

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15937

研究課題名（和文）悪性中皮腫に対して腫瘍融解性アデノウイルスの複製量を向上させる治療戦略

研究課題名（英文）The therapeutic strategies with augmented replications of oncolytic adenoviruses for malignant mesothelioma

研究代表者

盛永 敬郎（MORINAGA, Takao）

千葉県がんセンター（研究所）・がん治療開発グループ・研究員

研究者番号：30757000

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：悪性中皮腫は難治性の疾患であり、従来の枠組みにとられない治療法の開発が急務である。我々は、腫瘍で活性の高い転写調節領域によってウイルスの複製に必須の遺伝子E1の発現を制御する腫瘍融解性アデノウイルスを用い、これに低分子化合物を組み合わせることで腫瘍への選択性と抗腫瘍活性を増幅する手段について検討した。

本研究の結果、p53欠損型の腫瘍に対してアデノウイルスを選択的に増幅する方法と、特定の脂質合成酵素が正常細胞よりも多く発現している腫瘍で選択的にウイルスを増幅する方法とを見いだした。これらの結果は、腫瘍融解性アデノウイルスの、より強力で選択的な治療法開発の可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスの遺伝子工学的改変技術は、ウイルス治療の進化に貢献してきた。腫瘍選択的に感染し腫瘍細胞内で増殖するウイルスは、根治の難しいがんに対して有効な治療選択の一つとなっている。一方で、遺伝子工学的にウイルスを改変するだけでは、患者ごとに最適な治療法を提供することはできない。本研究では、ウイルスの生物学的特性を応用し、腫瘍の遺伝的背景に合わせて低分子化合物の組み合わせを変えることで、より柔軟なウイルス治療に応用できることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：Malignant mesothelioma is a cancer with poor prognosis and a novel strategy to cure this cancer is needed urgently. We examined whether combinations of oncolytic adenoviruses harboring a genetic region that is specifically activated in tumors instead of the authentic promoter region for the essential gene E1 and small compounds had stronger cytotoxicity and greater replications in mesothelioma cells compared to single use of the virus. We found in this study methods to increase the viral replication and cytotoxicity specifically in p53-deficient tumor cells or in tumor cells expressing a greater level of a specific lipid synthesis enzyme than normal cells. Our findings may lead to a novel stronger and tumor specific therapeutic strategy with oncolytic adenoviruses.

研究分野：ウイルス治療学

キーワード：腫瘍融解性アデノウイルス 細胞周期 がん代謝 脂質合成酵素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1)悪性中皮腫の治療法について

悪性中皮腫は、生存期間を大きく改善する化学療法が無く、放射線及び外科手術療法が困難な難治性疾患である。一方で、主な原因である石綿は経済新興国で使用が継続されており、当該患者が増大すると予測されている。したがって、従来の枠組みにとらわれることなく治療法を開発することが急務である。

#### (2) 腫瘍融解性アデノウイルスについて

野生型アデノウイルスは増殖に伴い細胞死を強力に誘導する。腫瘍特異的に細胞死を誘導する遺伝子組換えアデノウイルス等の増殖性ウイルスは、化学療法耐性の腫瘍に対する画期的新薬となることが期待されている (Nat. Rev. Drug Discov., 14: 369, 2015)。当該ウイルスは中国や米国、欧州では既に医療用医薬品として使用されており、本邦においても食道がんなどで臨床試験が進められている。

ウイルスの胸膜腔投与は、静脈注射に比べて炎症反応による障害リスクが少なく、呼吸運動により胸腔全体に薬剤が広がるため、有用である。また、悪性中皮腫は遠隔転移が末期に至るまで少なく、局所腫瘍の治療が有意義である。そこで、腫瘍で活性が高い転写調節領域 (サバイビン、ミッドカイン) でウイルス増殖に必須の遺伝子 E1 の発現を制御する腫瘍融解性アデノウイルスを作成し、ヒト悪性中皮腫に感染させたところ、検討に用いた 8 種類全ての細胞株で増殖し、細胞死を誘導した。

### 2. 研究の目的

増殖性ウイルスの抗腫瘍活性を高めるために、一般的な化学療法、免疫抑制薬及びアポトーシスを誘導する薬剤との併用が研究されている。本研究では、腫瘍の細胞周期や代謝を標的とした薬剤を用いて腫瘍特異的にウイルスの複製量の上昇を狙う点である。細胞傷害活性を持つウイルスを腫瘍内で効率よく増幅させることで、分子標的薬などの開発が困難な悪性中皮腫に対しても、特異性の高い治療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1)ウイルス遺伝子について

複数種の組換え腫瘍融解性アデノウイルス(細胞表面受容体 CAR に結合するタイプ 5 型及び CD46 に結合するタイプ 35 型アデノウイルス、並びに E1 の発現制御に異なる転写調節領域を使用したもの、または E1B 領域に欠損を持つもの等) を使用し、複製されたウイルス量を感染価 (TCID50) の定量とウェスタンブロット法、ウイルスゲノムの PCR 法で比較した。

#### (2)p53 遺伝子変異との関係について

悪性中皮腫において p53 は野性型であることが多いが、悪性度の高い「肉腫型」においては p53 変異がみられ、これは予後不良因子でもある (Nat. Genet., 48:407, 2016)。本研究においては悪性中皮腫由来の p53 変異株、同野生株を複数種類使用すると共に、siRNA を用いたノックダウン、CRISPR/Cas9-p53 plasmid を用いたノックアウトを行い、p53 遺伝子の変異によるウイルスと薬剤の併用効果の変化について解析した。

#### (3)細胞傷害活性について

細胞傷害活性について、WST アッセイ法、トリパンブルー染色で解析し、特にアポトーシスについては、スローサイトメトリーによる SubG1 画分、Annexin V 染色画分の検出、活性型カスパーゼのウェスタンブロット法での検出によって解析した。また、Mitotic catastrophe については、核酸染色した細胞の顕微鏡観察、M 期マーカー発現量変化、カスパーゼ-2 の分解などで解析した。

#### (4)がん代謝との関係について

腫瘍は正常組織に比べてグルコースを多く取り込んでエネルギーを得る (Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 41:276, 2014)。一方、アデノウイルスは宿主内で解糖系の一部の酵素発現量を高め、ペントースリン酸経路を介して核酸を合成する (Cell Metab., 19: 694, 2014)。また、腫瘍は増殖するため多量の脂質を必要とするが、アデノウイルスはその増殖に脂質を必要としない。そこで、正常組織と腫瘍、さらにアデノウイルスの複製に必要な代謝系の差を標的化して、腫瘍

に比較的に特異性がある解糖系や脂質合成経路を標的とした抗腫瘍薬を用いて、ウイルスの増殖に向けて腫瘍の代謝系を変換し、ウイルスとの併用による抗腫瘍活性の増強を目指した。

#### (5)腫瘍細胞の代謝変化について

悪性中皮腫細胞の第一選択薬の一つであるペメトレキセドに対する薬剤耐性細胞株を樹立し、がん細胞内の代謝変化をウェスタンブロット法で解析した。また、薬剤に対する感受性を WST アッセイ法で検討した。

### 4. 研究成果

#### (1)腫瘍融解性アデノウイルスと細胞周期について

細胞周期進行阻害薬とアデノウイルスを併用したところ、悪性中皮腫細胞株で細胞傷害活性が上昇した。次にこれらの薬剤を併用した培養上清を回収し、これを希釈しながら細胞株に処理したところ、希釈により薬剤の細胞傷害活性はほとんど見られないが、腫瘍内で増幅したウイルスによる細胞傷害活性が見られることがわかった。この増幅したウイルスによる細胞傷害活性を比較すると、p53 欠損株では p53 野生株に比べて、薬剤併用時に細胞傷害活性が上昇することがわかった。TCID50 法によって調べると、p53 欠損株では薬剤併用により複製されたウイルス量が増加していることが示唆された。これらの薬剤を併用した細胞についてウェスタンブロット法で解析するとウイルス由来分子の発現量が上昇し、アポトーシスが強く見られた。一方で、Mitotic catastrophe については、ウイルスと薬剤を併用したことによる上昇は見られなかった。この傾向は、タイプ 5 型及びタイプ 35 型の両方で見られたが、E1B 欠損タイプでは見られなかった。これらの結果から、E1B を発現するアデノウイルスにおいて、当該薬剤を併用すると、p53 欠損型腫瘍に対する抗腫瘍活性が上昇することが示唆された。

#### (2) 腫瘍融解性アデノウイルスとがん代謝について

アデノウイルスはタンパク質と DNA からなり、増殖中の細胞はこれらに加えて脂質を必要とする。そこで、脂質を除去した培地においてウイルス複製量を比較すると、単位細胞辺りのウイルス複製量が明らかに高くなった。脂質合成酵素の発現量が腫瘍細胞で高くなっていることがこれまでに報告されており、悪性中皮腫細胞においても特定の脂質合成酵素の発現量が高くなっていることを示唆するデータが得られた。この脂質合成酵素をノックダウン、あるいは阻害剤によって抑制したところ、ウイルス複製量が増加することがわかった。この分子機構について、ウェスタンブロット法で解析すると、脂質合成酵素阻害により p70S6K の活性が上昇し、ウイルスのタンパク合成を促進している可能性が示唆され、当該酵素の阻害剤を使用すると、ウイルスタンパク質の発現が減少した。これらの結果は、脂質合成酵素の高い活性に依存している腫瘍細胞では、ウイルスと脂質合成酵素阻害薬を併用すると、当該酵素阻害が細胞内代謝にフィードバックされ、ウイルスのタンパク合成が促進している可能性を示唆している。

#### (3) ペメトレキセド耐性細胞について

悪性中皮腫の第一選択薬の一つであるペメトレキセドを薬剤耐性が発生するまで処理した悪性中皮腫細胞株において、その薬剤耐性機構についてウェスタンブロット法で解析すると AMPK リン酸化レベルの上昇が見られた。次に、ペメトレキセドに対する感受性について WST アッセイで調べると、AMPK の活性化剤を使用すると感受性が失われ、AMPK の阻害剤を使用すると感受性が高まることがわかった。これらの結果は、ペメトレキセドに対する悪性中皮腫の耐性化メカニズムについて、AMPK の関与を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Chai, K., Ning, X., Nguyen, T.T.T., Zhong, B., Morinaga, T., Li, Z., Shingyoji, M., Tada, Y., Tatsumi, K., Shimada, H., Hiroshima, K. and Tagawa, M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Heat shock protein 90 inhibitors augmented endogenous wild-type p53 expression but down-regulate the adenovirally-induced expression by inhibiting a proteasome activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 26130-26143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s10147-018-1278-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Morinaga, T., Yamaguchi, N., Nakayama, Y., Tagawa, M. and Yamaguchi, N.	4. 巻 19
2. 論文標題 Role of membrane cholesterol levels in activation of Lyn upon cell detachment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 1811
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.3390/ijms19061811	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Zhong, B., Shingyoji, M., Hanazono, M., Nguyen, T.T.T., Morinaga, T., Tada, Y., Hiroshima, K., Shimada, H., Tagawa, M.	4. 巻 9
2. 論文標題 A p53-stabilizing agent, CP-31398, induces p21 expression with increased G2/M phase through the YY1 transcription factor in esophageal carcinoma defective of the p53 pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am. J. Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 79-93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Masatoshi Tagawa, Thao Thi Thanh Nguyen, Takao Morinaga, Masato Shingyoji, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima
2. 発表標題 An MDM2 inhibitor achieves synergistic cytotoxicity with oncolytic adenoviruses on mesothelioma with the wild-type p53 gene
3. 学会等名 The 14th international conference of the international mesothelioma interested group (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Tada, Takao Morinaga, Ikuo Sekine, Toshio Suzuki, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima, Masatoshi Tagawa
2. 発表標題 Inhibition of the HGF/c-Met for mesothelioma with an intra-pleural injection of the NK4 gene-expressing adenoviral vectors
3. 学会等名 The 14th international conference of the international mesothelioma interested group (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Thao Thi Thanh Nguyen, Takao Morinaga, Boya Zhong, Shuji Kubo, Masato Shingyoji, Yuji Tada, Yuichi Takiguchi, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima, Masatoshi Tagawa
2. 発表標題 Cytotoxicity of Replication-Competent Adenoviruses Defective of E1B55kDa Molecules Is Irrelevant to P53 Expression, but Increases with a P53-Augmenting MDM2 Inhibitor through DNA Damages and Enhanced Viral Propagations in Mesothelioma with the Wild-Type P53 Genotype
3. 学会等名 21st annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Tada, Takao Morinaga, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima, Masatoshi Tagawa
2. 発表標題 A phase1 clinical trial of inhibiting the HGF/c-Met pathway for malignant pleural mesothelioma with NK4 gene-expressing adenoviral vectors
3. 学会等名 24th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takao Morinaga, Thao Thi Thanh Nguyen, Boya Zhong, Shuji Kubo, Masato Shingyoji, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima, Masatoshi Tagawa
2. 発表標題 A Wee1 kinase inhibitor augments apoptosis and replications of adenoviruses in p53-deficient tumor cells
3. 学会等名 24th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	Masatoshi Tagawa, Thao Thi Thanh Nguyen, Takao Morinaga, Boya Zhong, Michiko Hanazono, Masato Shingyoji, Shuji Kubo, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima
2. 発表標題	Inhibitors for the MDM2-p53 interaction increase a DNA damage signal and augment replications of oncolytic adenoviruses in mesothelioma with the wild-type p53 genotype
3. 学会等名	24th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Yuji. Tada, Takao Morinaga, Ikuo Sekine, Toshio Suzuki, Iwao Shimomura, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima, Masatoshi Tagawa
2. 発表標題	Inhibition of the HGF/c-Met for mesothelioma with an intra-pleural injection of the NK4 gene-expressing adenoviral vectors
3. 学会等名	International Association for the Study of Lung Cancer 19th World Conference on Lung Cancer (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	盛永敬郎、グエン タオ、鐘博雅、久保秀司、関根郁夫、多田裕司、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三、田川雅敏
2. 発表標題	Wee1 阻害薬はp53欠損細胞における腫瘍融解性アデノウイルスの複製と感染を増強する
3. 学会等名	第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	鐘博雅、関根郁夫、滝口裕一、グエン タオ、盛永敬郎、多田裕司、山口直人、田川雅敏
2. 発表標題	核酸合成酵素非依存的なペメトレキセート耐性はAICARTを介したAMPKの活性化に関与している
3. 学会等名	第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 グエン タオ、盛永敬郎、鐘博雅、久保秀司、多田裕司、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三、田川雅敏
2. 発表標題 MDM2阻害剤による内因性p53発現上昇は、転写調節因子NF1発現を上昇させ腫瘍融解性ウイルスの増殖を増強させる
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田川雅敏、盛永敬郎、鐘博雅、Nguyen Thi Thanh Thao、久保秀司、多田裕司、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三、山口直人
2. 発表標題 HSP90阻害剤は内因性p53発現を上昇させるが外因性p53発現をプロテアソーム活性で抑制する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 多田裕司、盛永敬郎、鈴木敏夫、下村巖、石綿司、由佐俊和、島田英昭、廣島健三、滝口裕一、関根郁夫、巽浩一郎、田川雅敏
2. 発表標題 胸膜中皮腫を対象としたNK4遺伝子発現ベクター胸腔内投与の第1相臨床試験
3. 学会等名 第25回石綿・中皮腫研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 多田裕司、盛永敬郎、鈴木敏夫、下村巖、由佐俊和、島田英昭、廣島健三、滝口裕一、巽浩一郎、田川雅敏
2. 発表標題 切除不能胸膜中皮腫に対しNK4遺伝子発現アデノウイルスベクター胸腔内投与の安全性を確認する臨床試験
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Morinaga, N.T. Thao, Z. Boya, M. Tagawa
2. 発表標題 Wee1 kinase inhibitor increased cytotoxicity of oncolytic adenoviruses in p53-deficient cells
3. 学会等名 American Society for Cell Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉県がんセンター研究所ホームページ <a href="http://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyujo/">http://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyujo/</a> 千葉県がんセンター研究所Facebookページ <a href="https://www.facebook.com/CCCR1.chiba.gan.kenkyujo/">https://www.facebook.com/CCCR1.chiba.gan.kenkyujo/</a>
---

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