

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2006 ～ 2009
課題番号：	18591778
研究課題名(和文)	前立腺癌骨転移責任遺伝子の同定と組換えHSVによる癌ワクチン治療
研究課題名(英文)	Identification of responsible gene of bone metastasis in prostate cancer and its treatment using a recombinant HSV
研究代表者	
勝岡 洋治	( Katsuoka Yoji )
大阪医科大学・医学部・教授	
研究者番号：	10051757

### 研究成果の概要(和文)：

- 1) 前立腺表面膜蛋白“PSM”をターゲットとした PSM プロモーターを組み込んだ組み換え HSV を作成している。
- 2) サバイビン遺伝子の 2 種類の splice variant ( survivin-2B と survivin-Ex3 ) について、組織学的悪性度と survivin-Ex3 が正の、また survivin-2B が負の相関を示唆する結果を得た。
- 3) Survivin-Ex3 を有する前立腺癌細胞で特異的に増殖する組み換え HSV を作成中である

### 研究成果の概要(英文)：

- 1) We have been developing the recombinant HSV, which has the promotor region targeted on prostate specific membrane (PSM).
- 2) We have found that one of the two splice variant of surviving, survivin-Ex3 has a positive, and the other splice variant survivin-2B has a negative correlation with histological grade.
- 3) We have been developing the recombinant HSV, which has the promotor region targeted on Survivin-Ex3.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	660,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：HSV、前立腺癌、PSM、サバイビン、splice variants、

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 前立腺癌は、最近のライフスタイルや食事の欧米化、および人口分布の高齢化に伴って、欧米同様男性で最も多い悪

性疾患となりつつある。本疾患における治療(手術療法、ホルモン療法)の発展はめざましく、前立腺特異的抗原、PSA の汎用と相まって多数の早期前立腺癌患者

が治療の対象となり、有効な治療成績が報告されてきた。しかしながら、元来前立腺癌は発症年齢が高くなるに依る癌死を来す症例は全患者の10%にも満たないといわれている。また、患者数の増加、および病期の進行が遅いため治療の長期化をきたし、ホルモン療法にかかる費用は年々増加の一途をたどっている。前立腺癌の治療における現在の最も大きな課題は“いかに治療に必要な前立腺癌を同定し、どのような治療を選択するか”である。これらの状況を考慮すれば予後の悪い“いわゆる治療を必要とする癌”を同定する新しいマーカーを発見することは、無駄な治療費を費やすことを防止するばかりでなく必要でない患者に対して侵襲が強く術後の合併症の少ない前立腺全摘術などを施行することを未然に防ぐことが可能となり、非常に重要かつ必須の課題であると思われる。PSAは、これまで前立腺癌の代表的な腫瘍マーカーとして汎用されてきたが、周知のようにこれは前立腺肥大症にも高率に発現し癌に特異的な指標ではない。また癌においては高分化型の予後のよい癌で発現しやすく予後の悪い“いわゆる治療を必要とする癌”ではその発現が乏しいことが少なくない。其れ故 PSAの上昇を認めていなくとも発見された時にはすでに全身に転移を認める症例や、PSAを指標に経過観察術後症例においてPSAの上昇は呈さずとも転移が進んでいることも少なくない。そこで我々は近年、悪性腫瘍において抗アポトーシス蛋白の一種であるサバイビンとSplice variantに注目しこれらの発現 pattern と前立腺癌組織分化度、および転移の有無における相関関係を検討し、新しい患者予後、および転移を反映するマーカーとしての有用性を検討した。

(2) 前立腺癌におけるサバイビンとそのSplice variantの発現については未だ十分な解析は行われていない。前立腺癌におけるHSVを用いた遺伝子治療はこれまで殆ど報告がなく、これらを兼ね合わせた今回の我々の研究は先駆的、且つ画期的な試みであると思われる。

## 2. 研究の目的

(1) 以上の実験背景を踏まえて、我々は前立腺癌患者から採取した組織サンプル中のサバイビン及びその splice variantsの発現をLightCycler (Roche Diagnostics)を用いて定量的解析を行い、(既に、個別化定量可能なプライマーを設定し、サバイビン及びその splice variantsを別個に定量解析する技法を開発している) サバイビン及びその splice variantsの発現パターンと、組織分化度、

および転移の有無における相関関係を検討し、新しい患者予後、および転移を反映するマーカーとしての有用性を検討することを目的とした。

(2) これまでの遺伝子治療の手段は、各種ベクターを用いて有用遺伝子を標的細胞に導入する方法がほとんどであるが、我々は、HSVにおけるウイルス自体の細胞障害性と複製という特性を利用して、“特定の腫瘍細胞のみでHSVの複製をおこさせる組み換えHSV”を作成し標的細胞のみを殺傷する、癌治療を対象とした新しい見地からの遺伝子治療を検討した。すなわち、サバイビン及びその splice variantsの発現が、骨転移を有する前立腺癌細胞に特異的に認められるとすればこれらを有する癌細胞に特異的に感染し殺傷するヘルペスウイルスを作成することで、前立腺癌骨転移に対する全く新しい見地からの遺伝子治療、あるいは正確には“癌ウイルス治療”を確立することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 骨転移に強く関連する前立腺癌特異的抗原の同定:

① サンプルの採取: 前立腺癌骨転移症例の骨転移巣から、および前立腺癌骨転移(-)症例から採取した癌細胞を primary culture し、cell line を獲得する。

② RNAの調整: 1で得たそれぞれの cell line から純度の高い total RNA を精製する

③ DNase 処理、収率と純度の測定

④ 結果解析: 前立腺癌骨転移症例の骨転移巣から得た cell line (prostatic cancer bone metastasis-cell line, 以下PCBMと称する)に共通の遺伝子でかつ前立腺癌骨転移(-)症例には存在しない遺伝子のcDNAを選択する。

(2) Survivin<sup>-</sup>・Ex3 および Survivin-2B と前立腺癌組織分化度、および骨転移との関連の検証: これまでの予備実験で、前立腺癌原発巣組織において、組織学的悪性度とサバイビンおよび survivin<sup>-</sup>・Ex3が正の、また survivin-2B が負の相関を示唆する結果を得たことから、Survivin splice variants, survivin<sup>-</sup>・Ex3 および survivin-2B を個別化定量可能なプライマーを設定し、LightCycler (Roche Diagnostics)を用いて、定量的解析を行い、サバイビン及びその splice variantsの発現パターンと、組織分化度、および転移の有無における相関関係をより詳細に検討する。

(3) BM-gene を有する前立腺癌細胞で特異的に増殖する組み換え HSV の作成

① BM-gene 特異的な組み換え HSV の作成  
導入したい遺伝子を適当な HSV の構造遺

伝子ではさみこんだ形のプラスミドを作成し、親ウイルスの DNA とこのプラスミドを適当な細胞に同時にトランスフェクションすることにより、極めて低い確立ながら相同組み換えを生じさせ、目的のウイルスを獲得することができる。

i) BM-gene の中で特に特異的と考えられる DNA 配列の cDNA の作成

BM-gene を有する前立腺癌特異的にウイルスの複製を生じさせるため、BM-gene の中で特に特異的と考えられる DNA 配列 300base pair (以下 BM-Sp と称する) を選択し、純度の高い cDNA を作成する。

ii) BM-Sp および ICP-4 遺伝子を移入したプラスミド (pGH108+BM-Sp) の作成

BM-gene を有する前立腺癌特異的にウイルスの複製を生じさせるため、BM-Sp を HSV の複製に不可欠な ICP-4 遺伝子の上流に位置するように挿入し、pGH108+BM-Sp のプラスミドを作成する。

iii) pHSV-106 の tk 領域に LacZ 遺伝子を挿入して pHSV-106-LacZ (ptk ΔL) を作成: この操作により、HSV のチミジンキナーゼ (tk) 遺伝子活性は欠失し、腫瘍細胞内で特異的に複製するようになるとともに LacZ 遺伝子を挿入することにより、このウイルスが感染した際、x-gal 染色で確認できる。

iv) ptk ΔL に s・Ex3-Sp を挿入  
ptk ΔL の LacZ の下流域に pGH108+s・Ex3-Sp から s・Ex3-Sp を挿入し、pHSV-106 の tk 領域に LacZ 遺伝子、s・Ex3-Sp、および ICP-4 遺伝子を順に組み込んだプラスミド (ptk ΔL-s・Ex3-Sp-I4) を作成。

v) 相同組み換えにて目的のウイルス HSV (HSV-s・Ex3-Sp-tk) を精製、増殖  
ptk ΔL-s・Ex3-Sp-I4、および ICP-4 deletion mutant-HSV 親ウイルス (d120) DNA をそれぞれ直線化し、これらを同時に E5 細胞に transfection することによって目的の組み換え型 HSV (HSV-s・Ex3-Sp-tk) を獲得し、E5 細胞にて増殖させる。

(4) Survivin・Ex3 を有する前立腺癌細胞で特異的に増殖する組み換え HSV の作成  
<これまでの data から survivin・Ex3 骨転移との関連が予測されるため、我々は survivin・Ex3 を有する前立腺癌細胞に特異的に感染し殺傷するヘルペスウイルスの精製を次の 2 点に着目して施行する。>

①チミジンキナーゼ (tk) 遺伝子を欠失させた変異型 HSV (d1HSV) が哺乳類の tk 活性の豊富な腫瘍細胞では複製するが、post mitotic な正常細胞では殆ど複製しないという特製に注目し、HSV のチミジンキナーゼ (tk) 遺伝子を欠失させ、腫瘍細胞内で特異的に複製するようにデザインする。

②HSV の複製に不可欠な ICP-4 遺伝子を予め欠失させ、腫瘍特異的な遺伝子プロモーターの下流にこれを組み込むことにより、標的とする腫瘍細胞にウイルスが感染した場合のみウイルスは ICP-4 遺伝子を発現し、自己複製し、腫瘍細胞を次々と破壊するようにデザインする。

これら 2 点をデザインするための遺伝子組み換えの手法として、相同組み換えを用いる。導入したい遺伝子を適当な HSV の構造遺伝子ではさみこんだ形のプラスミドを作成し、親ウイルスの DNA とこのプラスミドを適当な細胞に同時にトランスフェクションすることにより、極めて低い確立ながら相同組み換えを生じさせ、目的のウイルスを獲得することができる。

(5) In vitro における腫瘍細胞傷害効果の検討

① 前立腺癌骨転移症例の骨転移巣から、骨転移を有する前立腺癌原発巣から、および骨転移を認めない前立腺癌症例から採取した癌細胞をそれぞれ primary culture し、cell line を獲得する。また、非癌細胞 cell line として、前立腺肥大症患者、および正常前立腺、の前立腺-腺細胞を primary culture しコントロールとする。

② で primary culture により得られた前立腺癌 cell line すべてに HSV-BM-Sp-tk を感染させ、それぞれにおいてウイルス感染が生じたことを X-gal 染色、および RT-PCR を用いて確認する。

③ 腫瘍細胞傷害効果を位相差顕微鏡、MTT assay、および cell growth assay を用いて確認:それぞれの assay 方法において、骨転移を有する前立腺癌原発巣から、骨転移を認めない前立腺癌症例から、前立腺肥大症症例から、および正常前立腺症例から採取し、primary culture した細胞を検体として細胞傷害効果を検討し、HSV-BM-Sp-tk が前立腺癌細胞特異的に腫瘍細胞傷害効果を発現したことを証明する。

(6) In vitro における HSV-s・Ex3-Sp-tk による腫瘍細胞傷害効果の検討

前立腺癌骨転移症例の骨転移巣から、骨転移を有する前立腺癌原発巣から、および骨転移を認めない前立腺癌症例から採取した癌細胞をそれぞれ primary culture した cell line すべてに HSV-s・Ex3-Sp-tk を感染させ、それぞれにおいてウイルス感染が生じたことを X-gal 染色で確認するとともに癌細胞特異的に細胞傷害効果を発現したことを顕微鏡的に、および MTT assay にて確認する。

(7) In vivo における腫瘍細胞傷害効果の検討

①、マウスを用いた前立腺癌骨転移モデルの作成

i) 前立腺癌骨転移症例の骨転移巣から primary culture した cell line, PCBM(1x10<sup>7</sup>) を BALB/c nu/nu マウス前立腺被膜下に inoculate する。(n=100)

ii) 20 匹ずつを inoculate 後 3 週目から harvest し、前立腺、全身の骨、肝臓、肺、腎臓における転移の程度を評価する。

② 実験群の作成

<Gp 1、治療群>、HSV- s・Ex3-Sp -tk (1x10<sup>7</sup>pfu) を 1 で得られたマウスモデルに静脈内投与、(n = 60/group) .

<Gp 2、対照群>、生食を静脈内投与、(n = 60/group) .

③ 効果判定

i) 前立腺原発巣に対する効果：腫瘍サイズの計測 3 日毎に腫瘍の大きさを測定し、経過観察

ii) 転移巣に対する効果：4, 6, 8, 10 週目でマウスを harvest. し、骨、肺、肝、腎、および腫瘍を摘出。X-gal 染色, RT-PCR, を用いて HSV-BMtk が、腫瘍特異的に感染し、細胞傷害効果を発現していることを証明する。

#### 4. 研究成果

(1) 前立腺表面膜蛋白“PSM”をターゲットとした PSM プロモーターを組み込んだ組み換え HSV を作成

ICP-6、ICP34.5 など HSV の複製に不可欠な遺伝子の欠失変異型 HSV が分裂細胞でのみ自己複製可能な性質を利用し、腫瘍細胞をターゲットとして様々な遺伝子治療用ベクターを作成してきた。これらの研究背景および経験を生かして、すでに前立腺表面膜蛋白として知られる PSM をターゲットとした PSM プロモーターを組み込んだ組み換え HSV を作成中である。また、さらには前立腺特異抗原として知られる PSA をターゲットとした組み換え HSV を作成中ですでに活性の強い PSA プロモーターを採取し、現在、この PSA プロモーターの HSV 内への組み込みを行っている。

(2) サバイビン遺伝子の 2 種類の splice variant ( survivin-2B と survivin-・Ex3) について、組織学的悪性度および MIB-1 index と サバイビンおよび survivin-・Ex3 が正の、また survivin-2B が負の相関を示唆する結果を得た。現在さらに サバイビン及びその splice variants の発現パターンと、組織分

化度、および転移の有無における相関関係を検討しており、骨転移におけるマーカーとしての有用性、および survivin-発現特異的殺傷ヘルペスウイルスの臨床的治療効果についても今後検討を加える予定である。

(3) Survivin-・Ex3 を有する前立腺癌細胞で特異的に増殖する組み換え HSV の作成

これまでの data から survivin-・Ex3 骨転移との関連が予測されるため、我々は survivin-・Ex3 を有する前立腺癌細胞に特異的に感染し殺傷するヘルペスウイルスの精製を次の 2 点に着目して施行している。

①チミジンキナーゼ (tk) 遺伝子を欠失させた変異型 HSV (dlHSV) が哺乳類の tk 活性の豊富な腫瘍細胞では複製するが、post mitotic な正常細胞では殆ど複製しないという特製に注目し、HSV のチミジンキナーゼ (tk) 遺伝子を欠失させ、腫瘍細胞内で特異的に複製するようにデザインした。

②HSV の複製に不可欠な ICP-4 遺伝子を予め欠失させ、腫瘍特異的な遺伝子プロモーターの下流にこれを組み込むことにより、標的とする腫瘍細胞にウイルスが感染した場合のみウイルスは ICP-4 遺伝子を発現し、自己複製し、腫瘍細胞を次々と破壊するようにデザインした。

#### 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 10 件)

1. Takahara K, Azuma H, Sakamoto T, Kiyama S, Inamoto T, Ibuki N, Nishida T, Nomi H, Ubai T, Sagawa N, Katsuoka Y. Conversion of Prostate Cancer from Hormone Independency to Dependency Due to AMACR Inhibition: Involvement of Increased AR Expression and Decreased IGF1 Expression. Anticancer Research 2009. 09. 14, 29:2497-2506
2. Inamoto T, Azuma H, Ubai T, Katsuoka Y. Association of PPAR- gamma with BCG immunotherapy. Medica Hypotheses. 2009. Feb, 72 (2) :231

[学会発表] (計6件)

1. Naokazu Ibuki, Kohei Koyama, Kazumasa Komura, Yutaka Fujisue, Yatsugu Kotake, Takanobu Ubai, Haruhito Azuma, and Yoji Katsuoka Transforming Growth Factor-beta Regulates Neuroendocrine Like Transdifferentiation of Human Prostate Cancer . 5th Congress of Asia Pacific Society for the Study of Aging Male (APSSAM Osaka2009) 2009. 10. 15-2009. 10. 18 Osaka, Japan

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○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

勝岡 洋治 (Katsuoka Yoji)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10051757

### (2) 研究分担者

東 治人 (Azuma Haruhito)  
大阪医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：40231914