

令和元年6月7日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05481

研究課題名(和文) 増殖制限型アデノウイルスベクターを用いた頭頸部癌に対する新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Midkine-Promoter based Conditionally Replicative Adenovirus expressing siRNA against EGFR for Head and Neck Cancer

研究代表者

丹生 健一 (Nibu, Ken-ichi)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：20251283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：MidkineはHeparin-binding growth factorの一種で、頭頸部扁平上皮癌を含め多くの癌で高発現しているが、成人の正常組織ではほとんど発現がみられない。この特性を活かし、今回、我々はMidkineをプロモーターとしてウイルスの増殖に必要なE1A・E1B遺伝子を組み込んだ制限増殖型アデノウイルスを作成し、更に、このウイルスに頭頸部扁平上皮癌に高発現している上皮成長因子受容体Epidermal growth factor receptor (EGFR)に対するsmall interfering RNA (siRNA)の遺伝子を組み込んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回我々はMidkineプロモーターをつけて腫瘍特異的に増殖する制限増殖型アデノウイルスAd-MKを作成し、さらにこのアデノウイルスに頭頸部扁平上皮癌に高発現している上皮成長因子受容体EGFRに対するsiRNAの遺伝子を組み込んだAd-MKsiEGFRを作成した。in vitroではAd-MK、Ad-MKsiEGFRともに頭頸部癌細胞の増殖を著明に抑制できた。Ad-MKsiEGFRのsiRNAの効果もmRNAおよび蛋白レベルで確認でき、2重の抗腫瘍効果が確認された。本方法は、再発率が高く予後不良である進行性頭頸部癌の新たなより効果的な治療の開発に向けた基礎的な研究となった。

研究成果の概要(英文)：Background: Epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs). Midkine expression is restricted in adult tissues, but is increased in several malignant tumors, including HNSCCs. Here we evaluated the antitumor effect of Midkine-promoter based conditionally replicative adenovirus expressing siRNA against EGFR for targeting HNSCCs expressing Midkine. Methods: A conditionally replicative adenovirus vector controlled by the Midkine promoter, Ad-MK-siEGFR, was generated by integrating gene-expressing siRNA against EGFR. Antitumor effect of Ad-MK-siEGFR was tested in vitro using established HNSCC cell line, T891 with strong Midkine expression. Results: Expression of EGFR in T891 infected with Ad-MKsiEGFR was significantly lower than that of T891 infected with control. Cytotoxicity assays showed significant growth suppression of Ad-MK-siEGFR in T891 cells.

研究分野：耳鼻咽喉科頭頸部外科

キーワード：頭頸部癌 Midkine EGFR siRNA 制限増殖型アデノウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭頸部は視覚・聴覚・平衡覚・嗅覚・味覚などの感覚、音声言語によるコミュニケーション、呼吸・摂食・嚥下など様々な役割を担っており、頭頸部に発生した悪性腫瘍に対して、癌の根治とともにこれらの機能(Quality of Life: QOL)の維持が求められる。この命題を両立させるために、長年に亘り手術・放射線療法・化学療法を組み合わせた様々な集学的治療が開発され、QOLの観点からは大きな進歩がみられた。しかし、依然として進行期の生存率に有意な改善はみられない。近年、この現状を打破するために癌の増殖・浸潤・転移に関わる様々な分子標的薬が登場し、頭頸部扁平上皮癌に対しても使用可能となってきた。しかし、これらの薬剤には間質性肺炎や制御困難な高血圧、粘膜皮膚病変、出血などこれまでの化学療法薬にはない全身的な副作用が問題となっており、腫瘍特異的に効果を発揮する「より安全で効果的な治療薬」の登場が望まれる。

2. 研究の目的

Midkine は Heparin-binding growth factor の一種で、頭頸部扁平上皮癌を含め多くの癌で高発現しているが、成人の正常組織では、ほとんど発現がみられない。この特性を活かし、今回、我々は Midkine をプロモーターとしてウイルスの増殖に必要な E1A・E1B 遺伝子を組み込んだ制限増殖型アデノウイルスを作成し、更に、このウイルスに頭頸部扁平上皮癌に高発現している上皮成長因子受容体 Epidermal growth factor receptor (EGFR) に対する small interfering RNA (siRNA) の遺伝子を組み込んだ。本ウイルスは、Midkine を高発現する腫瘍細胞でのみ特異的に増殖して腫瘍を殺傷するとともに、EGFR の発現を抑制することにより腫瘍の増殖を抑制する能力を併せ持つことが期待できる。Midkine を高発現している頭頸部扁平上皮癌培養細胞を用いて、その抗腫瘍効果を *in vitro* で検討した。

3. 研究の方法

1) 培養細胞

Midkine の発現量が高い頭頸部癌細胞である T891(ヒト舌癌細胞)、および既に Midkine の発現量が高いと報告されている A549(ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞)を使用した。組換えアデノウイルスの作製および増殖のため、HEK293 細胞(ヒト胎児腎細胞 293)を使用した。

2) アデノウイルスベクター

Midkine をプロモーターとしてウイルスの増殖に必要な E1A・E1B 遺伝子を組みこんだ制限増殖型アデノウイルス(Ad-MK)を作成し、更に、このウイルスに EGFR に対する siRNA の遺伝子を組み込んだ制限増殖型アデノウイルス Ad-MKsiEGFR を作製した。ネガティブコントロールとして LacZ 遺伝子(ガラクトシダーゼ)を組み込んだ非制限増殖型アデノウイルスである Ad-LacZ を用いた。

3) EGFR と Midkine の発現量

T891 および A549 の EGFR および Midkine の mRNA の発現量を定量的リアルタイム PCR (RT-PCR) によって測定した。Ad-MK と Ad-MKsiEGFR を 10MOI の濃度で感染させた T891 および A549 から、2 日後に total RNA を抽出し、EGFR と Midkine の mRNA の発現量を同様に分析した。ウイルスを感染させていない細胞の EGFR 発現量をコントロールとした。EGFR のタンパク量は、各アデノウイルス 10MOI、20MOI で感染させ、1 日および 4 日後にタンパク抽出しウエスタンブロッティング法を用いて解析した。

4) 細胞傷害性の測定

クリスタルバイオレット法では、Ad-MK-siEGFR、Ad-MK、Ad-LacZ、各アデノウイルスをそれぞれ 1MOI、10MOI で感染させ、4 日後にクリスタルバイオレットを用いて生き残った細胞を染色した。AlamarBlue® assay では 96 ウェルプレートを用いて培養した細胞に Ad-MK-siEGFR、Ad-MK および Ad-LacZ を 10、20MOI で感染させ 0, 1, 2, 4, 6 日後の吸光度を測定した。

4. 研究成果

1. EGFR の siRNA の効率

まず、A549 および T891 の Midkine 発現量が高いこと、A549、T891 とともに EGFR の発現を認めることを確認した。次に、T891 に 10MOI の Ad-MK、Ad-MKsiEGFR を感染させ、感染なしのコントロール群と比較した。コントロールと比較し 2 群の EGFR mRNA 発現量は有意に低下しており、Ad-MKsiEGFR 感染群では、Ad-MK 感染群よりも有意に低かった ($p = 0.039$)。次に EGFR タンパクの発現を検討した。アデノウイルス感染後 1 日目は各群間に明らかな差は認めなかったが、4 日目では感染なしのコントロール群では EGFR タンパクの発現が増加していたのに対し、Ad-MK および Ad-MKsiEGFR 感染群では EGFR タンパクの発現が著明に減少していた。

2. 細胞傷害性

T891 に Ad-MK、Ad-MKsiEGFR および Ad-LacZ を 1、10MOI で感染させた。4 日後、細胞をクリスタルバイオレットで染色した。Ad-MK および Ad-MKsiEGFR は、10MOI で T891 細胞を著明に死滅させた。特に Ad-MKsiEGFR は 1MOI でも部分的に死滅させた。Ad-LacZ は 10MOI であっても T891 細胞への細胞傷害性は認めなかった。AlamarBlue® assay では 4 日目に Ad-LacZ 感染群および感染なしのコントロール群では著明に細胞増殖していた。一方 Ad-MKsiEGFR 群、Ad-MK 群は 4 日目で、ともに細胞数の減少を認め、Ad-MKsiEGFR 群では Ad-MK 群と比較しても細胞数が有意に抑制された。(2 日目: $p = 0.005$ 、4 日目: $p = 0.009$)

以上より、本アデノウイルスベクターは、Midkine を高発現する腫瘍細胞でのみ特異的に増殖して腫瘍を殺傷するとともに、EGFR の発現を抑制することにより腫瘍の増殖を抑制する能力を併せ持つことが確認できた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 4 件)

1: Teshima M, Tokita K, Ryo E, Matsumoto F, Kondo M, Ikegami Y, Shinomiya H, Otsuki N, Hiraoka N, Nibu KI, Yoshimoto S, Mori T. Clinical impact of a cytological screening system using cyclin D1 immunostaining and genomic analysis for the diagnosis of thyroid nodules. BMC Cancer. 2019;19(1):245.

2: Yoneda T, Kunita N, Kitagawa K, Fukui Y, Saito H, Narikiyo K, Ishiko M, Otsuki N, Nibu KI, Fujisawa M, Serada S, Naka T, Shirakawa T. Overexpression of SOCS3 mediated by adenovirus vector in mouse and human castration-resistant prostate cancer cells increases the sensitivity to NK cells in vitro and in vivo. Cancer Gene Ther. 2019 [Epub ahead of print]

3: Kojima Y, Otsuki N, Kubo M, Kitamoto J, Takata E, Saito H, Kosaka K, Morishita

N, Uehara N, Shirakawa T, Nibu KI. Adenovirus-mediated transfer of HPV 16 E6/E7 antisense RNA combined with cisplatin inhibits cellular growth and induces apoptosis in HPV-positive head and neck cancer cells. Cancer Gene Ther. 2018;25:274-283.

4: Avincsal MO, Jimbo N, Fujikura K, Shinomiya H, Otsuki N, Morimoto K, Furukawa T, Morita N, Maehara R, Itoh T, Nibu KI, Zen Y. Epigenetic down-regulation of SOX2 is an independent poor prognostic factor for hypopharyngeal cancers. Histopathology. 2018;72(5):826-837.

[学会発表] (計 1 件)

丹生健一 宿題報告「頭頸部癌の治療の最適化 -根治とQOLの両立を目指して-」第120回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 令和元年5月10日 大阪

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ: <http://www.med.kobe-u.ac.jp/jibi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 大月直樹

ローマ字氏名: (OTSUKI, naoki)

所属研究機関名: 神戸大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 40343264

研究分担者氏名: 上原奈津美

ローマ字氏名: (UEHARA, natsumi)

所属研究機関名: 神戸大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 助教

研究者番号(8桁): 40570502

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 白川利朗

ローマ字氏名: (SHIRAKAWA, toshiro)