

平成21年5月15日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590798
 研究課題名（和文） キメラ型腫瘍融解性ウイルスとその細胞デリバリー系を用いた消化器固形癌の治療
 研究課題名（英文） Therapeutic strategies with chimeric oncolytic adenoviruses and a cell-mediated delivery system for gastrointestinal solid tumors
 研究代表者
 川村 希代子 (KAWAMURA KIYOKO)
 千葉県がんセンター（研究所）・病理研究部・主席研究員
 研究者番号：80260248

研究成果の概要：

難治性の消化器固形腫瘍に対する治療成績の向上は、癌治療における大きな課題の一つである。そこで生体の免疫応答を抑制しがちな従来の化学療法、放射線療法とは異なり、その可能性のないアデノウイルスを用いた殺細胞効果を検討した。すなわち、細胞傷害活性を有する同ウイルスの増殖を腫瘍細胞特異的に惹起し、正常細胞を傷害せず、腫瘍のみに細胞死を誘導しようとするものである。また腫瘍選択的な抗腫瘍効果をウイルスの改変で増強しうるかどうか、さらに抗がん剤との併用効果の有無についても検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：膵臓がん、ウイルス、がん治療、細胞傷害活性、転写調節

1. 研究開始当初の背景

難治性の消化器固形腫瘍、とりわけ膵癌に対する治療成績の向上は、当該疾患における重要な課題である。従来の化学療法や最近の分子標的医薬の中には、膵癌に対して一部には有効性が確認されている薬剤もあるが、多くの場合当該疾患は予後不良であり、それを打開する方法の一つとして革新的な治療法の探索が求められている。そこで、この新規治療法の確立に向けて、細胞傷害活性を有す

るウイルスを用いた直接的な殺細胞効果を検討することにした。なかでもアデノウイルスは、ヒトに対する発がん性がないことが、多くの疫学調査によって確認されており、またその全遺伝子配列が同定され、しかも塩基配列の短いDNAウイルスであることから、遺伝子組換えが比較的容易なウイルスである。また、これまで遺伝子導入ベクターとして頻用されているアデノウイルスはタイプ5型であり、その受容体はコクサキ・アデノウイ

ルス受容体 (CAR) であることが知られている。アデノウイルスの細胞傷害活性は、ウイルスの増殖によって生じることから、この増殖を巧みに制御し、腫瘍特異的な増殖を誘導することができれば、正常細胞にはほとんど傷害を与えず、腫瘍細胞のみが細胞死に陥ることになる。

また従来の化学療法や放射線療法はしばしば、生体防御反応である免疫応答を著しく減弱させる可能性が高く、そのために免疫応答による抗腫瘍作用から見れば、これらの治療方法は好ましからざる状況を誘導する。これに反して、ウイルスによる細胞傷害活性は、基本的にはウイルス感染から開始されることから、免疫応答を劣化させることはなく、むしろ生体防御機能を増強できる利点がある。したがって、抗原提示機能を適切に行うことによって、細胞死によって腫瘍より漏出するいわゆる腫瘍抗原を、免疫系が捕捉し、この抗原に対して有効な免疫応答を惹起させることも可能となるはずである。

2. 研究の目的

本研究では、細胞傷害活性の高いアデノウイルスを用いるが、目的とする組換え型ウイルスの作成にあたって、(1) 腫瘍特異的なウイルス増殖の誘導 (2) 腫瘍へのウイルス感染効率の増強、(3) ウイルスによる細胞増殖抑制効果の増強、について検討し、とりわけ難治性腫瘍である膵がんを標的として、新規治療法の基盤開発に寄与することを目的とする。

腫瘍特異的な傷害活性を有するウイルスは、いったん腫瘍に感染すると増殖し、その後ウイルス増殖により融解した細胞よりウイルス粒子がたぎつぎと、放出されるというサイクルが繰り返され、比較的少量のウイルスであっても、高い殺細胞効果が得られることが期待される。また、ウイルスによる細胞死の機構が、従来の抗がん剤などと異なると考えられるため、通常の抗がん剤、分子標的医薬をはじめ、各種薬剤との併用効果が誘導されるのではないかと推定される。したがって、上記のウイルスは、これまでの治療法とは異なる機構によるもので、従来の医薬品にはない特徴を有しており、その応用範囲は広いと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍特異的なウイルス増殖の誘導：

