462527

研究課題名(和文) リポソーム加工オンコリティックアデノウイルスによる卵巣癌特異的遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) Development of ovarian cancer-specific gene therapy by liposome-processed oncolytic adenovirus

研究代表者

濱田 雄行 (Hamada, Katsuyuki)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90172973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：陰性荷電のアデノウイルスを陽性荷電の40%、55%、5%の比率で8mMの濃度で配合したリポソームDOPE/DOTAP/EPCで加工し、さらに腫瘍特異性を有する陰性荷電のコンドロイチン硫酸で加工したところ、腫瘍特異的な抗腫瘍効果を示し、さらに抗アデノウイルス抗体存在下においても抗腫瘍効果を有する事が明らかとなった。さらに、弱い陰性荷電のコンドロイチン硫酸が強い陽性荷電を有するリポソームを中和できていないため、強い陰性荷電を有するヘパリンで加工すると抗体存在下においても強力な抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Negatively charged adenovirus was processed with positively charged liposomal DOPE/DOTAP/EPC formulated at a concentration of 8 mM at a ratio of 40%, 55%, 5% and further processed with negatively charged chondroitin sulfate having tumor specificity. Processed adenovirus showed tumor-specific anti-tumor effect even in the presence of anti-adenovirus antibody. Since weak negatively charged chondroitin sulfate was not able to sufficiently neutralize strongly positively charged liposomes, treatment with heparin having a strong negative charge shows a stronger antitumor effect even in the presence of the antibody as compared with adenovirus/liposome/chondroitin sulfate complex.

研究分野：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：産婦人科学

1. 研究開始当初の背景

IAI.3B 遺伝子は、卵巣癌肺転移組織の高分子領域からクローニングされた遺伝子で、卵巣癌の腫瘍マーカーCA125 と類似した発現パターンを示す (Campbell et al, Human Molecular Genetics, 1994)。我々は、IAI.3B 遺伝子プロモーターをクローニングしたところ、卵巣癌特異的に非常に高い活性を有し、また、アデノウイルス E1A 遺伝子プロモーターと置換してオンコリティックアデノウイルス AdE3-IAI.3B を作成すると、卵巣癌特異的に増幅し、強力な抗腫瘍効果を示すことを明らかにした (Hamada, K et al, Cancer Research, 2003)。アデノウイルス-p53 および E1B 遺伝子欠損型オンコリティックアデノウイルスは、それぞれ 2004 年、2007 年に中国において世界で最初の癌遺伝子治療薬として認可され実用化されている。これらの癌遺伝子治療薬が欧米、日本において実用化が困難となっているのは、抗体産生による感染抑制により抗腫瘍効果が認められないことにある。我々は、非小細胞性肺癌細胞の A549 細胞を放射線照射して腫瘍形成能を消失させ、オンコリティックアデノウイルス AdE3-IAI.3B に感染させてキャリアー細胞として用いることで、オンコリティックアデノウイルス感染後死滅した細胞が断片化し、このウイルス粒子を含有したキャリアー細胞断片が、標的癌細胞に直接的に貪食作用により取り込まれ、抗体存在下においても感染抑制を解除し、抗アデノウイルス CTL さらに抗腫瘍免疫誘導によりきわめて強力な抗腫瘍効果を示し、腫瘍内投与により卵巣癌皮下腫瘍は根治することを明らかにした (Hamada, K et al, Molecular Therapy, 2007)。一方、卵巣癌の正常位モデルである腹腔内播種性モデルにおいては、オンコリティックアデノウイルス単独感染キャリアー細胞では抗腫瘍効果無く、アデノウイルス-GM-CSF 共感染キャリアー細胞 2 回腹腔内投与により完全治癒となることが明らかとなった。

最近、種々のキャリアー細胞を用いた遺伝子治療が開発されているが、本キャリアー細胞の問題点として癌細胞であり細胞由来の癌遺伝子が host の細胞に integration される可能性が否定できないこと、間葉系幹細胞等の人由来の正常細胞は A549 ほどアデノウイルス産生能力が無く抗腫瘍効果も少ないこと、細胞加工製品であるため保存に液体窒素が -150 度の超低温層が必要、大量工業生産、安定性、輸送等に問題があり、ロット間の抗腫瘍効果に差が出て来易いこと、オンコリティックアデノウイルス由来の adenovirus death protein (ADP) により核膜が被薄化、分葉化し細胞が脆弱化するため長期保存に問題があり、ビーグル犬への安全性試験でキャ

