

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09681

研究課題名(和文) 難治性膀胱癌に対する革新的バイオ製剤の開発

研究課題名(英文) Development of innovative biopharmaceuticals for refractory bladder cancer

研究代表者

後藤 章暢 (Gotoh, Akinobu)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70283885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR-Cas9技術はがん治療でも期待されるが、Cas9のオフターゲット効果は懸念材料である。そこで我々は、正常組織にオフターゲット効果が及ばないよう、腫瘍細胞の成長因子ミッドカインのプロモーターでCas9遺伝子を制御し、がん細胞特異的にCas9遺伝子を発現させる方法を考えた。
in vitro実験で、ミッドカインプロモーター下でCas9遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターによるがん細胞特異的なCas9発現を確認した。その一方、粒子に毒性があるアデノウイルスベクターの欠陥も問題となったため、同じくミッドカインプロモーター下でCas9遺伝子を搭載したレンチウイルスベクターも開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膀胱がんの症例の7割は筋層非浸潤性膀胱がんであり、難治性で再発を繰り返して悪性度を高める性質があるが、現行の治療法は副作用のため患者のQOL低下が著しいため、効果的で副作用の低い膀胱がん治療法開発は大きな意義がある。

本研究で開発したミッドカインプロモーターとCas9遺伝子の組み合わせは、Cas9遺伝子の発現を悪性細胞に限定することを可能とするため、CRISPR-Cas9のオフターゲット効果による懸念を払しょくするとともに、血管内皮増殖因子を標的とするガイドRNAとの組み合わせによって、腫瘍に対する特異性を欠く現行の血管新生阻害療法の欠点を克服できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The CRISPR-Cas9 is thought to have promising clinical potential. However, the off-target effects of Cas9 are a major concern for its application. Therefore, we hypothesized that the adverse effects of off-target gene editing might be minimized if the human codon-optimized Cas9 (hCas9) could be specifically expressed in cancer cells.

We constructed a chimeric adenoviral vector, Ad5F35-MKp-hCas9, and infected human bladder cancer cell lines with this vector. The hCas9 gene expression was observed in Ad5F35-MKp-hCas9 infected bladder cancer cells but not in non-malignant cells. On the other hand, the cytotoxicity of the adenovirus vector hindered the experiment, we also developed a lentiviral vector for hCas9. Our study showed that the Ad5F35-MKp-hCas9 vector is capable of expressing the hCas9 gene with high specificity in bladder cancer cells. These findings may help in minimizing the risk of off-target effects of gene editing.

研究分野：泌尿器系がん治療

キーワード：CRISPR-Cas9 Midkine Adenovirus Vector Lentiviral Vector

1. 研究開始当初の背景

膀胱がんは一般に生存率の高いがんであるが、症例の7割を占める浸潤性膀胱がんは予後不良で再発を繰り返す傾向がある。こうした難治性膀胱がんに対する現行の治療法は、生活上の著しい不便や苦痛を招いている。

以前に我々は QOL を重視した副作用の少ない治療法開発のため、ウイルス療法に着目して、アデノウイルスベクター Ad5F35/MKp-E1 (以下、Ad5F35) を開発した。Ad5F35 は、従来のアデノウイルスベクターと異なり、がん細胞に多く発現している表面抗原 CD46 を介して感染する。さらに、増殖に必要な遺伝子発現が、がん細胞に多く発現する成長因子ミドカインのプロモーター制御下に置かれ、がん細胞以外では感染/増殖が難しい制限増殖型アデノウイルスベクターである。Ad5F35 は、in vivo および動物実験で腫瘍溶解性ウイルスとして高い抗腫瘍効果を示すとともに、動物の著しい体重減少を招くような副作用も無く、難治性膀胱がんに対する有用性が示された(2011-13 年度基盤 C 23592354)。

しかしながら、臨床応用を考えた場合、アデノウイルスは投与後すぐに抗体が形成されること、成人の多くがアデノウイルス抗体を既に持っていることなどから(Stone et al., J.endocrinology, 2000)、Ad5F35 の治療効果は早期に減退することが懸念される。そのため、Ad5F35 を用いて短期間でより高い治療効果を得るためには、このベクター本来の腫瘍溶解作用に加えてさらに新たな機能が必要であると考え、血管新生阻害療法に着目した。腫瘍組織が成長するには、正常組織と同じく血管から生存に必要な物質を受け取る必要があり、1つの血管内皮細胞は100個程度のがん細胞を養っていると考えられ、血管新生阻害はがん細胞を直接殺すよりも効率が良い治療法と考えられている(樋田 生化学 2012 review)。現在、血管内皮増殖因子(VEGF)の中和抗体ペバシズマブや VEGF 受容体阻害剤スニチニブなどが使用されているが、既存の血管新生阻害療法に共通する無視できない欠点として、正常な血管新生まで阻害するため、時に重大な副作用を起こす危険性がある。これは、既存の血管新生阻害剤が腫瘍組織に対して特異性を持たないことに起因しており、現状では解決困難な問題である。

そこで我々は、がん細胞に対する特異性が高い Ad5F35 を用いて、CRISPR-Cas9 システムを利用して VEGF の発現を抑制できれば、Ad5F35 に懸念される弱点を補完し、かつ腫瘍組織に特異性が高い、安全で強力な血管新生阻害療法を実現できると考え、がん細胞特異的に Cas9 遺伝子を発現させられるベクターの開発を目指した。

2. 研究の目的

CRISPR-Cas9 のオフターゲット効果を抑制するため、がん細胞に多いミドカインのプロモーターを利用してがん細胞特異的に Cas9 ヌクレアーゼを発現させるとともに、VEGFA を標的とするガイド RNA と組みあわせることで、腫瘍組織に特異性が高い、安全かつ強力な血管新生阻害療法を目的とする。

3. 研究の方法

1.) Cas9 導入用アデノウイルスベクター Ad5F35-Mkp-hCas9 の開発

当初の計画では、増殖性を維持して腫瘍溶解性ウイルスとしても作用するキメラ型アデノウイルスベクターに Cas9 遺伝子とガイド RNA を搭載することを考えていたが、効果の確認が難しいという点に、非悪性細胞への影響が無視できなかった。このため計画を変更し、アデノウイルスベクターの増殖能は欠落させることにした。また、同一のベクターにガイド RNA を搭載するよりも容易に応用範囲を広げられるため、ガイド RNA は別のベクターに搭載することにして、まずは腫瘍細胞特異的に Cas9 遺伝子を発現させられるアデノウイルスベクターを作製した。

2.) ミドカインプロモーターの効果の検証

ミドカインプロモーターによって非悪性細胞で遺伝子発現が抑制できるかを調べるため、Ad5F35-Mkp-hCas9 をはじめとする各アデノウイルスベクターを非悪性細胞(ヒト前立腺由来 PNT1a)に感染させた。

3.) ヒト膀胱がん由来細胞における Ad5F35-Mkp-hCas9 ベクターを介した Cas9 遺伝子発現

ヒト膀胱がん由来細胞(253J, UMUC3, 5637)に対して Ad5F35-Mkp-hCas9 を感染させ、Cas9 遺伝子が発現するかどうかを調べた。

4.) sgRNA 導入用 AAV ベクターの開発

ヒト VEGFA を標的とするガイド RNA を搭載した AAV ベクターを外注によって作製した。

5.) レンチウイルスベクターの開発

sgRNA 導入用ベクターにはレンチウイルスベクターを用いることにした。また、アデノウイルス

スペクターのもつ細胞毒性によって Cas9 導入後の実験に支障を来したので、当初の計画を変更し、hCas9 導入用にもレンチウイルスベクターを作製した。

4. 研究成果

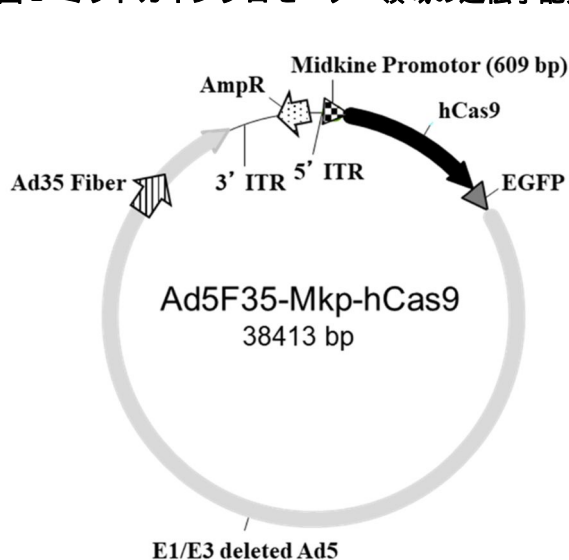
1.) Cas9 導入用アデノウイルスベクター Ad5F35-Mkp-hCas9 の開発

