

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09208

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胆道癌に対する新規遺伝子治療の開発

研究課題名(英文) Development of retroviral replicating vector-mediated prodrug activator gene therapy for biliary tract cancer

研究代表者

岡村 圭祐 (Okamura, Keisuke)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：90724401

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)：遠隔転移を含めた胆道癌に対する新規遺伝子治療法の確立を目的とした。治療遺伝子として細胞内の鉄イオンを汲み出す細胞膜蛋白質フェロポルチン(ferroportin、FPN1)をコードする遺伝子 SLC40A1を腫瘍選択的増殖型レトロウイルス(retroviral replicating vector、RRV)に搭載した RRV-FPN1)。RRV-FPN1 感染G-415細胞のcell cycleにおいてG0/G1期へのcytostatic状態に移行しつつあり、RRVの胆道癌に対する新たな可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスを応用した遺伝子治療は有効な手段のひとつとしてその可能性が追及されてきた。これまでの非増殖型ウイルスベクターは腫瘍選択性が低く、増殖型ウイルスベクターの多くは腫瘍溶解性であることから癌細胞破壊と相まってウイルス増殖に限界があった。本研究のRRVは、優れた腫瘍選択性、高い遺伝子導入効率ならびに確実な抗腫瘍効果を備えた新しいウイルスベクターである。米国ではプロドラッグの5-FUを活性化する酵素(cytosine deaminase)を搭載したRRV-CDの脳腫瘍に対する第II/III相臨床試験が進行中であることから、本邦での臨床応用も大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：The prognosis for patients with biliary tract cancers is poor, while the incidence of these cancers is increasing. Unfortunately, most patients present with locally advanced or metastatic disease. In the present study, we developed a retroviral replicating vector (RRV)-based gene therapy and the effects of iron efflux transporter, ferroportin-1 (FPN1, SLC40A1 encoding protein) was investigated. The human biliary tract cancer cell line, G415 was treated with RRV-FPN1 and the effect of FPN1 on the cell cycle was evaluated by flow cytometry. The results indicated that increased FPN1 expression in G415 cell induced the cell cycle arrest at G0/G1 phase. Iron is a crucial element for cell proliferation, growth, and metabolism. Therefore, the decrease of intracellular iron lead to cytostatic effect on cell growth. Our results suggest that over-expression of FPN1 may exert anti-tumor effects against biliary tract cancers.

研究分野：消化器外科学

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

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 胆嚢癌、胆管癌、乳頭部癌を含む胆道癌は、南アメリカや東アジアでは罹患率が高く、なかでも、日本人は他の東アジアの人やアメリカの日系人と比べても罹患率が高い傾向にある。年々その患者数は増加傾向にあり、比例して胆道癌による死亡者数も増加傾向にある。その背景に、胆道癌は自覚できる症状が乏しく、早期発見が難しい癌であるため、発見された時はすでに肝臓、肺、遠隔リンパ節などに転移していることがあり、診断を受けた時点で手術を行える状態でないことがほとんどである。さらに、胆道癌に対する有効な治療法は手術のみとされ、標準化学療法が確立できていない。近年、胆道癌に対する GEM（ジェムザール）の有効性が明らかになって以来、研究が急速に進み、現在では GEM と CDDP（シスプラチン）併用療法（GC 療法）（ABC-02 study）、GEM と S-1（テガフル）併用療法（GS 療法）（JCOG1113 study）が胆道癌の治療成績を向上させている。しかし一方で、腫瘍内に存在する細菌が抗癌剤への抵抗性をもたらす可能性が報告された（Matson V et al. *Science*. 2018）。そこで、胆道癌に対する化学療法とは異なる新しい治療戦略の開発が重要である。

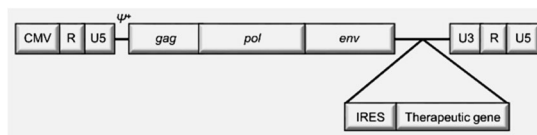
(2) ウイルスを応用した遺伝子治療は有効な手段のひとつとしてその可能性が追及されてきた。しかし、これまで用いられてきた非増殖型ウイルスベクターは腫瘍選択性を持たない弱点があった。次に試みられたのが増殖型ウイルスベクターの開発であった。しかし、その多くは腫瘍溶解性（oncolytic）であり、ウイルスの増殖に際してウイルス産生細胞である癌細胞自体を破壊してしまうため期待するほどの高い遺伝子導入効率は得られなかった。そこで、遠隔転移癌への治療効果を含めた新規遺伝子治療法の開発が急務である。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、①優れた腫瘍選択性、②高い遺伝子導入効率、③確実な抗腫瘍効果を備えた新しい遺伝子治療法の確立を目的とする。

### 3. 研究の方法

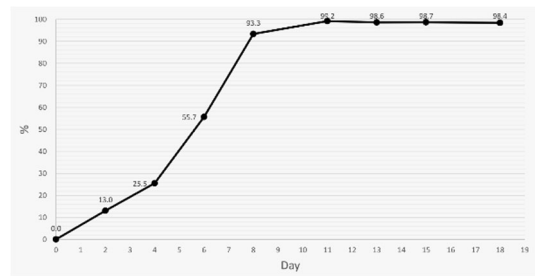
(1) 増殖が盛んな癌細胞は正常細胞に比べてより多くの鉄イオンを必要とすることから、癌細胞を iron depletion 状態に追い込む治療戦略を考えた。今回用いる腫瘍選択的増殖レトロウイルス・ベクター（retroviral replicating vector; RRV）はマウス白血病ウイルス（MLV）由来であり、被膜内に核移行シグナルを持たないため、活発に分裂している癌細胞にのみ感染しゲノム DNA に組み込まれる効果的な腫瘍選択的増殖が期待できる。さらに、低毒性の遺伝子産物を選択することで、安定した遺伝子発現によるレトロウイルスの腫瘍内拡散が可能となる。このシステムを利用して、細胞内の鉄イオンを汲み出し、癌細胞を iron depletion 状態に追い込み徐々に死滅させる効果を狙ったフェロポルチン-1 蛋白（SLC40A1 遺伝子）を発現させることで、①優れた腫瘍選択性、②高い遺伝子導入効率、③確実な抗腫瘍効果を備えた新しい遺伝子治療法を確立する。



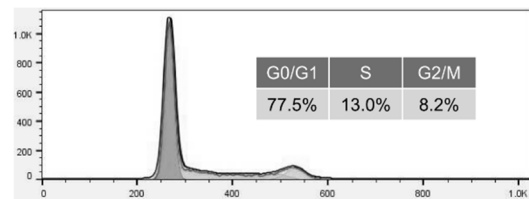
(2) 対象とする癌種は胆道癌の中でも胆嚢癌はとくに予後が不良であることから、胆嚢癌由来細胞株を用いて治療効果を評価し、新規遺伝子治療法の有効性を示す。

### 4. 研究成果

(1) 3種類の胆嚢癌細胞株 G-415、OCUG-1、NOZ にそれぞれ RRV-GFP ウイルス (green fluorescent protein 発現ウイルス) を 0.05 MOI で感染させたのち 2~3 日おきに細胞を passage し、passage 毎に GFP 発現陽性細胞の割合を FCM で解析し、ウイルスの拡散能力を評価した。結果、G-415 細胞はウイルス感染後 11 日ではほぼ 100% (99.2%) の GFP 発現を示した。OCUG-1 細胞はウイルス感染後 12 日で 46.5%、27 日目で 94.4%に達し、順調にウイルスが拡散することを示した。NOZ 細胞はウイルス感染後 11 日で 94.2%と、ウイルスの感染がほぼプラトーに達した。このように胆嚢癌に対する RRV の高い感染効率と安定した導入遺伝子の発現を得ることができた。



(2) フェロポルチン発現による細胞内鉄イオンの減少が細胞増殖能にどのような影響を及ぼすかを cell cycle を指標として評価した。FCM で解析した結果、ウイルス非感染 naïve G-415 細胞の cell cycle は G0/G1 期 67.2%、S 期 21.7%、G2/M 期 10.2% であったのに対して、フェロポルチン発現 G-415 細胞の cell cycle は G0/G1 期 77.5%、S 期 13.0%、G2/M 期 8.2%であった。このように癌細胞におけるフェロポルチンの強制発現は cell cycle において G0/G1 arrest という増殖抑制効果を示した。



(3) 米国ではプロドラッグの 5-FU を活性化する酵素 (cytosine deaminase) 遺伝子を搭載した RRV-CD の脳腫瘍に対する第 II/III 相臨床試験が進行中であることから、本邦での RRV を用いた胆嚢癌に対する新たな遺伝子治療法の臨床応用も大いに期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	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  (Tuchikawa Takahiro)  (50507572)	北海道大学・大学病院・講師   (10101)	
研究分担者	佐々木 勝則  (Sasaki Katsunori)  (60336394)	北海道大学・医学研究院・学術研究員   (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)	

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
---------	---------