リアー細胞の崩壊による急性 DIC による重篤な副作用の懸念があること等のあることがあげられる。さらに、アデノウイルス粒子含有キャリアー細胞断片が腫瘍細胞に貪食される機構は、アデノウイルスの受容体経路の感染に比べ時間がかかり効率が悪いため、よりオンコリティックアデノウイルスの抗腫瘍効果を高め、さらに上記の種々の問題点を解決するためには、キャリアー細胞に代わり直接アデノウイルス表面のカプシド蛋白を加工することにより抗体による感染抑制を解除し、癌特異的抗原および受容体経路で感染を成立させる新たな人口皮膜 (artificial envelope) を作成し、より効率的なオンコリティックアデノウイルスの癌特異的感染システムを確立する必要がある。

我々は、既にポリカチオンのポリエチレンジイミン (polyethyleneimine, PEI) とポリアニオンの癌マトリックスでその受容体 CD44 が癌に大量に発現するコンドロイチン硫酸 (chondroitin sulfate, CS) をオンコリティックアデノウイルスに対し多重加工することにより、皮下腫瘍モデルおよび卵巣癌腹腔内播種性モデルにおいてそれぞれ 80% と 60% の完全腫瘍退縮をきたすことを報告した (Yoshihara, C et al, Oncology Reports, 2010)。しかしながら、静脈投与を行うと PEI の毒性のため急性ショック死を引き起こし、全身投与による転移性腫瘍の治療が不可能となった。このため、従来より静脈投与にも使用されてきた陽性荷電のリポソームを用いて腫瘍特異的な CS を表面加工することにより、全身投与可能な卵巣癌特異的な遺伝子治療システムを構築する必要となった。

2. 研究の目的

アデノウイルスは、陰性に荷電しており、陽性荷電のリポソームと陰性荷電のコンドロイチン硫酸を多重加工し、腫瘍特異的な抗体による感染抑制に影響されない腫瘍特異的アデノウイルス感染システムを構築する。陽性荷電リポソーム作成には、膜融合性脂質で電荷を持たない膜融合性脂質 DOPE (L-dioleoyl phosphatidylethanolamine, ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン)、陽性荷電脂質の DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, 1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン)、中性りん脂質でリポソーム安定作用を有する EPC (egg phosphatidylcholine, 卵黄ホスファチジルコリン) を用いる。それぞれを種々の比率で配合し、陽性荷電のリポソーム DOPE/DOTAP/EPC を作成し -gal 発現アデノウイルス Ad- -gal を包埋し、抗アデノウイルス抗体存在下で -gal の発現を見ることにより、DOPE/DOTAP/EPC の至適配合比

率を決定する。至適配合比率を決定後、至適濃度でない場合各成分が非特異的に結合する可能性があるため、DOPE/DOTAP/EPCの作成時の至適濃度を決定する。アデノウイルスを被覆加工するに際し、反応時間の選択、溶媒の選択、マイクロミキサー・ボルテックス・スター・静置等の反応方法、反応容量・アデノウイルス濃度・リポソーム濃度等の反応至適条件の決定を行う。Ad-*gal*とDOPE/DOTAP/EPCとの反応条件が決定した後、陰性荷電のコンドロイチン硫酸を付加し同様に反応条件の設定を行う。DOPE/DOTAP/EPCの陽性荷電に対して、生体物質であるコンドロイチン硫酸は陰性荷電が弱いため、DOPE/DOTAP/EPCの陽性荷電を十分に中和することが出来ない。このため、強い陰性荷電を有するヘパリンを用いて最終的なDOPE/DOTAP/EPCの陽性荷電陽性荷電の中和を試みて抗体存在下での遺伝子発現量の改良を試みる。また、ヘパリンは多くの蛋白と特異的に結合することが知られており、こうしたヘパリン結合蛋白としてFGF1、FGF2、EGF、HB-EGF等がある。ヘパリン結合後の多重リポソーム加工アデノウイルスに対して、さらにこれらの腫瘍特異的に発現する蛋白との親和性そして抗体存在下でのアデノウイルスの遺伝子発現に対する効果について検討する。

3. 研究の方法

5, Ad-*gal*とDOPE/DOTAP/EPCの反応条件を決定した後、腫瘍特異的CD44をその受容体とする陰性荷電のコンドロイチン硫酸を付加し、その至適反応量と反応条件を決定する。

6, DOTAPの陽性荷電は強力であり、生体由来物質であるコンドロイチン硫酸は陰性荷電が相対的に弱く、DOTAPの陽性荷電を中和できない可能性が高い。このため、コンドロイチン硫酸よりさらに強い陰性荷電を有するヘパリンを用いてコンドロイチン硫酸によって中和できていないDOTAPの残留陽性荷電を中和して、血中血球および蛋白成分への結合を抑制する。ヘパリンについては、通常実験で使用されているヘパリンナトリウム以外に、未分画ヘパリン、低分子ヘパリンについて、また、ヘパリンは多くの製薬会社からも製造商品化されており、各会社において製造方法および原材料およびその成分が異なるためこうした点においても比較検討を行う。

