

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21639

研究課題名(和文)腫瘍融解性アデノウイルスとチロシンキナーゼ阻害剤の併用による抗腫瘍効果の解析

研究課題名(英文)An effect of the combination of oncolytic adenoviruses and a tyrosine-kinase inhibitor.

研究代表者

盛永 敬郎(Morinaga, Takao)

千葉県がんセンター(研究所)・がん治療開発グループ・研究員

研究者番号：30757000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫は難治性疾患であり、従来の作用機序とは異なる画期的治療法の開発が急務である。我々は、当該腫瘍に対する腫瘍融解性アデノウイルスの有効性に注目し、抗腫瘍活性を高めるために薬剤との併用療法を研究した。本研究により、Wee1キナーゼ阻害薬を併用することで当該ウイルスの複製量が腫瘍特異的に高まりアポトーシスによる細胞死が増強されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Malignant mesothelioma is an intractable disease; thereby, development of innovative new drugs, which has a non-traditional strategy for cancer treatment is required. We focused on effectiveness of oncolytic adenoviruses on mesothelioma and further explored a drug that can strengthen the antitumor effect of the viruses. Our results suggested that a Wee1 kinase inhibitor could enhance the replication of adenoviruses and augment the cytotoxicity induced by the viruses through the apoptotic pathway.

研究分野：分子腫瘍生物学

キーワード：悪性中皮腫 遺伝子治療 アデノウイルス チロシンキナーゼ 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫は、化学療法、放射線療法に耐性の難治性疾患である。さらに、主な原因である石綿はアジアを中心とした国々で使用が継続しており、当該患者が今後経済新興国を中心に増大すると予測されている。したがって、悪性中皮腫に対する効果的な治療法の開発は急務である。

野生型アデノウイルスは強力な細胞死誘導能を有する。この細胞死誘導をがん治療に利用するために、腫瘍での発現レベルが高い遺伝子(サバイビン、ミッドカイン)のプロモータ領域を用いて同ウイルス増殖に必須の初期応答遺伝子の発現を制御する腫瘍融解性アデノウイルス(Ad-Sur、Ad-MK)を作成し、ヒト悪性中皮腫細胞株に使用したところ、検討に用いた8種類の細胞株で増殖し、細胞死を誘導した。したがって、従来とは作用機序が全く異なる悪性中皮腫の治療法として、腫瘍融解性アデノウイルスは有用である可能性が示された。

アデノウイルスは細胞死を誘導する一方で、複製力を維持するために早期の細胞死誘導を抑制する機構をも併せ持っており、宿主のシグナル伝達に複雑な影響を与えている。特に細胞の生存や細胞周期進行に影響を与える非受容体型チロシンキナーゼの一部は、アデノウイルスによる細胞死に深く関わっているものがあることが報告されている。

2. 研究の目的

(1)「ウイルスのアポトーシス誘導に関わる非受容体型チロシンキナーゼの特定」

アデノウイルスによる細胞死誘導には様々なシグナル伝達に関わっているが、その一つにアポトーシスがある。そこで、siRNAライブラリーを用いて、当該ウイルスによるアポトーシス誘導を指標に細胞死誘導に関わる非受容体型チロシンキナーゼの特定を目指す。特定されたキナーゼの阻害剤とアデノウイルスとを併用して、同様の効果が見られるか否かを検討する。

(2)「非受容体型チロシンキナーゼ阻害剤とアデノウイルスの併用によるアポトーシス増強の分子機構を解明する」

(1)で特定した非受容体型チロシンキナーゼの阻害剤をアデノウイルスと併用した際に、どのような分子機構でアポトーシスが増強したのかを調べる。主に、阻害剤によるアポトーシス誘導機構に対してアデノウイルスが与えた影響と、これとは逆に、アデノウイルスのアポトーシス誘導機構に阻害剤が与えた影響をそれぞれ解析する。分子機構が明らかになれば、関連する他の阻害剤でも併用効果が見られるか否かを検討する。

(3)「非受容体型チロシンキナーゼ阻害剤とアデノウイルスの併用による治療効果を検討する」

細胞死の誘導にはアポトーシスだけでなく様々な分子機構が関わっている。当該ウイルスと阻害剤の併用によるアポトーシスの誘導が実際に抗腫瘍活性の増強に結びついているか否かを検討する。

3. 研究の方法

(1) 研究の目的(1)について:

過去の論文やデータベースから悪性中皮腫での発現が期待される20種類の非受容体型チロシンキナーゼについて、siRNAライブラリーを作成した。悪性中皮腫細胞MSTO-211Hに当該siRNAを導入し、Ad-Surに感染させた後に、細胞を回収し、ウェスタンブロット法でアポトーシスのマーカーであるクリープドカスパーゼ-3及びウイルス分子の発現レベル等を解析した。

の結果、特定されたキナーゼについては、ライブラリーとは別に複数種類のsiRNAを用いて確認すると共に、抗腫瘍薬として開発中の特異的阻害剤が存在していたため、この阻害剤も用いてアポトーシスの増強が見られることを確認した。アポトーシスの解析には上記ウェスタンブロット法に加えて、イメージサイトメータを用いたAnnexin Vの染色及び、フローサイトメトリーを用いたSubG1画分の解析も行った。

(2) 研究の目的(2)について:

(1)で特定されたチロシンキナーゼの阻害剤は、G2-M期に細胞を集積させ、M期異常による細胞死(MC: Mitotic catastrophe)を誘導することが報告されていた。アデノウイルスはM期チェックポイントに影響を与えることが先行研究で示されていたため、ウイルスと当該阻害剤によるMCへの影響を調べた。MCについてはウェスタンブロット法、フローサイトメトリーを使用して、M期マーカーであるリン酸化ヒストンH3の上昇が見られるか、あるいはカスパーゼ-2の分解が見られるかを調べた。また、M期マーカー陽性細胞の染色体の形態を共焦点レーザー顕微鏡で解析し、MCの割合を調べた。

Ad-Surは増殖型ウイルスであるので、当該阻害剤がウイルス複製量の変化を介してアポトーシスを増強するか否かを調べた。ウイルス複製量の評価には、ウイルス分子ヘキソン及びE1Aの発現レベルの解析、複製されたウイルスによる細胞変性効果(TCID50: tissue culture infectious dose)の解析、ウイルスゲノムを標的としたPCR法での解析を行った。

ウイルス分子ヘキシソンの発現量解析には主にウェスタンブロット法を用いたが、この方法で検出できるシグナルレベルが低く、解析が困難であったため、イメージサイトメト

リーによる検出も併用した。イメージサイトメトリーによるヘキソン発現量の解析はこれまで十分な実績が無かったため、予めウェスタンブロット法と比較して、問題なく評価に使用できることを確認した。

の解析で、当該阻害薬がアデノウイルスの複製量を増加させることが示唆されたため、G2-M 期の制御に関連する複数の薬剤も用いて、アポトーシス及びウイルス複製量の解析を行った。

(3) 研究の目的(3)について:

抗腫瘍活性の評価については、WST アッセイ及びトリパンブルー染色による生細胞の評価を行った。

ウイルス複製量が増加し、複製されたウイルスによる細胞傷害活性の評価が必要であったため、ウイルスに感染した細胞の培養上清からウイルスを回収し、これを限界希釈しながら、と同様に細胞傷害活性を評価した。

4. 研究成果

(1) 研究の目的(1)について:

検討した 20 種類のキナーゼの中で、細胞周期制御に関わる Wee1 キナーゼのノックダウンにより、Ad-Sur によるアポトーシスが亢進した。この結果について、Wee1 キナーゼの阻害剤(MK-1775)を用いて解析し直した。ライブラリーでの解析に用いた MST0-211H 細胞では併用によるアポトーシス増強が検出しづらかったが、中皮由来の不活化細胞 MeT5A では評価に用いた全ての実験系でウイルス単独使用に比べて明らかにアポトーシスが亢進した。MeT5A 細胞では、新たに作成した siRNA による検証試験でもアポトーシスが増強した。