正常細胞への感染を抑制するため、がん細胞に多い表面抗原 CD46 を抗原として感染するよう、5 型アデノウイルスのファイバーノブ領域を 35 型アデノウイルスのものに置き換え、がん細胞に多い成長因子ミドカインのプロモーター領域(図 1)の下流に、目的遺伝子であるヒト最適化された黄色ブドウ球菌由来 Cas9 (hCas9) 遺伝子と、識別用の EGFP 遺伝子を配置したキメラ型アデノウイルスベクター Ad5F35-Mkp-hCas9 を作製した(図 2)。

```

1 GCTTCCCTGCCCACCCGCGGAAACCGCCCCAGGTGGCCGCGCCCCCTCCC 50_
51 CAGCAGCCAGCAGGGCGCCAGGGCTGAGCCGGCCGTGGAGGGGAGCGGGT 100
101 CCCGGGGGTTATACAGGCGCCGGGCGTCCGCGGCAGGCAAGAGAAGCTGA 150
151 GGCCTGAGAACGGCCCCGGGCCTTGCCGTACGGCAGGGGACGACCTGGGAT 200
201 GGGGGCAGCGGGCGGCGGCGCAGGGAGTGGGCCGGGGCCGGTGTGCGCGG 250
251 GCGGGACGGGGCCGGGGTTCGGGAGACCACCGCTCGGAAGATGGGGCCGGG 300
301 AGAGGCCCGCGTTCGACGCGCAGAGGGCACCGCGGGGAGACGCGAGGACG 350
351 CGGGGCCGGGAACACGGACGCCGGAGTAGAAGCGCGGGGGGGGCGGGCTG 400
401 GAGCGGGGGCGGGACGCCGGGTTCGGGGGCGGTGCGGGTTTGAGGGGGAG 450
451 GGGGCGGGGCGGGTCTTCCCTGGGGGGGTGGGGAGAGGGGGCGGGGGCC 500
501 CATGTGACCGGCTCAGACCGGTTCTGGAGACAAAAGGGGCCGCGCGGCC 550
551 GGAGCGGGACGGGCCCGGCGCGGGAGGGAGCGAAGCAGCGGGCAGCGA 600
601 GCGAGTGAG 609
  
```

図 1 ミドカインプロモーター領域の遺伝子配列



また、Ad35 ファイバーノブ領域の効果を検証するための 5 型アデノウイルスベクターを作製した。さらに、ミドカインプロモーターの効果を検証するため、Ad5F35-Mkp-hCas9 のミドカインプロモーターを一般的なサイトメガロウイルス由来のプロモーターに置き換えたベクター (Ad5F35-CMV-hCas9) も同時に作製した。

図 2 Ad5F35-Mkp-hCas9

2.) ミドカインプロモーターの効果の検証

ミドカインプロモーターの非悪性細胞における遺伝子発現を調べるため、Ad5F35-Mkp-hCas9 をはじめとする各アデノウイルスベクターを非悪性細胞(ヒト前立腺由来 PNT1a)に感染させた。PCR の結果、Ad5F35-Mkp-hCas9 は PNT1a にも感染している可能性が示唆されたが(図 3)、その

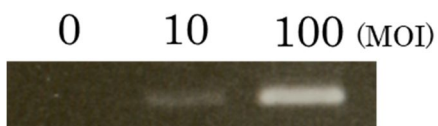


図 3. Ad5F35-Mkp-hCas9 感染 PNT1a における hCas9 の PCR

一方、EGFP の蛍光は Ad5F35-Mkp-hCas9 感染細胞では観察されなかった(図 4. 上)。CMV プロモーターを使用した Ad5F35 ベクターでは一部の細胞に緑色蛍光が観察され(図 3. 中)、また Ad5-CMVp ベクターでは、どの細胞でも強い緑色蛍光が観察された(図 4. 下)。

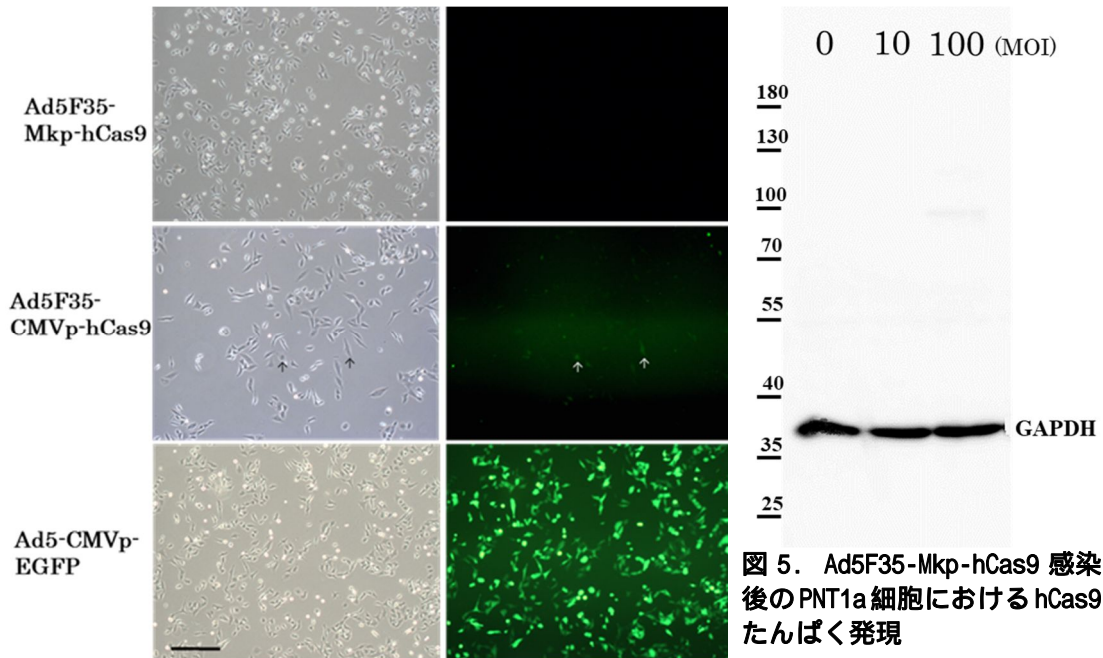


図 4. アデノウイルスベクター感染後の非悪性細胞 (PNT1a)

また、ウエスタンブロッティングの結果、Ad5F35-Mkp-hCas9 感染細胞では hCas9 タンパク発現が確認できなかった (図 5)。以上の結果から、Ad5F35 ベクターは、5 型アデノウイルスベクターと比較して非悪性細胞への感染を大きく抑制することが可能であり、またミッドカインプロモーターの組み合わせで、非悪性細胞における目的遺伝子の発現を抑制できることが示された。

図 5. Ad5F35-Mkp-hCas9 感染後の PNT1a 細胞における hCas9 タンパク発現

3.) ヒト膀胱がん由来細胞における Ad5F35-Mkp-hCas9 ベクターを介した Cas9 遺伝子発現

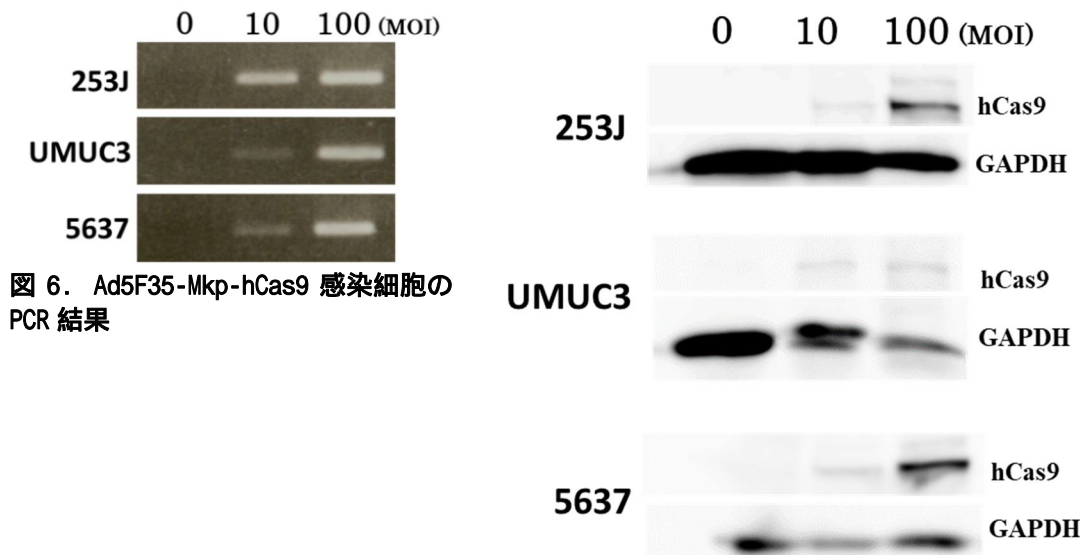


図 6. Ad5F35-Mkp-hCas9 感染細胞の PCR 結果

図 7. Ad5F35-Mkp-hCas9 感染膀胱がん細胞における hCas9 タンパク発現

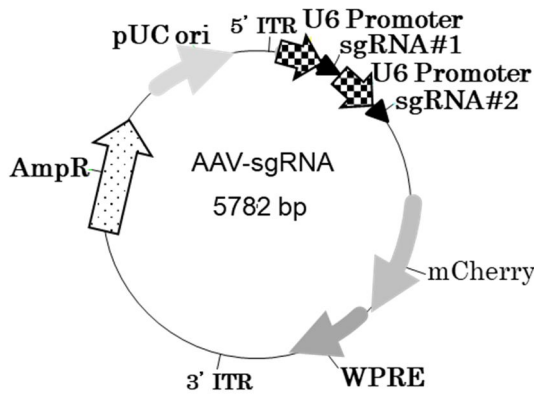
ヒト膀胱がん由来細胞 (253J, UMUC3, 5637) に対して Ad5F35-Mkp-hCas9 を感染させ、Cas9 遺伝子が発現するかどうかを調べた。PCR ではいずれの細胞にも感染が確認され (図 6)、またウエスタンブロッティングでは、低濃度の 10 MOI でも hCas9 タンパク発現が確認できた (図 7)。

しかし、膀胱がんモデルマウス作製に最も使いやすく、また過去の研究では Ad5F35 ベクターの腫瘍溶解効果が最も高かった KK47 細胞 (ヒト膀胱がん由来) では、Ad5F35-Mkp-hCas9 による遺伝子発現が確認できなかったため、担がんマウスを用いた動物実験は行えなかった。

4.) sgRNA 用 AAV ベクターの開発

血管新生阻害因子である VEGF-A を標的としたガイド RNA 配列を組み込んだアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを外注で完成させた。ウイルスベクターには、セロタイプ 2 のアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを使用し、ガイド RNA 配列は、VEGF-A の各ヴァリアント中で共通性が高い Exon 1 から選択して、それぞれを U6 プロモーターの下流に配置して、マーカーとして赤色蛍光

タンパク mCherry を配置した(図 7)。



しかしながら、この AAV ベクターの感染操作後、膀胱がん由来細胞、非悪性細胞ともに細胞に mCherry の赤色蛍光が観察されなかったことから、感染効率が低すぎて使用に耐えないと判断し、AAV ベクターは使用しないことにした。

図 8. VEGF-A を標的とするガイド RNA 配列と AAV ベクター図

5.) レンチウイルスベクターの開発

4.)の結果を受けて、sgRNA 導入用ベクターにはレンチウイルスベクターを使用することに方針を変更し、新たに sgRNA 用レンチウイルスベクター Lenti-VEGFA-sgRNA を作製した。ガイド RNA 配列は、VEGF-A の各ヴァリエント中で共通性が高い Exon 1 から選択して、それぞれを U6 プロモーターの下流に配置して、マーカーとして赤色蛍光タンパク mCherry を配置した(図 9)。

ガイド RNA の配列

sgRNA #1 5' CGACTCGGGCGCTCGGAAGCC 3' 822-841
sgRNA #2 5' GGAGGAAGAGTAGCTCGCCG 3' 930-949

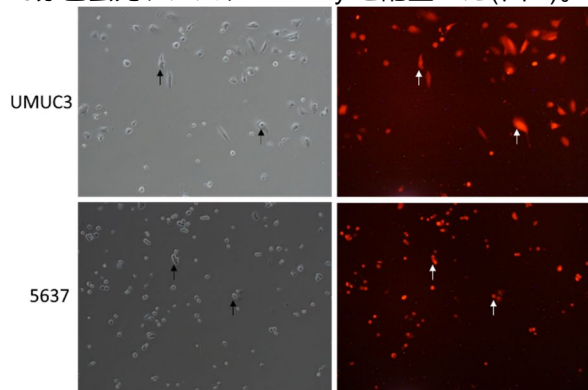
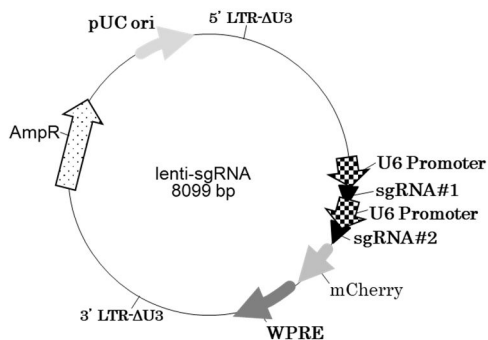
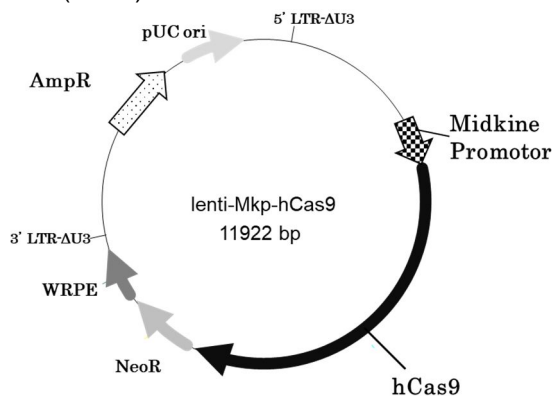


図 10. Lenti-VEGFA-sgRNA に感染した膀胱がん由来細胞

図 9. sgRNA 用レンチウイルスベクター Lenti-VEGFA-sgRNA

Lenti-VEGFA-sgRNA は良好なマーカー遺伝子発現を示した(図 10)。また、アデノウイルスベクターのもつ細胞毒性は、Cas9 導入後の実験に支障を来したので、当初の計画を変更し、hCas9 導入用にもミドカインプロモーターで制御するレンチウイルスベクターを Lenti-Mkp-hCas9 作製した(図 11)。



Ad5F35-Mkp-hCas9 による実験の結果から、ファイバーノブ領域の交換では非悪性細胞への感染は完全には防げないことが示されており、ミッドカインプロモーターによる発現制御だけで非悪性細胞での意図しない遺伝子発現はかなりの程度抑制できると考えられる。

図 11. Lenti-Mkp-hCas9

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 MATSUNAGA WATARU、HAMADA KATSUYUKI、TAGAWA MASATOSHI、MORINAGA TAKAO、GOTOH AKINOBU	4. 巻 41
2. 論文標題 Cancer Cell-specific Transfection of hCas9 Gene Using Ad5F35 Vector	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3731～3740
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15164	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Wataru Matsunaga, Akinobu Gotoh
2. 発表標題 Cancer cell specific expression of Cas9 gene using Ad5F35 vector
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松永渉, 後藤章暢
2. 発表標題 キメラ型アデノウイルスベクターAd5F35によるがん特異的なCas9遺伝子発現
3. 学会等名 第27回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松永渉, 後藤章暢
2. 発表標題 ミドカインプロモーターによるがん細胞特異的なCas9発現
3. 学会等名 第26回国際個別化医療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松永渉, 後藤章暢
2. 発表標題 ミドカインプロモーターを利用したがん細胞特異的なCas9遺伝子発現
3. 学会等名 第1回国際集学的治療学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松永渉, 後藤章暢
2. 発表標題 キメラ型アデノウイルスとミドカインプロモーターによるがん細胞特異的なCas9遺伝子発現
3. 学会等名 第31回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分 担 者	松永 渉 (Matsunaga Wataru) (20415300)	兵庫医科大学・医学部・助教 (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------