

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791303

研究課題名（和文）新規制限増殖型ウイルスを用いた消化器癌遺伝子治療の開発

研究課題名（英文）Development of gene therapy for gastroenterological cancer with conditionally replicative virus

研究代表者：

小野 秀高 (ONO HIDETAKA)

横浜市立大学附属市民総合医療センター・助教

研究者番号：00453051

研究成果の概要（和文）：消化器癌に対する遺伝子治療の有用性は報告してきたが、さらに E3 region を改変して ADP を高発現する事によって抗腫瘍効果を増強した、制限増殖型アデノウイルス (ADP CRAds) のバックボーンを作製した。このバックボーンを用いてミネソタ大学と協力して、CXCR4 promoter で増殖を制限された CXCR4 ADP Luc CARds を作成した。また、Cox2 promoter で増殖を制限された Cox2 ADP Luc CRAds を用いて、抗癌剤の治療効果判定を非侵襲的に行った。既存の治療効果判定法と比べ、より病理学的効果判定を反映しており、今後の有効な tool であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：I have already reported feasibility of gene therapy for gastrointestinal cancer. Furthermore, I made new conditional replicative adenovirus (ADP CRAds) that was enhanced anti tumor effect with mutation and deletion in E3 region. Using this back bone, we success to make CXCR4 ADP Luc CRAds that replication was controlled by CXCR4 promoter. On the other hand, we imaged anti tumor effect using Cox2 ADP Luc CRAds that replication was controlled by Cox2 promoter and compared with existing methods. Cox2 ADP Luc CRAds indicated that its intensity of luminescence was more correlate with pathological anti tumor effect than existing method. Then, our imaging ADP CRAds have a potency to be a new tool for evaluation of anti tumor effect in chemotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胃十二指腸外科学、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

近年、悪性腫瘍に対する治療成績は新規抗癌剤の開発、集学的治療等により、向上している。その一方で、これらの治療に抵抗を示

す症例に対して、新たな治療法として遺伝子治療が注目されている。

消化器癌では Adenovirus のレセプターである (CAR) の発現が低い為に、実際に有用で

はないとされてきた。そこで、CAR の低発現の消化器癌に対して、USA の University of Alabama at Birmingham(UAB) の Human Gene Therapy Center では、Fiber を modify する事により、CAR と independent に細胞内に導入する新たな方法を開発して有用性を示し、(Conditionally replicative adenovirus for gastrointestinal cancers., Yamamoto M, Expert Opin Biol Ther. 2004 Aug;4(8):1241-50.) 私は UAB と共同研究を行い、Fiber modified CRAd が消化器癌の遺伝子治療で有効であることを報告した。

(Promoter-controlled infectivity-enhanced conditionally replicative adenoviral vectors for the treatment of gastric cancer., Ono HA, Kunisaki C et al., J Gastroenterol. 2005 Jan;40(1):3 1-42.)

一方で、Adenovirus の殺細胞効果に必要な Adenovirus Death Protein (ADP) の発現を増強し、殺細胞効果を増強した construct をもち、その増殖を非侵襲的にイメージングする新たな、システムを開発した。(Promoter-controlled infectivity-enhanced conditionally replicative adenoviral vectors for the treatment of gastric cancer., Ono HA, Kunisaki C et al., J Gastroenterol. 2005 Jan;40(1):3 1-42.) その後、このシステムを用いて、Cox2 promoter で増殖を制限された CRAds を UAB, University of Minnesota(U of M)・Department of Surgery・Division of Basic and Translational Research と共同して開発し、殺細胞効果の増強と非侵襲的イメージングが可能であることを示し、NCI SPORE Workshop、Cold Spring Harbor Laboratory Meetings、American Society of Gene Therapy、日本遺伝子治療学会、日本癌学会、日本癌治療学会、日本外科学会、日本消化器外科学会等で発表し、高い評価を得ており、国内外で新たなベクターとして期待されている。

さらに、胃癌、大腸癌、膵癌の遠隔転移にケモカインである CXCR4 とそのリガンドである CXCL12 が高発現していると報告されている。

また、近年の化学療法の進歩に伴い、化学療法、放射線療法と手術を含めた集学的治療が重要になってきている。しかし、術前化学療法の治療効果判定を画像判定した結果と実際の手術における効果判定には大きな開きがあり、その治療効果判定をより鋭敏に示す tool の開発は急務である。すなわち、化学療法の既存の化学療法の効果判定では viable な癌細胞が完全に無くなったと証明することは不可能である。

2. 研究の目的

(1)まず、私が UAB と協力して開発した抗腫瘍効果を増強したバックボーンを持ち、CXCR4 で増殖を制御された、CXCR4 ADP CRAds を作成し、消化器癌に対する新たな遺伝子治療のベクターを開発し、その有用性について検討する事を目的とした。

(2)一方で、同時に抗癌剤の治療効果判定を Cox2 ADP Luc CRAds を用いて、既存の効果判定より有用であることを証明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ADP を高発現し、野生株より強い殺細胞効果をしめす、Adenovirus のバックボーンのプラスミド(pTG3602 ΔE3 ADP)を作成した。これと shuttle plasmid (pShuttle Cox2L-E1-pIX-F)を homologous recombination する事で、容易に Cox2 ADP CRAds を作成することが出来た。

今回、CXCR4 CRAds の作成に必要な shuttle plasmid(pShuttle CXCR4)は UAB から MTA を得て入手し、このプラスミドとバックボーンのプラスミド(pTG3602 ΔE3 ADP)を homologous recombination する事で、CXCR4 ADP CRAds を作成する。

次に、消化器癌細胞株の選択的殺細胞効果を、in vivo で検討する。

in vivo でその有用性を示した後に、消化器癌細胞株を nude mouse に皮下注して皮下腫瘍モデルを作成した後に、CXCR4 ADP CRAds とコントロール virus を腫瘍内注入し、腫瘍径を経時的に計測して、その抗腫瘍効果を検討する。

(2) nude mouse を用いて、消化器癌(膵癌)の皮下腫瘍モデルマウスを作成し、化学療法効果判定モデルを作成する。その抗腫瘍効果判定を Cox2 ADP Luc CRAds の発光度と病理学的高過度判定を用いて ① 相関性、感度 ② 特異度を検討する。

4. 研究成果

(1) CXCR4 ADP CRAds を作成することに非常に難渋した。UAB から入手した shuttle plasmid(pShuttle CXCR4)とバックボーンのプラスミド(pTG3602 ΔE3 ADP)を homologous recombination を行っても、目的とした virus のプラスミドを得ることができなかった。一方で、このプラスミドの sequence が解っていなかったため、フルシーケンスを行い、NCBI のデータベースと比較して mapping を行い、理論上でも homologous recombination を行えば、CXCR4 ADP CRAds が作成できることを確認した。

しかし、様々な条件の変更を行っても目的とする recombination が成功しなかったため、University of Minnesota の山本正人先生、Julia Davydova 先生と共同研究を行う形として最終的に CXCR4 ADP CRAds を作成するこ

とができた時点で3年の歳月を有した。今後は、このCXCR4 ADP CRADsを用いて抗腫瘍効果のみならず、微小な viable cell を同定するイメージングツールとして有用であることを示す予定である。

(2) 膵癌皮下腫瘍モデルマウスを作製したのち、Gemcitabine を腹腔内投与する化学療法モデルを作製した。GEM の濃度を振り、評価点を検討した結果、1000mg/kg で投与し、15日以降に治療効果判定することが至適であることがわかった。CRADs は測定する3日前に投与することとした。Luc の発光を測定したのちに、sacrifice して、病理学的な治療効果判定を行った。

まず、腫瘍径を用いた RECIST の治療効果判定と、病理学的な治療効果判定の間ではおおきな開きを認めた。(図1)

RECIST and Pathological evaluation

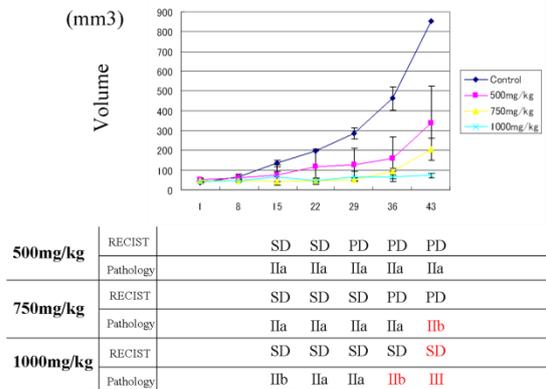


図1

次に、制限増殖型アデノウイルスを用いて viable な細胞のみを発光させる手法で治療効果判定を行った。コントロールグループでは Luciferase の発行は強く、病理組織学的にも viable な細胞を認めた。(図2)

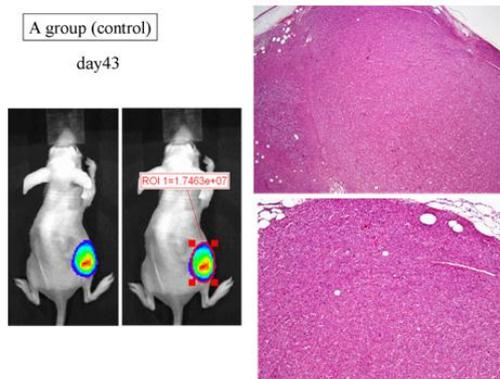


図2

一方で、GEM を投与して肉眼的に腫瘍の縮小したものでは、①Luciferase の発光が残るも

のでは、一部に viable な細胞を認めたが、(図3)

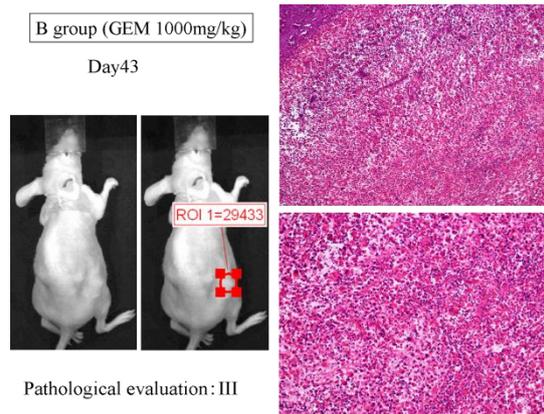


図3

②Luciferase の発光がなくなったものでは、組織学的に viable な細胞は認めなかった。(図4)

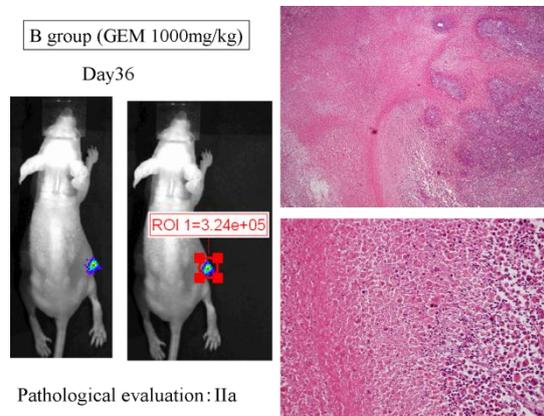


図4

この条件で、膵癌皮下腫瘍モデルマウスの化学療法効果判定では、Imaging CRADs を用いた場合は、発光度が減弱したものもあり、その結果は、既存の RECIST を用いた場合は全てにおいて SD であったのに対し、より正確な抗癌剤の治療効果判定を反映するものであった。(図5)

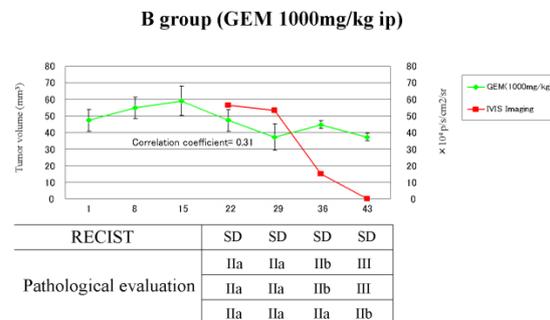


図5

以上の結果より、新規制限増殖型ウイルスを用いた抗癌剤効果判定は有用であると考え

る。

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)

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 秀高 (ONO HIDETAKA)

横浜市立大学附属市民総合医療センター・助教

研究者番号：00453051

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：