7, ヘパリンは種々の成長因子にも結合し、細胞増殖に関与している。このため、腫瘍特異性を有するヘパリン結合蛋白質であるEGF、HB-EGF、FGF1、FGF2等をさらに結合することにより、コンドロイチン硫酸のみならず他の腫瘍抗原を結合することにより、より広範囲

な癌組織に対するターゲティングが可能となることと思われる。

8, DOTAP以外のやや弱い陽性荷電を有する脂質としては、DOTMA (N-(2,3-dioleoyloxy)propyl-N,N,N-trimethylammonium)、DD (didodecylammonium bromide)、DODAC (dioctadecyldimethyl ammonium chloride) DC-Chol (3-N-(N',N',-dimethyl-aminoethane)-carbamoyl cholesterol)、DMRIE (1,2-dimyristoyloxypropyl-3-dimethylhydroxyethyl ammonium)、DOSPA (2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminum trifluoroacetate)等があり、これらのアデノウイルス被覆による抗体による感染抑制の解除効果をAd-*gal*の発現、粒子径、電位、電子顕微鏡的検討により比較検討する。

9, 中性荷電脂質としてジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、コレステロール、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリン、セレブロシド等が挙げられ、これらのアデノウイルス被覆による抗体による感染抑制の解除効果を比較検討する。

4. 研究成果

陽性荷電のリポソームDOPE/DOTAP/EPCを作成し-*gal*発現アデノウイルスAd-*gal*を包埋し、抗アデノウイルス抗体存在下で-*gal*の発現を見ることにより、DOPE/DOTAP/EPCの至適配合比率を決定した。24 well dishにHEY細胞を20000/500ul/wellで撒き、抗アデノウイルス抗体存在下で3日間培養し、X-*gal*で染色し細胞のX-*gal*陽性率を検討した。溶媒について検討すると、水、5%糖液、10mM HEPES, 5%糖液+10mM HEPES等の比較を行うと、10mM HEPES+5%糖液が最も良好であった。リポソームDOPE/DOTAP/EPCについては、その比率を40%、55%、5%で8mMの濃度が最も良好な抗体存在下での感染効率を示した。量的比率に関しては、Ad-*gal*を1000MOI 15ulにリポソーム10ulを加えるのが最も良好であった。腫瘍特異性をを持たせるために、軟骨等の生体内物質のポリ

マーで、陰性荷電を有しその受容体が CD44 で腫瘍特異性を有するコンドロイチン硫酸を用いて検討した。Ad--gal/1000MOI 15ul-リポソーム 10ul にコンドロイチン硫酸 5mM を 1 ul 加えると、非添加時に比べ抗体存在下における感染効率が 10 倍に増加した。腫瘍特異性を有するヘパリン結合蛋白質である EGF、HB-EGF、FGF1、FGF2 等をさらに結合しても感染性は増加しなかった。コンドロイチン硫酸の陰性荷電は、生体内物質であるため弱く、リポソームの陽性荷電を十分に中和していない可能性があるため、さらに、強い陰性荷電を有するヘパリンの添加を行ったところ、さらに、感染効率が 3 倍増加した。

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 3 件)

1. Nosaki, K., Hamada, K., Takashima, Y., Sagara, M., Matsumura, Y., Miyamoto, S., Hijikata, Y., Okazaki, T., Nakanishi, Y., Tani, K. (2016) A novel, polymer-coated oncolytic measles virus overcomes immune suppression and induces robust antitumor activity. *Molecular Therapy — Oncolytics* 3, 16022; 査読有 doi:10.1038/mt.2016.22
2. Yasuoka, T., Hashimoto, H., Hamada, K., Fujioka, T., Nawa, A. (2014) Atypical carcinoid of the uterine cervix with aggressive clinical behavior: A case report. *Gynecologic Oncology Reports*. 7: 4-6. 査読有
3. Hamada, K., Shirakawa, T., Terao, S., Gotoh, A., Tani, K., Huang, W. (2014) Biosafety studies of carrier cells infected with a replication-competent adenovirus introduced by IAI.3B promoter. *Molecular Therapy--Methods & Clinical Development* 査読有 doi:10.1038/mtm.2014.19

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Nosaki, K., Takishima, Y., Sagara, M., Matsumura, Y.M., Miyamoto. S., Yang, J., Matsuura, K., Okazaki, T., Inoue, H., Nakanishi, Y., Hamada, K., Tani, K. Novel polymer-coated oncolytic measles virus overcomes immune suppression and induces robust antitumor activity. 第 22 回日本遺伝子細胞治療学会、2016 年 7 月 28-30 日、虎ノ門ヒルズフォーラム、東京都港区
2. Miyamoto, K., Nozaki, K., Sagara, M., Takishima, Y., Wang, B., Yang, J., Matsuura, K., Yotsuya, R., Inoue, H., Yamada, K., Kohara, H., Ogata H., Hamada, K., Tani, K. Development of new oncolytic virotherapies for malignancies. 第 22 回日本遺伝子細胞治療学会、2016 年 7 月 28-30 日、虎ノ門ヒルズフォーラム、東京都港区
3. Hamada, K., Takagi, K., Sugiyama, T. Improvement of antitumor activity in intraperitoneal ovarian cancer model by a noble cloned carrier cell infected with oncolytic adenovirus. 19th Annual Meeting of ASGCT, May 4- May 7, 2016. Washington, D.C. USA Molecular Therapy Volume 24, Supplement 1, May 2016, S166-S167.
4. 濱田雄行, 高木香津子, 杉山隆. 癌遺伝子治療のための新規キャリアー細胞のクローニング. 第 68 回日本産婦人科学会総会、2016 年 4 月 21~24 日、東京国際フォーラム、東京都千代田区
5. Nosaki, K., Hamada, K., Takishima, Y., Sagara, M., Matsumura, Y., Miyamoto, S., Okada, M., Hijikata, Y., Okazaki, T., Yamada, K., Inoue, H., Nakanishi, Y., Tani, K. Novel Polymer-Coated Stealth Oncolytic Measles Virus Overcame Immune Suppression and Induced Stronger Antitumor Activity. 18th Annual Meeting of ASGCT, May 13 - May 16, 2015 New Orleans, LA USA.
6. Hamada, K., Takagi, K., Itoh, H., Tani, K., Nawa, A. Biosafety after the injection of carrier cells infected with oncolytic adenovirus. 18th Annual Meeting of ASGCT, May 13 - May 16, 2015 New Orleans, LA USA. *Molecular Therapy Volume 23, Supplement 1, May 2015 S173.*
7. 高木香津子, 濱田雄行, 那波明宏. 腫瘍溶解性アデノウイルスの免疫原性克服のためのコンドロイチン硫酸ポリマー多重

- 皮膜加工の電子顕微鏡的検討． 第 67 回日本産婦人科学会総会、2015 年 4 月 9 ~ 12 日、パシフィコ横浜、横浜市西区
8. 高木香津子, 濱田雄行, 那波明宏. 腫瘍溶解性アデノウイルスの免疫原性克服のためのコンドロイチン硫酸ポリマー多重皮膜加工の電子顕微鏡的検討． 第 67 回日本産婦人科学会総会、2015 年 4 月 9 ~ 12 日、パシフィコ横浜、横浜市西区
9. Hamada, K., Takagi, K., Huang, W., Itoh, H., Tani, K., Nawa, A. Biodistribution of oncolytic adenovirus after the injection of carrier cells infected with oncolytic adenovirus. ASGCT 17th Annual Meeting. Washington DC USA. 19-24, May 2014. Molecular Therapy Volume 22, Supplement 1, May 2014. S30.
10. 濱田雄行, 高木香津子, 佐々悠木子, 伊藤博, 那波明宏. オンコリティックアデノウイルス感染キャリアー細胞による癌遺伝子治療の安全性試験．第 66 回日本産婦人科学会学術講演会、東京国際フォーラム、東京都千代田区 2014 年 4 月 18 ~ 20 日
11. 高木香津子, 濱田雄行, 那波明宏. ポリエチレンイミンおよびコンドロイチン硫酸ポリマー多重加工人工皮膜を用いた腫瘍溶解性アデノウイルスによる卵巣癌に対する遺伝子治療の効果．第 66 回日本産婦人科学会学術講演会、東京国際フォーラム、東京都千代田区 2014 年 4 月 18 ~ 20 日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：新規細胞、それを用いた抗腫瘍効果の誘導剤、癌の遺伝子治療用医薬および抗腫瘍効果の誘導方法。

発明者：濱田雄行

権利者：同上

種類：特願

番号：2015-195741 号

公開年月日：平成 27 年 11 月 9 日

国内外の別：国内

名称：麻疹ウイルスの精製方法、ポリマー修飾麻疹ウイルスの製造方法、及び麻疹ウイルス精製物。

発明者：濱田雄行、滝島佑人、谷憲三朗。

権利者：株式会社アニマルステムセル

種類：特願

番号：2016-090159 号

出願年月日：平成 28 年 4 月 28 日

国内外の別：国内

取得状況(計 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 雄行 (Hamada, Katsuyuki)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90172973

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし