

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592453

研究課題名(和文)ポリマー多重加工オンコリティックアデノウイルスによる卵巣癌特異的遺伝子治療法開発

研究課題名(英文)Ovarian cancer specific gene therapy by polymer-coated oncolytic adenovirus

研究代表者

濱田 雄行(Hamada, Katsuyuki)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90172973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：オンコリティックウイルスAdE3-midkineは陰性荷電であるため(1層)、これに対し陽性荷電のポリエチレンイミン(PEI)(2層)さらには腫瘍特異的なCD44を受容体とする陰性荷電のコンドロイチン硫酸を加工(3層)し、これらをさらに多重加工することにより抗体存在下においてその抗腫瘍効果を検討した。9層目以降で抗腫瘍効果は増大し、13層目で最大となった。B6C3F1マウスと同種由来の卵巣癌細胞株OVHMを用いたsyngeneic mouse modelにおける抗腫瘍効果を検討したところ、腹腔内腫瘍モデルにおいて60%、皮下腫瘍モデルにおいて90%の完全腫瘍退縮が得られた。

研究成果の概要(英文)：Because oncolytic adenovirus, AdE3-midkine is negatively charged, positively charged polyethylenimine (PEI) and negatively charged chondroitin sulfate were respectively layered on the surface of AdE3-midkine. In the antiadenovirus antibody, 12 layers with PEI and chondroitin sulfate showed the most potent antiproliferative effect. In the B6C3F1 syngeneic mouse model, respectively 90% and 60% of subcutaneous and intraperitoneal tumor growth were completely reduced.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：オンコリティックアデノウイルス 抗体 ポリマー加工 ポリエチレンイミン コンドロイチン硫酸

### 1. 研究開始当初の背景

ウイルスを用いた癌遺伝子治療薬の実用化が困難となっているのは、抗体産生による感染抑制により抗腫瘍効果が認められないことにある。我々は、非小細胞性肺癌細胞の A549 細胞を放射線照射して腫瘍形成能を消失させ、オンコリティックアデノウイルス AdE3-midkine に感染させてキャリアー細胞として用いることで、オンコリティックアデノウイルス感染後に細胞が断片化し、このウイルス粒子を含有したキャリアー細胞断片が、標的癌細胞に直接的に貪食作用により取り込まれ、抗体存在下においても感染が成立し、抗アデノウイルス CTL さらには抗腫瘍免疫誘導によりきわめて強力な抗腫瘍効果を示し、腫瘍内投与によりマウス卵巣癌は根治することを明らかにした(Hamada, K. et al, Molecular Therapy, 2007)。本キャリアー細胞の問題点として A549 細胞が癌細胞であり癌遺伝子が host の染色体に組み込まれる可能性が否定できないこと、細胞加工製品であるため保存に液体窒素が必要、大量工業生産、輸送、ロット間の安定性等の問題があげられる。さらに、アデノウイルス粒子含有キャリアー細胞断片が腫瘍細胞に貪食される機構は、アデノウイルスの受容体経路に比べ感染効率が悪いこと、よりオンコリティックアデノウイルスの抗腫瘍効果を高め、さらに上記の種々の問題点を解決するためには、キャリアー細胞に代わり直接アデノウイルス表面のカプシド蛋白を加工することにより抗体による感染抑制を解除し、癌特異的抗原および受容体経路で感染を成立させる新たな人工皮膜(artificial envelope)を作成し、より効率的なオンコリティックアデノウイルスの癌特異的感染システムを確立する必要がある。我々は、既にポリカチオンのポリエチレンイミン(polyethylenimine, PEI)とポリアニオンの癌マトリックスでその受容体 CD46 が癌に大量に発現するヒアルロン酸(hyaluronic acid, HA)をオンコリティックアデノウイルスに対し多重加工することにより、卵巣癌腹腔内播種性モデルにおいて 20% の完全腫瘍退縮をきたすことを報告した(Yoshihara, C. et al, Oncology Reports, 2010)。我々は、プラスミド-GM-CSF の加工において 10kd 以下のコンドロイチン硫酸が、ヒアルロン酸より抗腫瘍効果がより高いことを明らかにした(Hamada, K. et al, Journal of Gene Medicine, 2012)。しかしながら、オンコリティックアデノウイルスの PEI とコンドロイチン硫酸を用いた多重加工の報告は、まだない。

### 2. 研究の目的

我々は、AdE3-midkine(1 元)にポリカチオンとして PEI(2 元)さらにポリアニオンとしてヒアルロン酸(3 元)の重層処理に加えてさらにポリエチレンイミン、ヒアルロン酸を加えて 7 元の重層処理まで行うとアデノウイル

スにより事前免疫を行った免疫機能が正常な B6C3F1 マウス由来の OVHM 卵巣癌腹腔内モデルにおいて、3 回投与で 20% の完全腫瘍退縮を得るまでに至っている(Yoshihara, C. et al, Oncology Reports 2010)。臨床試験あるいは将来的な臨床医薬に至るまでは、人においては 95% にすでにアデノウイルスに対する抗体を有しているため、抗体存在下においてより良好な抗腫瘍効果が得られるために、さらにポリマー加工技術の改良を行う必要がある。このため、プラスミドベクターのポリマー加工における検討から腫瘍特異性がヒアルロン酸より高いとされる 10kd 以下の低分子量のコンドロイチン硫酸をポリアニオンとして用いて検討を行った。電位測定器による電荷測定と粒子径測定ならびに電子顕微鏡的検討により、凝集の抑制をはかりながら、効果的な薄層状の被覆加工を行い、オンコリティックアデノウイルス、PEI、コンドロイチン硫酸の各の反応量、反応時間、ミキサー等を用いたミキシングによる反応方法、7 元以上の超多層被覆加工等の検討を行い、adenovirus-gal による抗体存在下での遺伝子発現、さらには AdE3-midkine を用いた抗体存在下における in vitro での卵巣癌細胞の増殖抑制効果等を基に抗体存在下におけるオンコリティックアデノウイルスの抗腫瘍効果の改善を目指すため、事前免疫を行った卵巣癌皮下腫瘍モデルさらには卵巣癌腹腔内腫瘍モデルを用いて検討した。

### 3. 研究の方法

(1) アデノウイルス加工に関する基礎実験および遺伝子発現実験には、蛍光顕微鏡で観察が容易な adenovirus-GFP に比べ、X-gal による染色が必要で観察に時間の要するものの発現感度の高い adenovirus-gal を用いた。in vitro および in vivo における増殖抑制実験には、アデノウイルス E1A プロモーターを腫瘍特異的な midkine プロモーターに置換したオンコリティックアデノウイルス AdE3-midkine を用いた。in vitro における増殖抑制実験にはヒト卵巣癌細胞株 HEY と x600 の抗体価を有する抗アデノウイルス抗体(武田製薬)を用いて、ポリマー加工による免疫原性の克服(アデノウイルス感染性の回復)について検討した。in vivo における増殖抑制効果実験には、(C57BL/6 x C3/He)F1(B6C3F1)マウス由来の高転移性、高回転性の卵巣癌細胞株 OVHM を用いた syngeneic mouse model において行った。

(2) 電位測定には(ゼータサイザーナノ S、マルバーン)を用い、アデノウイルスの PEI およびコンドロイチン硫酸付加による電位の変化、粒子径の変化を測定し、各反応量の基準量を決定した。走査型電子顕微鏡を用い、凝集を抑制し、薄層のポリマー多重加工ができるよう、静置、ボルテックス、ミキシング等による反応方法を検討した。

(3)10%FCS 加 RPMI 培養液 1ml を各 well に入れた 24well dish にヒト卵巣癌細胞株 HEY を 20000 細胞/well 撒き、翌日培養液を吸引し、FCS(-)RPMI 培養液と置換し、ポリマー加工した adenovirus- gal 1000MOI を入れ 3 時間反応後、抗アデノウイルス抗体を入れ、3 日間反応し、固定した後 X-gal にて染色し、陽性細胞を顕微鏡にて観察した。

(4)同上の条件でポリマー加工したオンコリティックアデノウイルス AdE3-midkine を入れ、抗体存在下の増殖抑制実験を行い、5 日間反応した後に crystal violet assay にて IC50 の計算を行った。

(5)in vivo の増殖抑制実験としては B6C3F1 マウスに 1x10<sup>10</sup>PFU の adenovirus- gal で事前免疫後 3 週間して同種由来の卵巣癌 OVHM 細胞を 1x10<sup>6</sup> 細胞マウス皮下に移植し、腫瘍径が 5-8mm となった時点でポリマー加工した AdE3-midkine の腫瘍内投与を行った。2 日毎に腫瘍径を測定し、死亡するまで経過観察した。腹腔内腫瘍モデルとしては、事前免疫後 3 週間して卵巣癌 OVHM 細胞を 1x10<sup>6</sup> 細胞マウス腹腔内に移植し、4 日後から治療を開始した。死亡するまで経過観察した。

#### 4. 研究成果

(1) 電子顕微鏡的検討により、アデノウイルスは皮膜を有しないため、アデノウイルス単独(1元)でも互いに凝集しやすいことが明らかとなった。また、反応方法において静置のみでは凝集しやすいことが明らかとなった。このため、ローター、ボルテックス、ミキシング等の検討を行ったところ、ミキシングで最も凝集が抑制でき、ポリマー加工による薄層の多重加工が可能となった。凝集が最も起こりやすいのは、アデノウイルス単独であり、PEI を加えても凝集は起こりにくく、コンドロイチン硫酸負荷後に凝集が起こりやすいことが明らかとなった。また、PEI とコンドロイチン硫酸の負荷量は等量加えるのがもっと良好で、コンドロイチン硫酸の量が多くなればなるほど凝集が起こりやすいことが明らかとなった。

(2) adenovirus- gal(1元)を PEI(2元)、コンドロイチン硫酸(3元)さらに PEI、コンドロイチン硫酸で多重ポリマー加工して遺伝子発現を検討すると、ミキシングによる反応では 10 分程度の反応が最も良好な遺伝子発現を示した。AdE3-midkine (1元)を同様にポリマー加工すると、9 元目以降で抗体存在下の抗腫瘍効果が増大し、13 元目で最大となった。このため、最外層にコンドロイチン硫酸で加工した 13 元加工の AdE3-midkine を in vivo の実験に用いることとした。

(3) 腹腔内腫瘍モデルにおいて、事前免疫後では AdE3-midkine 単独では、抗腫瘍効果は認められなかった。13 元加工の AdE3-midkine では、3 回腹腔内投与で 60% の完全腫瘍退縮が得られた。皮下腫瘍モデルに

おいて、2 回の腫瘍内投与により 80% の完全腫瘍退縮が得られた。

#### 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 9 件)

すべて査読あり

1. Hamada, K., Shirakawa, T., Terao, S., Gotoh, A., Tani, K., Huang, W. (2014) Biosafety studies of carrier cells infected with a replication-competent adenovirus introduced by IAI.3B promoter. *Molecular Therapy--Methods & Clinical Development*, In print.

2. Fujioka, T., Yasuoka, T., Koizumi, M., Tanaka, H., Hashimoto, H., Nabeta, M., Koizumi, K., Matsubara, Y., Hamada, K., Matsubara, K., Katayama, T., Nawa, A. (2013) Concurrent chemoradiotherapy with nedaplatin in patients with stage IIA to IVA cervical carcinoma. *Molecular and clinical oncology*, 1:165-170.

3. Yoshihara, C., Hamada, K., Kuroda, M. and Koyama, Y. (2012) Oncolytic plasmid: A novel strategy for tumor immuno-gene therapy. *Oncology Letters* 3:387-390.

4. Hamada, K., Yoshihara, C., Ito, T., Tani, K., Tagawa, M., Sakuragawa, N., Itoh, H. and Koyama, Y. (2012) Antitumor effect of chondroitin sulfate-coated ternary GM-CSF plasmid complex for ovarian cancer. *Journal of Gene Medicine*, 14: 120-127.

5. Hiwasa, K., Nagaya, H., Terao, S., Acharya, B., Hamada, K., Mizuguchi, H. and Gotoh, A. (2012) Improved gene transfer into bladder cancer cells using adenovirus vector containing RGD motif. *Anticancer research* 32:3137-3140

6. Saito, A., Morishita, N., Mitsuoka, C., Kitajima, S., Hamada, K., Lee, K.M., Kawabata, M., Fujisawa, M. and Shirakawa, T. (2011) Intravenous injection of irradiated tumor cell vaccine carrying oncolytic adenovirus suppressed the growth of multiple lung tumors in a mouse squamous cell carcinoma model. *Journal of Gene Medicine* 13:353-361.

7. Zhang, T., Hamada, K., Hyodo, M., Itoh, H., Tani, K., Goda, H., Nakashiro, K. and Hamakawa, H. (2011) Gene therapy for oral squamous cell carcinoma with IAI.3B promoter-driven oncolytic adenovirus-infected carrier cells. *Oncology Reports* 25:795-802.

8. Yoshihara, C., Hamada, K., Kuroda, M. and Koyama, Y. (2012) Oncolytic plasmid: A novel strategy for tumor immuno-gene therapy. *Oncology Letters*

3:387-390.

9. Hamada, K., Yoshihara, C., Ito, T., Tani, K., Tagawa, M., Sakuragawa, N., Itoh, H. and Koyama, Y. (2012) Antitumor effect of chondroitin sulfate-coated ternary GM-CSF plasmid complex for ovarian cancer. Journal of Gene Medicine, 14: 120-127.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 高木香津子、濱田雄行、伊藤智子、芳原智恵子、小山義之、谷憲三朗、那波明宏. 卵巣がんに対するコンドロイチン硫酸およびポリエチレンイミンによる多重コーティングを施行したオンコリティックアデノウイルスの遺伝子治療. 第 55 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会. 2013 年 12 月 13-15 日、京都.

2. 高木香津子、濱田雄行、伊藤智子、芳原智恵子、小山義之、谷憲三朗、那波明宏. midkine プロモーター導入オンコリティックアデノウイルスによるコンドロイチン硫酸ポリマー多重加工人工皮膜を用いた卵巣癌に対する抗腫瘍効果. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会. 2013 年 11 月 25-26 日. 東京.

3. 高木香津子、濱田雄行、伊藤智子、芳原智恵子、小山義之、谷憲三朗、那波明宏. 卵巣癌に対するコンドロイチン硫酸を用いたオンコリティックアデノウイルスのポリマー多重加工による抗腫瘍効果. 日本癌学会学術総会. 2013 年 10 月 3-5 日. 東京.

4. 高木香津子、濱田雄行、伊藤智子、芳原智恵子、小山義之、谷憲三郎、那波明宏. ポリマー多重加工処理によるオンコリティックウイルスの電子顕微鏡による評価. 第 19 回日本遺伝子治療学会学術総会. 2013 年 6 月 4-6 日. 岡山.

5. 特別シンポジウム-5「がん治療」  
Hamada, K., Takagi, K., Tani, K., Nawa, A. Cancer gene therapy with oncolytic adenovirus by cell and polymer processing. 第 19 回日本遺伝子治療学会学術総会. 2013 年 6 月 4-6 日. 岡山.

6. Hamada, K., Takagi, K., Yoshihara, C., Ito, T., Koyama, Y., Itoh, H., Nawa, A. Gene transfer of chondroitin sulfate-coated granulocyte macrophage-colony stimulating factor in ovarian cancer. The ASGCT 16th Annual Meeting, May 15-18, 2013 in Salt Lake City, UT, USA.

7. 鈴木基史、佐々悠木子、鈴木和彦、成田洋平、荒木陽一、濱田雄行、小林正行、岸本海織、高島一昭、山根義久、水谷哲也、伊藤博. 犬のがん遺伝子治療におけるオンコリティックアデノウイルス感染キャリアー細胞の体内動態. 第 33 回動物臨床医学会年次大会. 2012 年 11 月 16-18 日、大阪

8. 濱田雄行、高木香津子、芳原智恵子、小山義之、那波明宏. ポリマー多重加工処理に

よるオンコリティックアデノウイルスの免疫原性克服と抗腫瘍効果の検討. 第 71 回日本癌学会、2012 年 9 月 19-21 日、札幌

9. Hamada, K., Yoshihara, C., Ito, T., Koyama, Y., Itoh, H., Takagi, K., Nawa, A. Gene therapy of chondroitin sulfate-coated ternary GM-CSF plasmid complex for ovarian cancer. American Society of Gene & Cell Therapy 15th Annual Meeting. Philadelphia, Pennsylvania May 15, 2012 - May 19, 2012.

10. 濱田雄行. (2011) 頭頸部癌における IAI.3B プロモーター導入オンコリティックアデノウイルス感染キャリアー細胞の抗腫瘍効果. 第 70 回日本癌学会総会、名古屋、10 月 3-5 日

11. 濱田雄行. (2011) 頭頸部癌における IAI.3B プロモーター導入オンコリティックアデノウイルス感染キャリアー細胞の抗腫瘍効果. 第 70 回日本癌学会学術総会. 名古屋、10 月 3-5 日.

12. 小山義之、芳原智恵子、黒田美奈子、濱田雄行. ウィルス抗原遺伝子を用いたガン免疫治療の新しい考えかた. 第 21 回バイオ・高分子シンポジウム. 吹田市、2011 年 7 月 25 日 ~ 7 月 26 日

13. Yoshihara, C., Hamada, K., Koyama, Y. (2011) Novel adenovirus complexes having artificial envelope for tumor gene therapy. 第 17 回日本遺伝子治療学会、福岡、7 月 15 - 17 日

14. Hamada, K., Zhang, T., Shirakawa, T., Huang, W. (2011) Efficacy and biosafety test of carrier cell infected with oncolytic adenovirus. April 2-6 2011 102th AACR, Orland Florida

15. Hamada, K., Zhang, T., Nakashiro, K., Hamakawa, H. (2011) Carrier cells infected with IAI.3B promoter-driven oncolytic adenovirus overcome immunogenicity and induce complete tumor reduction in oral squamous carcinoma cells The ASGCT 14th Annual Meeting, May 19-21, 2011 in Seattle, WA, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 新規細胞、それを用いた抗腫瘍効果の誘導剤、癌の遺伝子治療用医薬および抗腫瘍効果の誘導方法

発明者: 濱田雄行

権利者: 愛媛大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-074181

出願年月日: 平成 26 年 3 月 31 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 雄行 (Hamada, Katsuyuki)  
愛媛大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 90172973

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし