

平成 23 年 6 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390369

研究課題名 (和文) 転移型・進行非小細胞肺癌治療のための新規ウイルス製剤および投与方法の開発

研究課題名 (英文) Targeting advanced non small cell lung cancer in vivo by pulmonary surfactant -adenovirus -mediated gene transfer

研究代表者

松岡 順治 (MATSUOKA JYUNJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30332795

研究成果の概要 (和文)

肺癌特異的転写システムにより肺癌内で有意に増殖できる増殖型アデノウイルスを作製した。当該ウイルスは肺腺癌細胞株にて特異的細胞死を誘導する一方ヒト正常肺繊維芽細胞での細胞死は低値であった。当該ウイルスの経気管投与は進行非小細胞肺癌モデルマウスにおいて腫瘍増殖抑制効果を示しさらにこの効果は肺胞サーファクタントを混和することで増強された。これらの検討により、肺癌特異的増殖するアデノウイルス製剤と肺胞サーファクタントの併用による進行肺癌に対する新しい治療法の有効性が示された。

研究成果の概要 (英文) :

Pulmonary surfactant has been used as a carrier to deliver a therapeutic virus to dysfunctional lung cells that reside within an intricate lung structure. To investigate whether pulmonary surfactant enhances the efficacy of intratracheal instillation of a therapeutic virus to target advanced non small cell lung cancer *in vivo*, we developed a recombinant adenovirus that induces cell death only in lung cancer cells and injected the adenovirus into an advanced lung cancer model mouse intratracheally with or without surfactant. A therapeutic adenovirus that induces cell death only in lung cancer cells was constructed by combining a lung cancer specific promoter fused to cytotoxic E1A. This adenovirus was intratracheally injected into the KRAS or KRASlung cancer model mice (CCSP-rtTA/Tet-op・K-Ras4bG12D bitransgenic mice or CCSP-rtTA/Tet-op・K-Ras4bG12D・p53- tripletransgenic mice) in the presence/absence of pulmonary surfactant. Intratracheally-injected therapeutic adenovirus with pulmonary surfactant spread to airways as well as to the alveolar region of the lung and caused reduction of lung tumors developed in the lung cancer model mice. The therapeutic adenovirus without pulmonary surfactant spread only to airways and had ten times less effectiveness in tumor reduction. Here, we demonstrate that pulmonary surfactant is an efficient tool to intratracheally deliver a therapeutic virus to treat advanced lung cancer *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：1) surfactant protein 2) non small cell lung cancer 3) adenovirus 4) KRas
5) intratracheal administration 6) TTF1

1. 研究開始当初の背景

切除不能非小細胞肺癌に対する、化学療法・放射線療法の有効性は未だ確立されていない。その中で上皮増殖因子受容体 (EGFR) のチロシンキナーゼを標的とする分子標的薬; gefitinibは、EGFR の特定領域に変異を持つ非小細胞肺癌症例に著明な抗腫瘍効果を示すことが報告された (Paez JG et al. Science 304: 1497-1500, 2004)。また2007年8月間野らは肺癌における新たな活性型融合チロシンキナーゼ (EML4-ALK) を発見し、EML4-ALK遺伝子を有する肺癌に対してALK抑制剤の有効性を報告している (Mano H et al. Nature 448: 561-566, 2007)。一方で、多くの非小細胞肺癌はこれらの標的対象外であり我々はこのような治療抵抗性非小細胞肺癌に対し抗腫瘍効果を誘導するため、肺癌特異的転写システム：TTS (TTF1 gene under the control of hTERT promoter and SPA promoter)を開発、当該システムにより細胞死誘導遺伝子を発現させるアデノウイルスベクター; Ad-TTS/Bax が、 gefitinib耐性を含む癌肺に細胞死を誘導できることを示し、限局性非小細胞肺癌に対する正常組織障害を抑えた新しい治療法を提示した

(Matsuoka J et al. Mol Cancer Ther. 2007)。

2. 研究の目的

肺癌は世界的規模で増加し続けており、現在年間約100万人の肺癌死亡が報告されている。また本邦における2006年の肺癌死亡数は、癌死亡の約2割に達している (厚生労働省・平成18年人口動態統計)。本研究は、肺癌特異的増殖型ウイルス製剤を開発し、そのドラッグデリバリーシステム(DDS)を確立することで、進行非小細胞肺癌に対する新しい治療法の樹立を目的とするものである。

3. 研究の方法

(1)-① 肺癌特異的プロモータを用いた治療型ウイルスの開発
肺癌特異的TTSプロモータ (Matsuoka J et al. Mol Cancer Ther. 2007) 下流に、増殖に必要なE1A遺伝子および抗腫瘍性増強のためのE3遺伝子を挿入し、肺癌特異的制限増殖型アデノウイルスを作製。in vivoにおける機能評価を行った。肺癌細胞内での増殖が不良な場合、肺癌特異的転写部位(TTS)を直列化或いはEnhancerを挿入し、増殖能を強化させたウイ

ルスを開発する必要があったが、*in vitro*での検討において肺癌細胞内での当該ウイルスの選択的増殖能は良好であり、上記処置を施行する必要は無かった。

(1)-② 進行肺癌モデルマウスによる抗腫瘍性の検討

3系統のトランスジェニックマウス(CCSP rt TA・TetK-Ras4b^{12D}・p53^{+/+})の掛け合わせ、doxycycline投与により進行肺癌モデルマウスを作製した。この肺癌モデルマウスに対し、増殖型アデノウイルスを単独で経気管投与を行い抗腫瘍性の解析を行った。

(2)-① 肺胞サーファクタントによるアデノウイルスベクターの肺組織内デリバリー効果の検討

BALB/c マウスにレポーター型アデノウイルスベクター; Ad-CMV/LacZ を肺胞サーファクタントと混和し経気管投与後、X-gal 染色を行うことで遺伝子発現の肺組織内分布を解析した。またサーファクタントの至適濃度および投与回数・間隔に関する検討を行った。投与後の気管支肺胞系に対する病理学的考察を行った。

(2)-② サーファクタント併用下での増殖型ウイルスの抗腫瘍効果の検討

肺癌モデルマウスを使用し、肺胞サーファクタント併用下での肺癌特異的増殖型ウイルスの抗腫瘍効果を解析し、(1)-②との比較検討を行った。

(3)-① 転写遮断剤によるウイルス増殖抑制効果の検討

TTS はグルココルチコイド依存性転写抑制部位を持ち、そのリガンド(デキサメタゾン等)濃度依存性に転写遮断可能である

(Fukazawa T et al. Cancer Res. 2004)。転写遮断薬投与後のおけるによる、ウイルス増殖抑制効果および抗腫瘍性に与える効果を *in vitro* ならびに*in vivo*で解析した。

(3)-② 抗癌剤併用による肺癌特異的増殖型ウイルスの抗腫瘍効果の検討

肺胞サーファクタント併用下での肺癌特異的増殖型ウイルス投与に加え、抗癌剤: シスプラチンを併用し得られる抗腫瘍効果を *in vitro* および *in vivo*にて検討した。

4. 研究の成果

アデノウイルスベクターの全身投与法の安全性は未だ実証されていない。本研究を通して我々は、アデノウイルスの経気管投与における肺胞サーファクタントの肺癌治療への有効性を世界に先駆けて明らかにした。また肺組織内で肺癌特異的に増殖できるアデノウイルスの抗腫瘍性を解析し、肺癌特異的な転写システムが正常組織低障害性のウイルス療法への応用が可能であることを示した。さらにこれらの癌特異的転写ならびに増殖能は外部からのデキサメタゾン投与により減弱したことより、当該ウイルスの中和剤として使用できることが示された。

肺胞サーファクタント併用化での肺癌特異的制限増殖型アデノウイルス経気管投与は、補助療法の効きにくいK-Ras変異型肺癌、またより悪性度の高いK-Rasおよびp53変異型肺癌に対し*in vivo*において抗腫瘍性を示したことから、本研究はEGFR-TKIやALK-inhibitorが無効な肺癌に対する新しい治療法の可能性を提示するものである。今後は、臨床試験を前提とし肺胞サーファクタント併用下での当該ウイルスの安全性を大動物実験にて検証する予定である。

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2件)

① Fukazawa T, Maeda Y, Matsuoka J, Ono T, Mominoki K, Yamatsuji T, Shigemitsu K, Morita I, Murakami I, Tanaka H, Durbin ML and Naomoto Y.

Targeting KRAS Mutation-bearing Lung Cancer In Vivo by Pulmonary Surfactant-Adenovirus-mediated Gene Transfer. Anticancer Research. 125:4925-4935, 2010

② Fukazawa T, Matsuoka J, Tanaka N, Tanaka H, Durbin ML Maeda Y, Naomoto Y. Drug-regulatable cancer cell death induced by BID under control of the tissue-specific, lung cancer-targeted TTS promoter system. Int J Cancer. 125:1975-1984, 2009.

[学会発表] (計2件)

①深澤拓也、肺胞サーファクタントを用いたKRAS変異肺癌を標的とする新規ウイルス療法の開発、日本癌学会、2010年9月24日大阪

②深澤拓也、岡山癌免疫研究会、2010年6月22日、岡山

6. 研究組織

(1)研究代表者

松岡 順治 (MATSUOKA JYUNJI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30332795

(2)研究分担者

深澤 拓也 (FUKAZAWA TAKUYA)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：20379845

小野 俊朗 (ONO TOSHIRO)
岡山大学・自然生命科学研究支援センター・准教授
研究者番号：50185641

縦木 勝己 (MOMINOKI KATSUMI)
岡山大学・自然生命科学研究支援センター・准教授
研究者番号：70304615

田中 紀章 (TANAKA NORIAKI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授 (平成20年度のみ)

研究者番号：10127566
山辻 知樹 (YAMATSUJI TOMOKI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：40379730
(平成20年度から平成21年度まで)

猶本 良夫 (NAOMOTO YOSHIO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：00237190
(平成21年度のみ)

(3)連携研究者

土谷智史 (TSUTIYA TOMOSHI)
長崎大学・医学部・歯学部附属病院・医員
研究者番号：30437884

田中廣壽 (TANAKA HIROTOSHI)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：00171794