細胞融解性を有するウイルスのなかで、野生型のアデノウイルス (タイプ 5 型) の融解能は強力である。そこで、このウイルスの初期応答遺伝子で、ウイルスや宿主細胞の遺伝子の転写を制御する E1 領域遺伝子 (E1A および E1B 遺伝子) の発現を腫瘍特異的に制御すれば、腫瘍に特異性を有した細胞融解を引き

起こすことができるはずである。このためには、膵がんにおいて高頻度に発現上昇が見られるが、正常組織での発現が低い遺伝子の転写調節領域を利用すれば良い。そこで、膵がん細胞をはじめとするヒト消化器がん、高頻度かつ高発現をみる転写調節領域として、細胞増殖速度に応じて発現が亢進するミッドカイン、細胞周期の G2/M 期に特異的な発現をみるサイピン、消化器がんでの発現上昇が著しいコックス 2 遺伝子の転写調節領域を、アデノウイルスの E1 領域の上流に配置した DNA を作成した。この組換えアデノウイルス DNA を、パッケージング細胞である HEK293 細胞に導入して、当該ウイルスを作成した。

(2) 腫瘍へのウイルス感染効率の増強：

(1) で作成するアデノウイルスはすべてタイプ 5 型であり、標的細胞への感染は、ウイルスの外殻蛋白の一種であるファイバー・ノブ部分と細胞側の受容体である CAR 分子との結合に主に依存している。しかし、膵がんをはじめ多くのヒトの腫瘍においては、この CAR の発現レベルがしばしば低下しており、そのため腫瘍への感染力が低下し、高い抗腫瘍効果を得るには大量のアデノウイルスの投与が必要である。そこで、CAR 非依存性の感染を示すアデノウイルス 35 型のファイバー・ノブ構造を、従来の 5 型のものと同様に置換して検討したところ、このキメラ型ウイルスは膵がんをはじめ、消化器がんへの感染力が 5 型に比較して良好であった。35 型ウイルスの細胞受容体は CD46 分子であり、しかも CD46 分子の腫瘍における発現は、むしろ亢進していた。したがって、細胞傷害活性の高い 5 型ウイルスのファイバー・ノブ構造のみを 35 型のそれと置換したキメラ型のウイルスを作製すれば、5 型の強い細胞傷害活性は維持されたまま、腫瘍への感染力が増し、抗腫瘍効果の増強が期待できるはずである。そこで、タイプ 5 型のファイバー・ノブ領域のみをタイプ 35 型と変換したキメラ型で、しかも腫瘍で高い転写調節領域を有するアデノウイルスを作成した。

(3) 細胞増殖抑制効果の増強：

上記ウイルスによる効果を増強するためにいくつかの方法を検討した。その一つがウイルスの腫瘍へのデリバリーを改善する方法であり、もう一つが他の薬剤や他の遺伝子発現との併用効果である。体外から投与されたウイルスは、比較的短期間に腫瘍から漏出し、なかなか腫瘍局所に留まらない欠点を有している。そこで、腫瘍局所にウイルスを産生する細胞そのものを投与し、その細胞からウイルスを放出させた方が、より強い抗腫瘍効果を示すと期待される。そこで、ウイルス

を感染させた正常細胞を、ウイルスデリバリーのツールとしての有用性を検討した。また、腫瘍細胞に特異性を有して細胞死を誘導する MDA-7 (インターロイキン 24) が知られている。当該蛋白は本来免疫系に作用するサイトカインであるが、さまざまな機序で腫瘍細胞死を誘導する。そこで、当該蛋白を発現するアデノウイルスを使用して、上記ウイルスとの抗腫瘍効果について WST 法を用いて検討した。また、従来の抗がん剤 (5-FU, CDDP, MMC, VP-16) との併用効果も合わせて検討した。

4. 研究成果

(1) 腫瘍特異的なウイルス増殖による殺細胞効果：

転写調節領域が異なるそれぞれのウイルスを、4 種類の膵がん細胞 (AsPC-1, PANC-1, MIA-PaCa-2, BxPC-3) に対象に、WST アッセイ法によってその細胞傷害活性を検討してみると、対照として用いたベータガラクトシダーゼ遺伝子を含む非増殖型のウイルスに比較して、有意に当該腫瘍の増殖を阻害した。その阻害効果は、用いた細胞あるいはウイルスによって異なっていたが、陽性対照として用いたサイトメガロウイルスプロモーターで E1 領域遺伝子を制御する増殖性ウイルスと、その傷害活性において大差はなかった。また、増殖性アデノウイルスで、上記の転写調節領域を使用せず、E1B 遺伝子産物のうち 55 キロダルトン分子だけを欠くタイプのウイルスを用いた場合でも、本研究で作成したウイルスはそれ同等の傷害活性を有していた。すなわち、作成した当該ウイルスはそれぞれ、腫瘍細胞に対して強い細胞傷害活性を有していることが判明した。

(2) 感染効率を向上させたアデノウイルスによる抗腫瘍効果：

上記ウイルスはタイプ 5 型であるので、その受容体である CAR 分子の発現レベルによって左右される可能性がある。そこで CAR 発現レベルとタイプ 35 型の受容体である CD46 分子の発現レベルに関して、蛍光を発する遺伝子を有するアデノウイルスを指標に、当該ウイルスの感染効率を比較すると、タイプ 35 型の方が膵がん細胞に対してはより感染効率が高かった。そこで、タイプ 35 型のファイバー・ノブ構造に置換したものと、タイプ 5 型のウイルスの当該細胞に対する細胞傷害活性を比較すると、キメラ型の方がより少ないウイルス量で膵がん細胞を殺傷した。しかし、このとき、タイプ 5 型ウイルスと 35 型のファイバー・ノブ領域を有するキメラ型ウイルスの抗腫瘍効果が、かならずしも、それぞれの受容体である CAR あるいは CD46 分子の発現レベルとも一致しなかった。これは、

上記の受容体分子以外にも、インテグリンなどの分子が第二の受容体として重要であること、あるいはウイルスによる細胞死が、細胞ごとによって異なる可能性があることを示唆している。すなわち、ウイルスの増殖が感染効率によって一義的に決定されるのではなく、アデノウイルスの増殖に関わる細胞側の因子の影響が考えられる。アデノウイルスの増殖に関わる因子はすでいくつか同定されているが、現時点ではそのいずれもがウイルス感受性を決定する主要なものと結論を出すことはできていない。また細胞死に関わる経路の活性化も細胞によって異なると考えられ、このような細胞側の要因によって、ウイルスの殺細胞効果が左右されることが想定される。

(3) ウイルスデリバリーおよび薬剤による併用効果：

ウイルス産生細胞として、正常繊維芽細胞を用いる可能性を検討した。その結果、当該細胞は CD46 分子を発現しており、キメラ型での感染がタイプ 5 型に比較して良好であった。また正常繊維芽細胞では、上記の転写活性化領域でも、下流の標的遺伝子を活性化し得た。すなわち当該細胞は非腫瘍細胞であるが、不死化しておりインビトロの条件下では、細胞周期が回転し細胞増殖が可能であることから、上記領域の転写活性が検出されたものと考えられる。したがって、インビトロでウイルスを感染させ、細胞融解時に感染細胞をインビボ投与ということが可能ではないかと思われる。

また MDA-7 を発現できるアデノウイルスは、感染させた腫瘍を、主に G2/M においてその細胞周期を停止させたが、実際に膵がん細胞を殺傷する効果はあまり高いものではなかった。しかし、当該ウイルスに感染させた後、熱ショック蛋白である HSP90 の阻害剤を作用させると、MDA-7 の発現レベルが上昇し、殺細胞効果が向上する可能性が示唆された。また、従来の抗がん剤と上記の増殖型ウイルスとの併用効果も合わせて検討したが、これらの薬剤との併用効果は、一部の組み合わせで見られたものの、かならずしもすべての薬剤やウイルスで併用効果が得られなかった。このことは抗がん剤によってウイルス増殖が抑制される可能性を示唆しており、この可能性については、今後さらに検討を要すると思われる。また、使用した膵がん細胞はすべて p53 がん抑制遺伝子の変異があったが、当該遺伝子を発現するタイプ 5 型ウイルスを用いても、ほとんど殺細胞効果がみられなかった。しかし、上記キメラ型で細胞傷害活性を有するウイルスと併用すると、両者は相加効果を示すことが判明した。したがって、キメラ型ウイルスは細胞受容体の異なるタイプ 5 型ウ

イルスの遺伝子導入ベクターと併用することが可能であり、両者の併用による効果も期待できる。

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)

[雑誌論文] (計4件)

①Ma, G., Kawamura, K., Li, Q., Suzuki, N., Liang, M., Namba, M., Shimada, H. and Tagawa, M.: Cytotoxicity of adenoviruses expressing the wild-type *p53* gene to esophageal carcinoma cells is linked with the CAR expression level and indirectly with the endogenous *p53* status. *Cancer Gene Ther* (in press). 査読有

②Tagawa, M., Kawamura, K., Ueyama, T., Nakamura, M., Tada, Y., Ma, G., Li, Q., Suzuki, N., Shimada, H., Kuriyama, T. and Ochiai, T.: Cancer therapy with local oncolysis and topical cytokine secretion. *Front. Biosci.* 13: 2578-2587, 2008. 査読有

③Kawamura, K., Yu, L., Tomizawa, M., Shimozato, O., Ma, G., Li, Q., Sato, A., Yang, Y., Suzuki, T., Abdel-Azizi, N. M., Tagawa, M.: Transcriptional regulatory regions of the *survivin* gene activate an exogenous suicide gene in human tumors and enhance the sensitivity to a prodrug. *Anticancer Res.* 27: 89-94, 2007. 査読有

④Yu, L., Shimozato, O., Li, Q., Kawamura, K., Ma, G., Namba, M., Ogawa, T., Kaiho, I. and Tagawa, M.: Adenovirus type 5 substituted with type 11 or type 35 fiber structure increases its infectivity to human cells and enables dual gene transfer in CD46-dependent and -independent manners. *Anticancer Res.* 27: 2311-2316, 2007. 査読有

[学会発表] (計3件)

①Kawamura, K., Ma, G., Li, Q., Ueyama, T., Takei, Y., Tada, Y., Takiguchi, Y., Tatsumi, T., Suzuki, N., Yamaguchi, N., Hiroshima, K., Shimada H., and Tagawa, M.: Replication-competent adenoviruses-mediated tumor cell death is influenced by host-derived factors. *International Society for Cell and Gene Therapy of Cancer* 2008, September 21, 2008, Shijiazhuang, China

②川村希代子, 馬 光宇, 李 全海, 植山太郎, 廣島健三, 島田英昭, 多田裕司, 滝口裕一, 巽 浩一郎, 栗山喬之, 田川雅敏: アデノウイルスによる腫瘍細胞死に対して影響を与える細胞因子の検討、第67回日本癌学会学術総会、平成20年10月28日、名古屋市

③馬 光宇, 川村希代子, 李 全海, 鈴木健夫, 佐藤彩子, 張 正茂, 鈴木信夫, 島田英昭, 落合武徳: Cytotoxicity of Ad bearing the wt *p53* to esophageal cancer is linked with the endogenous *p53* status and CAR expression 第66回日本癌学会学術総会、平成19年10月4日、横浜市

[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

<http://www.chiba-cc.jp/inst/jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川村 希代子 (KAWAMURA KIYOKO)

千葉県がんセンター・病理研究部・主席研究員

研究者番号: 80260248

(2) 研究分担者

田川 雅敏 (TAGAWA MASATOSHI)

千葉県がんセンター・病理研究部・部長

研究者番号: 20171572

山口 武人 (YAMAGUCHI TAKETO)

千葉県がんセンター・医療局・診療部長

研究者番号: 00241969

(3) 連携研究者

なし