

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08773

研究課題名(和文) 増殖型レトロウイルスベクターを用いた肺癌に対する新規遺伝子治療の開発

研究課題名(英文) Retroviral replicating vector-mediated gene therapy for lung cancer

研究代表者

平岡 圭 (Hiraoka, Kei)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：10719587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌に対する新しい治療法として本研究では増殖型レトロウイルスを用いたプロドラッグ活性化遺伝子治療の応用を試みた。このシステムでは、体内に投与されたプロドラッグ(抗真菌薬)がウイルス感染により遺伝子導入された癌細胞内で抗がん剤に変換され、選択的に癌細胞のみを破壊することが可能となる。研究の結果、培養肺癌細胞、及び動物実験モデルいずれにおいてもこの新たなウイルスベクターは高い効率で癌細胞に遺伝子を導入できることが確認され、さらにプロドラッグを投与することで強力な抗腫瘍効果が示された。安全性の面では、腫瘍以外の正常組織において検出されたウイルス感染は僅かであり制御可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって肺癌における増殖型レトロウイルスを用いたプロドラッグ治療システムが確立されれば、他のプロドラッグを本治療システムに応用した新規治療の開発が期待できるだけでなく、予後不良な他の難治性癌に対しても応用可能であり、本研究から期待される成果の適応範囲は極めて広範囲である。また、本研究で得られる有効性・安全性データは、肺癌に対する臨床試験へ向けた前臨床研究へと展開が可能であり、北海道大学や北海道臨床開発機構を始めとする関連機関との連携を図りながら環境整備を進めることで、国内臨床試験の速やかな導入が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the application of prodrug-activator gene therapy mediated by a retroviral replicating vector (RRV) was attempted as a new therapeutic approach for lung cancer. With this system, a prodrug (antifungal drug) administered into the body is converted into an anticancer drug inside the cancer cells infected with a viral vector and transduced with a therapeutic gene, and selectively destroys only the cancer cells. As a result of this study, it was confirmed that this newly developed viral vector can transduce therapeutic genes into cancer cells efficiently in both cultured human lung cancer cells and orthotopic animal experimental models, and systemic administration of a prodrug showed a strong cell-killing effect and resulted in significant inhibition of tumor growth. In terms of safety, there was no evidence of uncontrollable spread of RRV to adjacent normal organs or tissues.

研究分野：医歯薬学 外科系臨床医学 外科学一般

キーワード：レトロウイルス プロドラッグ 肺癌 遺伝子治療 ウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌の治療の現状

近年、外科治療の進歩、および分子標的薬や免疫治療薬の登場により肺癌治療は大きく変化しているが、いまだ我が国の悪性新生物死亡者数において肺癌は第1位であり、治療成績のさらなる向上が急務である。

当教室はこれまで、様々な固形癌に対する新規治療法の一つとして新たな癌遺伝子治療法の開発に取り組んでおり、動物実験モデルで腫瘍縮小効果を示してきたが (Hase et al. Clin Cancer Res 2005, Uehara et al. Cancer Res 2004)、未だ臨床応用には至らず、新規治療法の開発に力を注いでいる。

(2) 肺癌に対する遺伝子治療

これまでの主流であった非増殖型ウイルスを用いた遺伝子導入法では、ウイルス感染はほとんど腫瘍内で浸透せず、ウイルス自体が腫瘍選択性を持たないという弱点があった。

この遺伝子導入効率の低さにより、非増殖型アデノウイルスを用いた肺癌に対する臨床試験でも、極めて高力価のウイルスベクターを投与したにもかかわらず、その抗腫瘍効果は限定的であった。

(3) 増殖型ウイルスベクターの使用

優れた腫瘍選択性：新たに開発された増殖型のウイルスベクターを用いれば、癌細胞に特異的に遺伝子を導入することが可能となる。

高い遺伝子導入効率：非細胞破壊性の増殖型ウイルスベクターと低毒性の遺伝子産物を選択することで、高い遺伝子導入効率を得られる。

(4) プロドラッグ活性化システム的应用

細胞内に発現させたシトシン脱アミノ酵素が抗真菌薬 (5-Fc; フルオロシトシン) を抗がん剤 (5-FU; フルオロウラシル) に変換させることによって抗腫瘍効果を得るシステムである。(図1)

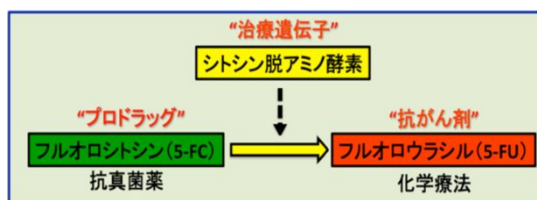


図1

副作用の少ない薬物 (プロドラッグ) を高用量で投与できる。

癌細胞内でのみ、抗がん剤に変換されるため、いわゆる“選択的腫瘍細胞内抗癌剤治療”を用いた新しい肺癌治療を可能とする。

わずかに正常分裂細胞に遺伝子が組み込まれた場合でも、プロドラッグの投与により細胞死をきたすため、組み込み遺伝子による二次癌の可能性はきわめて低くなる。

2. 研究の目的

(1) 肺癌に対するプロドラッグ活性化遺伝子治療を応用した新規治療法の開発

プロドラッグシステムと増殖型レトロウイルスによる遺伝子発現システムを併用し、肺癌における高い遺伝子導入効率と腫瘍選択性を両立した新規治療法を確立することとした。

(2) 臨床応用への可能性の模索

本システムの有効性、安全性を検討するために、肺癌動物モデルを作製し、前臨床実験を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子組換え実験の体制整備

ウイルスベクターを用いた遺伝子組換え実験に必要な施設環境整備を行った。

(2) ウイルスベクターの産生

プロウイルス配列を含むプラスミドを用いて、遺伝子導入によりウイルスベクターを産生、回収、保存した。

(3) 培養肺癌細胞株におけるウイルスベクターの増殖能と遺伝子導入効率の検討

ヒトおよびマウス肺癌細胞株を用いた細胞実験系において、フローサイトメトリーを用いて感染細胞数を計測しウイルスベクターの増殖能と遺伝子導入効率を評価した。

ヒトおよびマウス肺癌細胞株を用いた細胞実験系において、ゲノム定量 PCR を用いてウイルスコピー数を計測しウイルスベクターの増殖能と遺伝子導入効率を評価した。

(3) ウイルスベクターにより遺伝子導入された培養肺癌細胞株におけるプロドラッグ投与による殺細胞効果の検討

ウイルスベクターを感染させ遺伝子導入されたヒトおよびマウス培養肺癌細胞株にプロドラッグを投与し、MTS アッセイを用いて殺細胞効果を計測した。

(4) 肺癌細胞移植動物モデルにおけるウイルスベクターの増殖能、遺伝子導入効率の評価

ヒトおよびマウス肺癌細胞株それぞれによるマウス皮下移植モデルを作製した。

ウイルスベクターを感染させた皮下腫瘍を数日後に摘出し、分離した腫瘍細胞内の遺伝子導入効率をフローサイトメトリーを用いて計測した。

(4) 動物モデルによる肺癌治療実験(前臨床実験)の施行

ウイルスベクターを感染させたマウス皮下腫瘍移植モデルを作製し、プロドラッグを投与した後に腫瘍径の変化を経時的に計測した。

ウイルスベクターを感染させたマウス肺癌同所移植(胸膜播種)モデルを作製し、IVIS 生体イメージングシステムを用いてプロドラッグ投与後の腫瘍シグナルの変化を経時的に測定した。

安全性試験として、ウイルスベクターを感染させた肺癌細胞をマウスに移植し、ウイルス遺伝子の生体内分布をゲノム定量 PCR を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子組換え実験準備

ウイルスベクターを用いる遺伝子組換え実験に必要な施設承認を取得した。

(2) ウイルスベクターの産生

ウイルスベクター産生プラスミドを用いて遺伝子導入により目的のウイルスベクターを産生した。

(3) 培養ヒトおよびマウス肺癌細胞株におけるウイルスベクターの増殖能と遺伝子導入効率の検討

肺癌細胞株を用いた細胞実験系において、フローサイトメトリーを用いて遺伝子導入細胞数を計測し、ウイルスの速やかな増殖と高い遺伝子導入効率を確認した。(図2)

肺癌細胞株を用いた細胞実験系において、ゲノム定量 PCR を用いてウイルスコピー数を計測し、ウイルスの速やかな増殖と高い遺伝子導入効率を確認した。

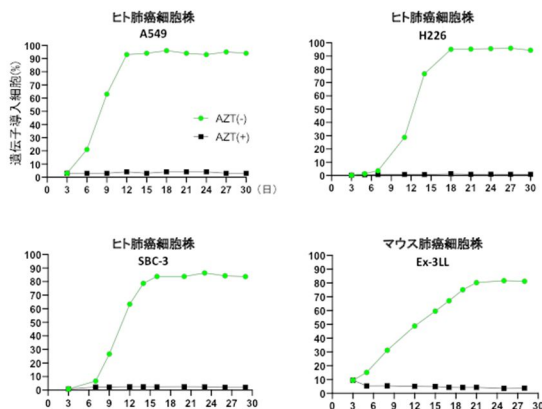


図 2

(4) ウイルスベクターにより遺伝子導入された肺癌細胞株におけるプロドラッグ投与による殺細胞効果の検討

ウイルスベクターを感染させた培養ヒトおよびマウス肺癌細胞株では、プロドラッグ投与により強力な殺細胞効果を確認することができた。

(5) 肺癌細胞移植モデルにおけるウイルスベクター増殖能、遺伝子導入効率

ヒトおよびマウス肺癌細胞株それぞれによる皮下腫瘍移植マウスモデルを作製することができた。

ウイルスベクターを感染させた皮下腫瘍を摘出して導入遺伝子発現細胞数を計測したところ、速やかな遺伝子導入率の増加が認められた。

(6) 動物による肺癌治療実験(前臨床実験)の施行

ウイルスベクターを感染させたマウス皮下腫瘍移植モデルでは、プロドラッグ投与により皮下腫瘍径の縮小が認められた。(図3)

ほとんどの腫瘍はほぼ完全消失を示した。

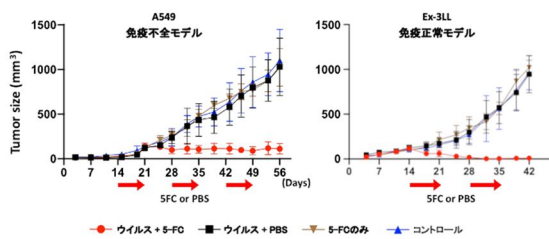


図 3

ウイルスベクターを感染させたマウス肺癌同所移植（胸膜播種）モデルにおいて、IVIS 生体イメージングシステムを用いた計測により、プロドラッグ投与による腫瘍シグナルの経時的な低下が認められた。

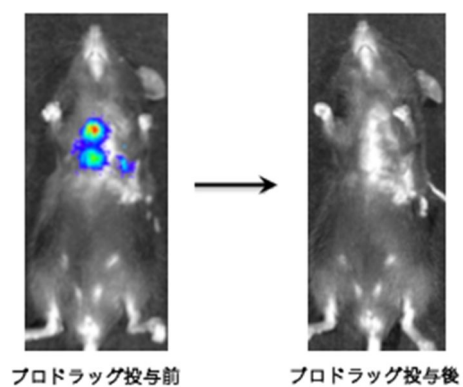


図 4

免疫能を有するマウスでは、正常臓器におけるウイルスの非特異的な感染は微量であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木友啓、平岡 圭、猪子和穂、稲垣亮仁、佐々木勝則、櫛谷洋樹、梅本一史、佐藤 理、中村 透、土川貴裕、七戸俊明、平野 聡ほか
2. 発表標題 Therapeutic Activity of Gene Therapy with Toca 511 & Toca FC for Esophageal Cancer
3. 学会等名 ASGCT 22nd Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫛谷洋樹、平岡 圭、猪子和穂、稲垣亮仁、鈴木友啓、佐々木勝則、中村 透、土川貴裕、七戸俊明、平野 聡ほか
2. 発表標題 Therapeutic Activity of Gene Therapy with Toca 511 & Toca FC for Lung Cancer.
3. 学会等名 第25回日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫛谷洋樹、平岡 圭、鈴木友啓、猪子和穂、稲垣亮仁、丹羽弘貴、佐々木勝則、中村 透、土川貴裕、七戸俊明、平野 聡ほか
2. 発表標題 Therapeutic activity of prodrug activator gene therapy with Toca 511 in experimental models of lung cancer.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 雅道 (Takahashi Masamichi) (10436454)	国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医長 (82606)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平野 聡 (Hirano Satoshi) (50322813)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	土川 貴裕 (Tsuchikawa Takahiro) (50507572)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	
研究分担者	七戸 俊明 (Shichinohe Toshiaki) (70374353)	北海道大学・医学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	中村 透 (Nakamura Toru) (70645796)	北海道大学・医学研究院・助教 (10101)	
研究分担者	加賀 基知三 (Kaga Kichizo) (80224335)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関