

令和 6 年 4 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17462

研究課題名（和文）胆膵癌に対する抗PD-1モノクローナル抗体併用REIC遺伝子治療

研究課題名（英文）Combination therapy of anti-PD-1 monoclonal antibody with REIC gene therapy for pancreatic cancer

研究代表者

内田 大輔（Uchida, Daisuke）

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：50749215

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：膵癌細胞株、胆道癌細胞株、大腸癌細胞株などでAd-SGE-REICとICIの併用効果について検証した。In vitroでは抗PD-1抗体の効果十分に検証できなかったが、一定の効果増強の傾向は確認された。In vivo検証においては、C57BL/6に同種由来の大腸癌細胞株であるColon-26の移植モデルを作成し、Ad-SGE-REICとICI併用によるアブスコパル効果を含めた腫瘍免疫誘導について検証した。Ad-SGE-REICによる局所効果は認められたものの、PD-1抗体単独の腫瘍抑制効果が強く出たため、併用による十分な相乗効果の証明には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害薬や分子標的薬をはじめとした様々ながん化学療法が進歩しているが、難治性消化器癌の根治性はまだ十分とはいえない。本研究において検証した遺伝子治療は、がん治療の新たな治療選択肢の一つとして注目されており、岡山大学において発見されたREIC/Dkk-3は治療ターゲットとして有望ながん関連遺伝子として研究開発が進められてきた。本研究では胆膵がんを中心とした難治性消化器癌における遺伝子治療の可能性を示す有用なデータが蓄積された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the combined effect of Ad-SGE-REIC and ICI in pancreatic cancer cell lines, biliary tract cancer cell lines, and colorectal cancer cell lines. In vitro, while the efficacy of anti-PD-1 antibody was not fully validated, a certain trend of enhanced efficacy was observed. In vivo validation involved creating a transplant model of Colon-26, a syngeneic colorectal cancer cell line, and assessing tumor immune induction including the abscopal effect with combined Ad-SGE-REIC and ICI. While a local effect of Ad-SGE-REIC was observed, the strong tumor suppressive effect of PD-1 antibody monotherapy overshadowed the potential synergistic effect of combination therapy, thus failing to demonstrate sufficient synergistic effects.

研究分野：消化器病学

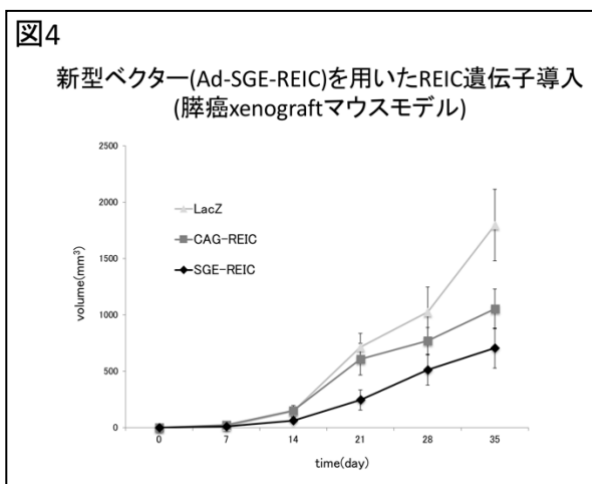
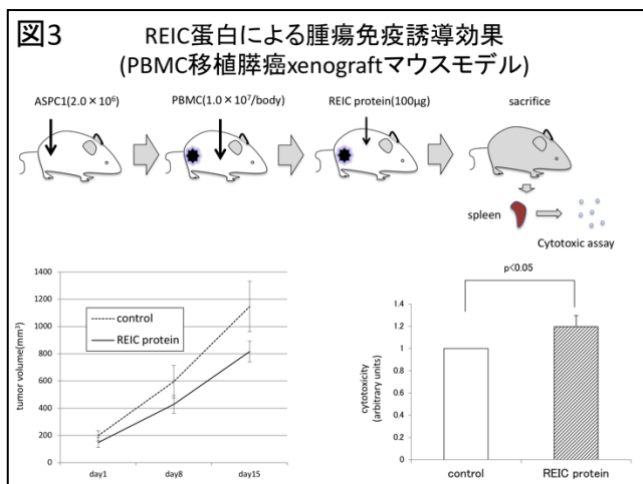
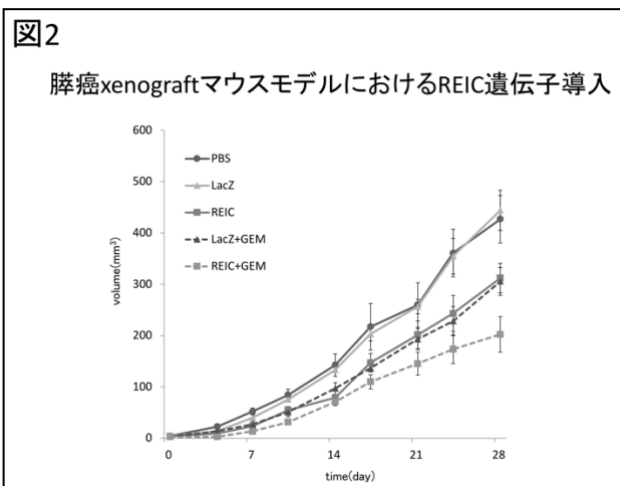
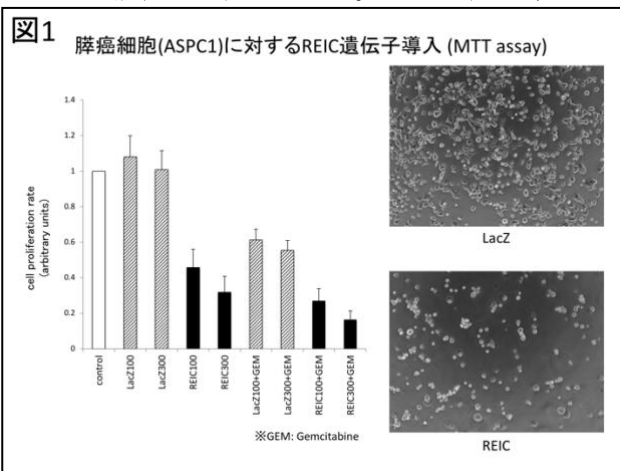
キーワード：遺伝子治療 REIC遺伝子 難治性消化器癌

1. 研究開始当初の背景

膵癌は本邦における癌死亡原因第4位、胆道癌は第6位と非常に予後不良な癌で、根治に至る症例はほぼ存在せず、新規治療法の開発は急務である。REIC(reduced expression in immortalized cell)遺伝子は、本院において独自に単離・同定された癌関連遺伝子である。REIC 遺伝子導入に

よって小胞体ストレス応答を介した癌細胞特異的アポトーシスが誘導され、その抗腫瘍効果は前立腺癌、悪性中皮腫など種々の固形癌において証明されている。我々は膵癌においては第一世代 REIC 遺伝子治療とゲムシタビンを併用することで抗腫瘍効果が増強されることを基礎実験において証明した(Uchida D et al, J Gastroenterol Hepatol, 2014, 図1, 図2)。REICによる癌治療メカニズムとして、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入による局所療法としての効果と、腫瘍免疫を介した全身療法としての効果の2つの抗腫瘍メカニズムが存在する。REIC 蛋白は、Dickkopf (DKK) 関連蛋白の一つである DKK3 として通常体内に存在しているが、REIC 遺伝子導入に伴う副産物として大量に産生される。この REIC 蛋白が樹状細胞を活性化してキラーT細胞(CTL)を誘導することによって腫瘍免疫による抗腫瘍効果を誘導することが報告されている(Watanabe M, et al, Oncol Lett, 2014)。さらに我々は末梢血単核細胞(PBMC)存在下で、REIC 蛋白を投与することでTリンパ球による癌細胞に対する細胞障害性が増強することを証明した(Uchida D et al, J Gastroenterol Hepatol, 2016, 図3)。近年では、導入効率を大幅に改善した第二世代アデノウイルスベクター(Ad-SGE-REIC)が開発され(Watanabe M, Sakaguchi M et al, Oncol Rep, 2014)、膵癌においては従来のベクター以上の抗腫瘍効果を認めた(Sawahara H, Uchida D et al, Cancer Gene Ther, 2016, 図4)。

PD-1(programmed cell death-1)受容体、およびそのリガンドであるPD-L1は、T細胞応答を調節する免疫チェックポイントの役割を持つタンパク質として発見され、近年、がん免疫療法のターゲットとして注目されている(Feng M et al, Cancer Lett, 2017)。米国では2017年に高頻度マイクロサテライト不安定性(MSI-High)を持つ膵癌に対するペンブロリズマブ(抗PD-1抗体)が承認された。今後は腫瘍の遺伝的特性を事前診断し、個別化免疫療法が普及してくることが予測される。



2. 研究の目的

本研究では、抗PD-1抗体併用REIC遺伝子治療が、胆膵癌細胞に対する新たな治療選択肢と

なり得ることを細胞実験、動物実験により証明することである。REIC 遺伝子治療は、従来の遺伝子導入療法と異なり、局所のアポトーシス誘導に加えて腫瘍免疫賦活による抗腫瘍効果も併せ持っている。アデノウィルスベクターでの大きな課題であった導入効率も、新たなベクターの開発により改善されている。

3. 研究の方法

1) PBMC 存在下での消化器癌細胞に対する REIC 遺伝子導入治療による抗腫瘍効果の検証

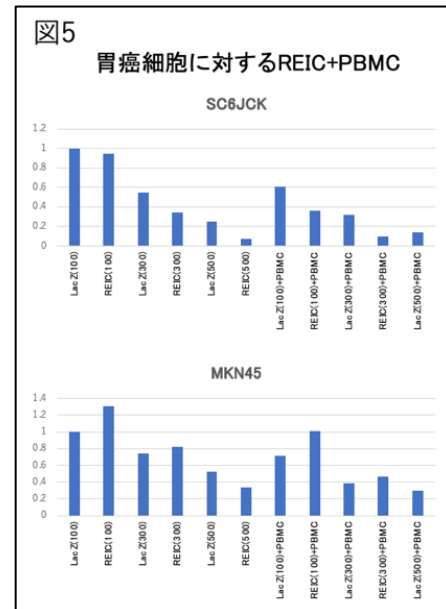
ヒト PBMC 存在下での各種消化器癌細胞に対する REIC 遺伝子導入によるアポトーシス誘導効果、腫瘍免疫誘導効果を検証する。細胞とヒト PBMC を共培養し、REIC 遺伝子は、細胞株に Ad-SGE-REIC を infection することで強制発現させる (Uchida D et al, J Gastroenterol Hepatol, 2014)。コントロール遺伝子として LacZ 遺伝子を導入するアデノウィルスベクター (Ad-LacZ) を用いる。REIC 遺伝子導入によるアポトーシス誘導効果、腫瘍抑制効果を検証する。

2) 消化器癌細胞に対する Ad-SGE-REIC、抗 PD-1 抗体併用による腫瘍免疫誘導効果の検討

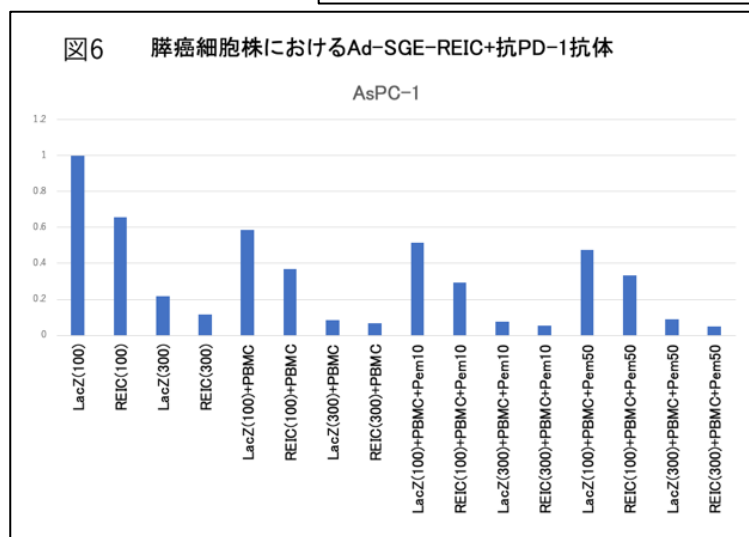
REIC 遺伝子導入と抗 PD-1 抗体を併用することによって、腫瘍免疫誘導効果が増強するかどうかを細胞実験および動物実験で検証する。ヒト PBMC と消化器癌細胞を共培養下で Ad-SGE-REIC および抗 PD-1 抗体を投与し、アポトーシス誘導効果、腫瘍抑制効果を検証する。また動物モデルにおいての検証に関しては、Immunocompetent mouse を用いて Ad-SGE-REIC と抗 PD-1 抗体併用による抗腫瘍効果を検証する。コントロール遺伝子として in vitro と同様に Ad-LacZ を用いる。Ad-LacZ 投与群、Ad-SGE-REIC 投与群、Ad-LacZ+抗 PD-1 抗体投与群、Ad-SGE-REIC+抗 PD-1 抗体投与群に分けて抗腫瘍効果を比較検討する。

4. 研究成果

1) 胃癌細胞株や大腸癌細胞株においても、他癌腫と同様に Ad-SGE-REIC によるアポトーシス誘導効果、および PBMC 存在下での効果増強が確認された (図 5)。しかしながら同じ癌腫でも細胞株によって効果が異なることも他の癌腫同様であり、coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) の発現量などを検証したが、いずれの細胞株でも REIC 遺伝子の overexpression は確認され、CAR の多寡による明確な効果の違いは確認されなかった。小胞体ストレスに起因するアポトーシスシグナル (JNK pathway) を western blotting で確認したところ、一部の癌主では明確なアポトーシス増強が確認できなかったこともあり、回避メカニズムが働いている可能性が示唆された。複数の癌種サンプルを用いたシグナル伝達解析を検証中である。



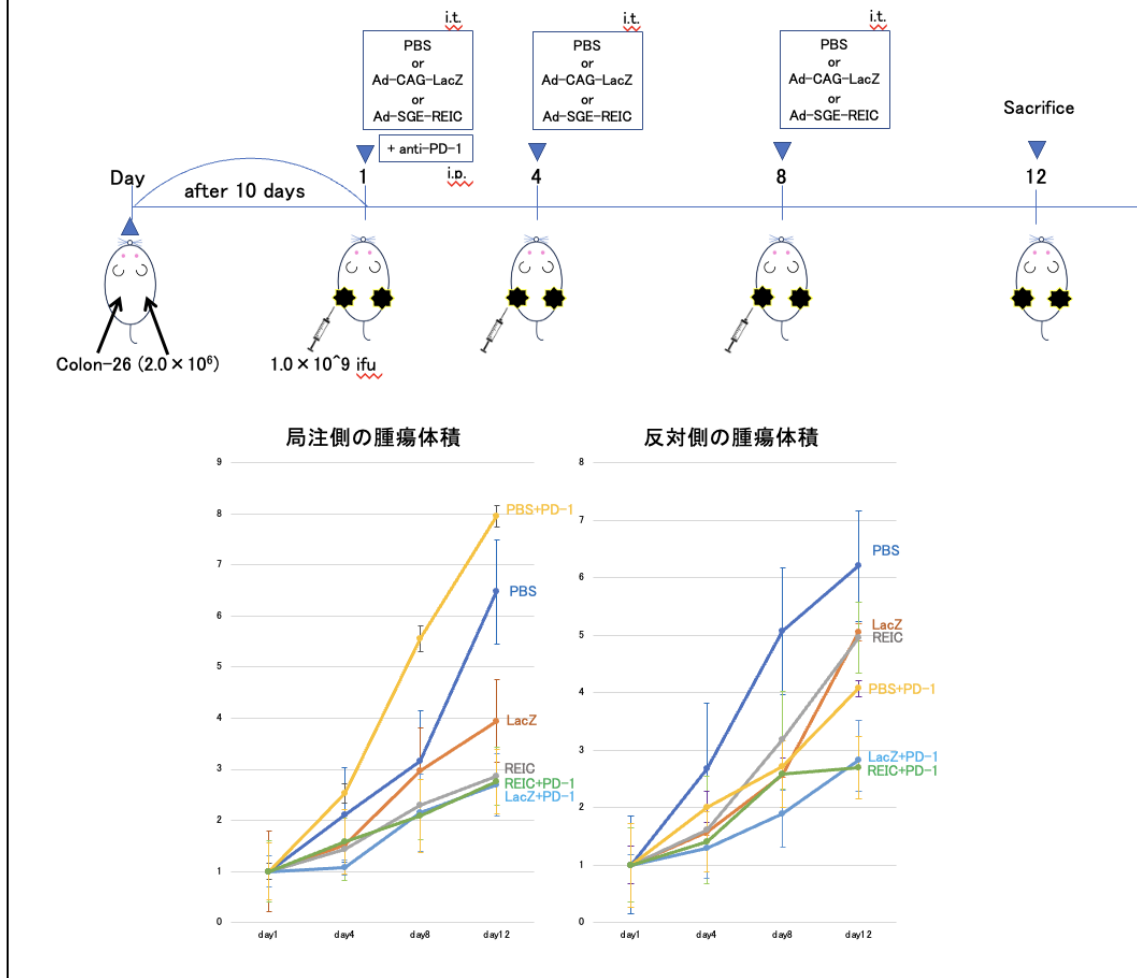
2) 膵癌細胞株に PBMC を共培養し、Ad-SGE-REIC と ICI の併用効果について検証した。In vitro では抗 PD-1 抗体の効果が十分に検証できなかったが、一定の効果増強の傾向は確認された (図 6)。In vivo 検証においては、Immunocompetent mouse として C57BL/6 に同種由来の大腸癌細胞株である Colon-26 の移植モデルを作成した。左右両側に腫瘍移植し、片側にのみ Ad-SGE-REIC を局所投与、さらに抗 PD-1 抗体を投与することで、アブスコパル効果を含めた腫瘍免疫誘導について検証した。



Ad-SGE-REIC による局所効果は認められたものの、PD-1 抗体単独の腫瘍抑制効果が強く出るため、併用による十分な相乗効果の証明には至らなかった。

ICI 投与において、抗原提示を増強する目的で、放射線、重粒子線、BNCT などの局所治療の併

図7 Immunocompetent mouseを用いたAd-SGE-REICと抗PD-1抗体併用効果の検証: アブスコパル効果も含めて



用がアブスコパル効果を引き起こす可能性について、報告は散見するが、免疫状態の前提条件や、投与タイミングなどにも大きく影響されている可能性がある。今後も引き続き種々の癌腫で検討を行っていく必要があると考える。

本研究では、胆膵癌細胞のみでなく、消化管癌においても Ad-SGE-REIC による JNK pathway を介したアポトーシスが誘導されることが確認された。免疫誘導効果による効果増強も確認されたが、PD-1 抗体併用による明らかな相乗効果は認められなかった。一方で、局所の腫瘍細胞破壊による抗原提示増強によって、ICI 投与下でアブスコパル効果を示す報告は散見しており、Ad-SGE-REIC の作用メカニズムからも、同様の効果が得られる可能性は否定できない。さまざまな前提条件を検証しながら、引き続きデータを蓄積していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Emi Tanaka, Daisuke Uchida, Hidenori Shiraha et al.	4. 巻 20
2. 論文標題 Promising Gene Therapy Using an Adenovirus Vector Carrying REIC/Dkk-3 Gene for the Treatment of Biliary Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 64-70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1566523220666200309125709.	査読の有無 有
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Daisuke Uchida, Hidenori Shiraha, Emi Tanaka, Hironari Kato, Hiroyuki Okada
2. 発表標題 The Efficacy of REIC/Dkk-3 Gene Therapy for Pancreaticobiliary Carcinoma
3. 学会等名 UEG week 2019（国際学会）
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------