(2) 研究の目的(2)について:

MK-1775 の処理により、M 期割合の増加と、アポトーシスが見られた。また、M 期細胞の染色体の形態観察から、MK-1775 処理下では M 期にある細胞のおよそ半分でアポトーシスも誘導されていることが示唆された。これらの結果は MC の誘導を示唆している。しかし、ウイルスと MK-1775 の併用は、MK-1775 単独使用に比較して、M 期細胞の割合や M 期細胞中のアポトーシス細胞の割合を増加させなかった。従って、ウイルスと MK-1775 の併用は MC の誘導とは別にアポトーシスを増強させることが示唆された。

一方で、ウイルスの複製量をウイルス感染後 11 日目までウェスタンブロット法で経時的に観察したところ、4 日目以降は MK-1775 の併用によりウイルス分子ヘキソン発現量が増加していた。ウイルス感染後 9 日目を中心に詳細に解析すると、TCID50、PCR 法のどちらも、ウイルス複製量の増加を裏付けた。

また、MK-1775 は G2-M 期の割合を増加させることから、G2-M 期に関連する CDK1 阻害剤(R0-3306)、Plk-1 阻害薬(volasertib)、Aurora kinase A 阻害薬(Alisertib) も用いたところ、これら全てでウイルス分子ヘキソンの発現上昇とアポトーシスの亢進が見られた。

以上の結果から、Ad-Sur と MK-1775 の併用は宿主細胞を G2-M 期に同調することで、ウイルスの複製量を増やして、アポトーシスを介した細胞死を増強することが示唆された。

(3) 研究の目的(3)について:

ウイルスと MK-1775 を併用すると、顕微鏡下では顕著に細胞数が減少しているにもかかわらず、WST アッセイでは細胞数が増加しているかのような結果となった。WST は培地中の pH や酸化還元反応の影響を受けて、正しい結果を示さないことがあるため、トリパンブルーを用いた評価に切り替えた。トリパンブルーを用いた評価ではウイルスと MK-1775 の併用は、それぞれを単独で使用した場合に比べて細胞数を有意に減少させた。

ウイルスに感染した細胞に MK-1775 が作用してウイルスを増加させ、周辺の腫瘍細胞に対してさらに抗腫瘍活性を示すか否かを評価したところ、MK-1775 を併用したウイルスを含む培養上清には強力な抗腫瘍活性が見られた。

興味深いことに、MK-1775 を併用することでウイルスの抗腫瘍活性が高まるのは実験に用いた 8 細胞株の中では、p53 に変異を持つ細胞株のみであった。また、p53 が野生型の細胞株に対して、p53 をノックダウンすると p53 変異型の細胞株と同様に、MK-1775 の併用によって抗腫瘍活性が飛躍的に高まった。このことは、MK-1775 とアデノウイルスの併用は p53 に変異のある腫瘍に対する選択性を高める可能性を示唆している。

研究成果のまとめと今後の展望:

ウイルスと薬剤を併用することによる抗腫瘍活性の増強に関しては、これまでに免疫抑制薬などが研究されてきた。一方で、免疫を抑制することはウイルスの腫瘍に対する特異性を損なう可能性が指摘されてきた。本研究により、Wee1 キナーゼの阻害剤が腫瘍融解性アデノウイルスの複製量を腫瘍内で増加させ、強力なアポトーシスを誘導することが示唆された。この薬剤の併用は p53 変異細胞で選択的に抗腫瘍活性を高めるため、正常細胞への副作用を抑制できると予想している。胸腔内に腫瘍を形成する悪性中皮腫細胞株として p53 正常型の細胞株しか持っていなかったため in vivo 試験が遅れていたが、CRISPR/Cas9 を用いて p53 をノックアウトした細胞株を樹立して in vivo 試験を行うことを計画している。悪性中皮腫においても p53 の変異は予後不良因子として報告があり、

この標的に対する治療法として今後の研究を進めていきたい。

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)

Morinaga, T. and Tagawa, M. (筆頭著者、9 名省略) An image cytometric technique is a concise method to detect adenoviruses and host cell proteins and to monitor the infection and cellular responses induced. *Virol. J.*, 14: 219, 2017, DOI: 10.1186/s12985-017-0888-0、査読あり

Morinaga, T., Yanase, S., Okamoto, A., Yamaguchi, N. and Yamaguchi, N. Recruitment of Lyn from endomembranes to the plasma membrane through calcium-dependent cell-cell interactions upon polarization of inducible Lyn-expressing MDCK cells. *Sci. Rep.*, 7: 493, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-00538-5、査読あり

Shimazu, K., Morinaga, T. and Tagawa, M. (3 番目、7 名省略) Metformin produces growth inhibitory effects in combination with nutlin-3a on malignant mesothelioma through a cross-talk between mTOR and p53 pathways. *BMC Cancer*, 17: 309, 2017. DOI: 10.1186/s12885-017-3300-y、査読あり

Jiang, Y., Morinaga, T. and Tagawa, M. (4 番目、8 名省略) Combination of a third generation bisphosphonate and replication-competent adenoviruses augments the cytotoxicity on mesothelioma. *BMC Cancer*, 16: 455, 2016. DOI: 10.1186/s12885-016-2483-y、査読あり

〔学会発表〕(計 7 件)

Takao Morinaga, Thi Thanh Thao Nguyen, Boya Zhong, Shuji Kubo, Ikuo Sekine, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima, Masatoshi Tagawa, A role of Wee1 kinase in adenoviruses-induced cell death and viral replication、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年

Boya Zhong, Ikuo Sekine, Yuichi Takiguchi, Thi Thanh Thao Nguyen, Takao Morinaga, Yuji Tada, Naoto Yamaguchi, Masatoshi Tagawa, Resistance to pemetrexed in mesothelioma is associated with up-regulated expression of AMP-activated protein kinase、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年

Thi Thanh Thao Nguyen, Boya Zhong, Takao Morinaga, Shuji Kubo, Ikuo Sekine, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima, Masatoshi Tagawa, A MDM2 inhibitor achieves synergistic cytotoxicity with oncolytic adenoviruses on mesothelioma with the wild-type p53、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年

Takao Morinaga, Thao Thi Thanh Nguyen, Boya Zhong, Shuji Kubo, Masato Shingyoji, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima, Masatoshi Tagawa, A Wee1 kinase inhibitor increases apoptosis of replication-competent adenoviruses through induction of mitotic catastrophe and enhancement of viral replications、第 23 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2017 年

Masatoshi Tagawa, Thao Thi Thanh Nguyen, Takao Morinaga, Boya Zhong, Michiko Hanazono, Shuji Kubo, Masato Shingyoji, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima, A MDM2 inhibitor augments cytotoxicity of oncolytic adenoviruses defective of E1B 55kDa molecules through enhancing DNA damages and apoptosis in mesothelioma、第 23 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2017 年

Takao Morinaga, Noritaka Yamaguchi, Masatoshi Tagawa, Naoto Yamaguchi, Cell adhesion changes the localization of Lyn tyrosine kinase、The 2016 ASCB Annual Meeting、2016 年

Takao Morinaga, Thi Thanh Thao Nguyen, Boya Zhong, Shuji Kubo, Ikuo Sekine, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima, Masatoshi Tagawa, Cell cycle promotion enhances apoptosis induced by replication-competent adenoviruses、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年

〔図書〕(計 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

なし

取得状況(計 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

盛永 敬郎 (MORINAGA, takao)

研究者番号 : 30757000

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし