

平成 29 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：2014～2016

課題番号：26461936

研究課題名(和文) プロドラッグシステムを応用した増殖型レトロウイルスによる新規膵癌治療法の開発

研究課題名(英文) Retroviral Replicating Vector (RRV)- Mediated Prodrug-Activator Gene Therapy for Pancreatic Cancer

研究代表者

平岡 圭 (Hiraoka, Kei)

北海道大学・医学研究科・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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓がん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)がウイルスに感染した癌細胞内で抗がん剤に変換される。動物実験モデルにおいて、この新たなウイルスは非常に効率よく癌細胞に遺伝子を導入できることが確認され、プロドラッグを投与することで強力な抗腫瘍効果を示した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we are developing a retroviral replicating vector (RRV)-mediated prodrug activator gene therapy as a new therapeutic approach for pancreatic ductal adenocarcinoma. With this system, the prodrug (antifungal drug) is converted to the anticancer drug within RRV infected cells. In pancreatic cancer preclinical models, high levels of transduction were achieved and systemic administration of 5-FC resulted in significant inhibition of tumor growth.

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 膵癌 遺伝子治療 ウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌の治療の現状

外科切除でも約 80%が再発死亡し、膵癌全体の 5 年生存率は約 5 %に過ぎない。一方我が国の膵癌死亡者数は年間約 3 万人に迫り、治療成績の向上が急務である。

当教室は、新術式を考案し膵癌の局所制御に貢献してきたが、遠隔転移や局所再発率は依然高く、新規治療法の開発に力を注いでいる。

(2) 膵臓癌に対する遺伝子治療

血管新生阻害因子である PEDF をレンチウイルスベクターで膵癌細胞に遺伝子導入し、腫瘍縮小効果を動物実験モデルで明らかにしてきた。

非増殖型ウイルスを用いた方法では、癌細胞における遺伝子導入効率が不十分であったため、治療効果も限定的であった。

(3) 増殖型ウイルスベクターの使用

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できる。

ウイルスが増殖することにより高い遺伝子導入効率が得られる。

(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)

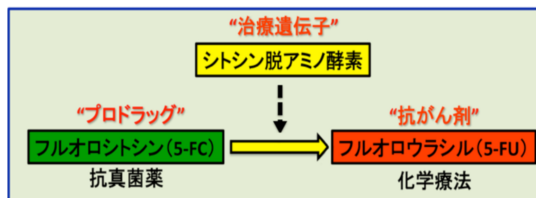


図 1

副作用の少ない薬物を高用量で使用できる。

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”を用いた新しい膵癌治療を可能とする。

わずかに正常分裂細胞に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) 膵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用い、膵癌における高い遺伝子導入効率と腫瘍選択的治療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

膵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を行うために必要な環境の整備。

(2) ウイルスベクターの産生

本研究に用いるウイルスベクター産生に必要なプロウイルス配列を含むプラスミドを入手。

遺伝子導入によりウイルスベクターを産生。

(3) 膵癌培養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

ヒトおよびマウス膵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確認した。

ヒトおよびマウス膵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確認した。

(3) ウイルスベクターにより遺伝子導入された培養膵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遺伝子導入されたヒトおよびマウス培養膵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確認した。

(4) 膵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

ヒトおよびマウス膵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) 動物モデルによる膵癌治療実験(前臨床試験)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膵癌同所移植モデルを作製し、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腫瘍を有するマウスにおけるウイルス遺伝子の生体内分布解析を、ゲノム定量 PCR を用いて行った。

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

本研究に用いるウイルスベクター産生プ

ラスミドを共同研究施設より供与された。

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) ヒトおよびマウス膵癌培養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

膵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、速やかなウイルス増殖能と高い遺伝子導入効率を確認した。(図2)

膵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、速やかなウイルス増殖能と高い遺伝子導入効率を確認した。

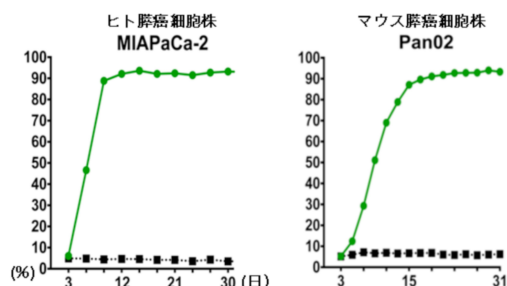


図2

(4) ウイルスベクターにより遺伝子導入された膵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ヒトおよびマウス培養膵癌細胞株では、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) 膵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

ヒトおよびマウス膵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を計測したところ、導入効率の速やかな増加が認められた。

(4) 動物による膵癌治療実験(前臨床試験)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。

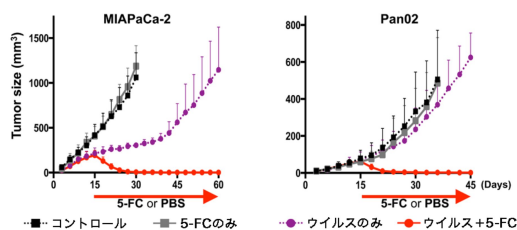


図3

ウイルスベクターを感染させたマウス膵癌同所移植モデルでも、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による腫瘍シグナルの経時的低下が認められた。

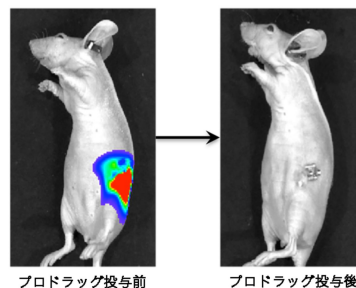


図4

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感染は微量であった。

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0件)

〔学会発表〕(計5件)

猪子和穂、平岡 圭、稲垣亮仁、高橋瑞菜、榎引敏寛、本谷康二、中村 透、土川貴裕、七戸俊明、Douglas J. Jolly、Noriyuki Kasahara、平野 聡、Retroviral Replicating Vector-mediated Prodrug Activator Gene Therapy for Pancreatic Cancer、10th International Oncolytic Virus Meeting、2016年10月1日 - 2016年10月4日、Fairmont Waterfront (Vancouver, Canada)

平岡 圭、猪子和穂、稲垣亮仁、高橋瑞菜、榎引敏寛、本谷康二、中村 透、土川貴裕、七戸俊明、Douglas J. Jolly、Noriyuki Kasahara、平野 聡、Prodrug activator gene therapy mediated by retroviral replicating vector (RRV) for pancreatic ductal adenocarcinoma、第22回日本遺伝子細胞治療学会、2016年7月18日 - 2016年7月30日、虎ノ門ヒルズ(東京都港区)

猪子和穂、平岡 圭、稲垣亮仁、高橋瑞菜、榎引敏寛、本谷康二、高野博信、佐藤彰記、中村 透、土川貴裕、七戸俊明、Douglas J. Jolly、Noriyuki Kasahara、平野 聡、Therapeutic efficacy of retroviral replicating vector-mediated prodrug activator gene therapy for pancreatic cancer、ASGCT 19th Annual Meeting、2016年5月4日 - 2016年5月7日、Marriott Wardman Park (Washington DC, USA)

猪子和穂、平岡 圭、稲垣亮仁、高橋瑞菜、榎引敏寛、本谷康二、高野博信、佐藤彰記、中村 透、土川貴裕、七戸俊明、Harry E. Gruber、Douglas J. Jolly、Noriyuki Kasahara、平野 聡、増殖型レトロウイルスシステムを

用いた膵癌に対するプロドラッグ活性化遺伝子治療、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016 年 4 月 14 日 - 2016 年 4 月 16 日、大阪国際会議場（大阪市）

猪子和穂、平岡 圭、稲垣亮仁、高野博信、佐藤彰記、高橋瑞菜、中村 透、土川貴裕、七戸俊明、Harry E. Gruber、Douglas J. Jolly、Noriyuki Kasahara、平野 聡、Retroviral replicating vector (RRV)-mediated prodrug activator gene therapy for pancreatic cancer、第 21 回日本遺伝子治療学会学術集会 2015 年 7 月 24 日 - 2015 年 7 月 26 日、大阪国際会議場（大阪市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平岡 圭 (HIRAOKA KEI)
北海道大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号：10719587

(2) 研究分担者

平野 聡 (HIRANO SATOSHI)
北海道大学・医学研究科・教授
研究者番号：50322813

土川 貴裕 (TSUCHIKAWA TAKAHIRO)
北海道大学・医学研究科・講師
研究者番号：50507572

中村 透 (NAKAMURA TORU)
北海道大学・医学研究科・助教
研究者番号：70645796

七戸 俊明 (SHICHINOHE TOSHIAKI)
北海道大学・医学研究科・准教授
研究者番号：70374353

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし