

機関番号：82504

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591585

研究課題名 (和文) 間葉系幹細胞をキャリアー細胞とした消化器癌に対する改良型ウイルス療法の開発

研究課題名 (英文) Mesenchymal stem cells infected with modified adenoviruses as carrier cells that target human gastrointestinal tumors

研究代表者

田川 雅敏 (TAGAWA MASATOSHI)

千葉県がんセンター (研究所)・がん治療開発グループ・部長

研究者番号：20171572

研究成果の概要 (和文)：進行固形がんは有用な治療法が乏しく、その予後の改善が大きな問題である。そこで、本研究では遺伝子医薬の開発に焦点をあて、腫瘍において特異性を有して増殖するアデノウイルスを開発し、その抗腫瘍効果について検討した。また、殺細胞効果を高めるため、アデノウイルスにおける細胞受容体結合部分の遺伝子を組換え、腫瘍における感染力を向上させた。また、ウイルスを感染させた細胞をキャリアー細胞として使用する手法の有用性について検討した。

研究成果の概要 (英文)：Majority of human solid tumors, when clinically in an advanced stage, is resistant to most of conventional therapies and consequently improved prognosis with a novel strategy is a crucial target in clinical settings. We developed type 5 adenoviruses which replicated preferentially within tumors and then examined the anti-tumor effects. We also modified the adenoviruses of which the receptor-binding site was replaced with that of type 35 adenoviruses, which subsequently increased the infectivity to human tumors due to a high receptor expression in the tumors. We examined a possible advantage to use carrier cells which were infected with such adenoviruses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
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：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：食道がん、がん治療、遺伝子、アデノウイルス、キャリアー細胞

1. 研究開始当初の背景

難治性の固形腫瘍に対しては有用な治療法に乏しく、多くの場合抗がん剤・放射線療法に耐性であることから、これらの治療法とは異なる細胞死の誘導を基軸とする新規医薬の開発が必要である。そこで本研究では、アデノウイルスの細胞死に着目して、これを利用することにした。同ウイルスは風邪を引き起こすが、発がん性がない一方で、細胞傷害

活性が高いことが知られている。そこで同ウイルスによる細胞傷害活性を、腫瘍特異的に発揮させれば、正常組織には傷害を与えず、腫瘍細胞に殺細胞効果を誘導できるはずである。また当該ウイルスは感染細胞から次々を放出されるので、一旦腫瘍にウイルスが感染すれば周囲の腫瘍細胞もやがて傷害を受けるはずである。一方抗ウイルス作用の免疫応答のため、ウイルス感染によるウイルス血

症等を考慮する必要はなく、通常は同ウイルスは腫瘍局所のみで作用し、全身的な有害事象をもたらすことは少ないと考えられる。このようなウイルスの作製には以下の点が不可欠である。(1) 腫瘍特異性の確保：ウイルスによる細胞死は、ウイルスの増殖によって惹起されるはずなので、当該増殖を制御する初期転写産物であるアデノウイルスの E1 領域遺伝子の発現を、いわゆる腫瘍プロモーターで制御する必要がある。(2) 感染範囲の向上：これまで遺伝子導入等で使用されてきたアデノウイルスはタイプ 5 型であり、その主な細胞側の受容体はコクサキアデノウイルス受容体 (CAR) である。しかし、ヒトの多くの腫瘍においては、この CAR 分子の発現レベルがしばしば低下しており、この結果当アデノウイルスの感染性が減弱する欠点がある。このように、腫瘍に感染性が高くかつ特異性を有するウイルスの作製は上記 2 点の克服が必要である。

2. 研究の目的

難治性腫瘍に対して有用な遺伝子医薬の開発を目的として、上記の 2 点に着目して腫瘍を融解するアデノウイルスを作製する。このためには (1) 腫瘍プロモーターによる E1 領域遺伝子発現の制御、(2) 正常細胞よりも腫瘍において、むしろ高い発現を示す CD 46 分子を受容体とするタイプ 35 型ウイルスとのハイブリッド型ウイルスの作製、について検討する。また、ウイルスそのものによる細胞傷害活性に加えて、抗がん剤との併用効果、あるいはウイルス感染細胞をキャリアーとした場合の効果についても検討する。このような解析は、遺伝子医薬そのものの開発のみならず、がん医療において従来とは異なる治療法として、治療の選択肢の拡大に繋がる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) E1 領域遺伝子にコードされる初期応答蛋白は、感染細胞の細胞周期を S 期に誘導し、かつその他ウイルスの構造蛋白質の転写を誘導する作用がある。そこでアデノウイルス固有の E1 プロモーターを、腫瘍において高発現である遺伝子の転写調節領域と置換すれば、腫瘍に特異性を有して当該蛋白が産生され、結果的にウイルスが腫瘍特異的に増殖するはずである。そこで、上記特徴を有するミッドカイン、サバイビン、COX-2 遺伝子転写調節領域(それぞれおよそ 600-400 塩基対)をシャトルベクター (pShuttle1-PL/E1A-E1B) に挿入し、初期応答蛋白の発現が、上記プロモーターによって制御させることにした。また、当該ベクターを、タイプ 5 型で E1 領域以外の遺伝子を含むベクター、あるいはタイプ 5 型をもとに受

容体結合部位であるファイバー・ノブ領域遺伝子をタイプ 5 型より 35 型へと置換したベクターと結合させて、この DNA を HEK293 細胞に遺伝子導入を行い、上記プロモーターで E1 領域発現を制御するタイプ 5 型あるいはファイバー・ノブ領域のみが 35 型であるアデノウイルスを精製した。

(2) 上記ウイルスを、一定の multiplicity of infection (MOI) で各腫瘍細胞に感染させ、細胞傷害活性を colorimetric な WST 法を用いて、相対的な細胞増殖能を算出した。またこの時の IC50 値を CalcuSyn (BioSoft 社) を用いて算出した。

(3) 上記感染細胞における細胞周期を、細胞をエタノールで固定した後に、propidium iodide で染色し、その細胞を FACSCalibur および CellQuest にて解析した。

(4) 感染細胞における細胞死については、アポトーシスに関わる当該分子のウエスタンブロットにて解析した。

(5) 間葉系幹細胞は市販のものを使用し、当該細胞における遺伝子導入については、green fluorescence protein (GFP) 遺伝子を有するタイプ 5 型ならびに、タイプ 35 型のファイバー・ノブ領域を有するアデノウイルスを一定の MOI で感染させ、GFP 陽性細胞の割合を FACSCalibur、CellQuest を用いて解析した。

(6) 抗がん剤との併用効果については、別な腫瘍融解能を有するアデノウイルスを用いて検討した。このウイルスはタイプ 5 型であるが、E1 領域に存在する E1B-55kDa 分子が欠損したもので、当該遺伝子を欠失させた DNA を用いて HEK293 細胞に遺伝子導入を行い、作製した。この分子は p53 と結合しその活性を消失させる作用があり、そのため同欠損ウイルスは p53 変異あるいはその欠損細胞株では、容易にアポトーシスに陥ることなく、ウイルス産生が継続するという特徴を有している。但し、最近の研究では、この腫瘍特異性はかならずしも p53 の遺伝子変異とは直接的には関係していないことが判明している。しかし、結果的に細胞傷害活性に関して腫瘍特異性が高いことが知られている。

4. 研究成果

(1) アデノウイルスの抗腫瘍効果

① 食道がん細胞における各腫瘍プロモーターの活性：選択したミッドカイン、サバイビン、COX-2 遺伝子の 5' 側に存在する転写調節領域について、当該転写調節領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合させて、この DNA を 6 種類の食道がん細胞を導入し、転写活性化能を検討した。その結果上記プロモーターの活性化能は、多くの場合、SV40T 抗原プロモーターの活性化能よりも高いことが判明した。

②ファイバー・ノブ領域置換による感染効率の向上：食道がん細胞におけるウイルス受容体である CAR ならびに CD46 分子の発現をセルソーターを用いて検討し、さらにタイプ 5 型ならびにファイバー・ノブが 35 型で GFP 遺伝子を有するアデノウイルスを用いて、上記食道がん細胞におけるウイルス感染性を検討した。その結果、6 種類の殆どどの腫瘍で、CAR 分子の発現レベルは対照として用いた HEK293 細胞より低かったが、CD46 分子の発現は、いくつかの細胞では HEK293 細胞より僅かに低く、全体として CD46 分子の発現レベルの方が、CAR 分子の発現レベルよりも高いことが判明した。そこで、上記アデノウイルスの MOI を変えて、食道がん細胞を感染させ、その GFP 発色をセルソーターで検討すると、ファイバー・ノブ領域置換型の方が、タイプ 5 型よりもはるかに高い感染性を有していた。このとき、CAR 発現レベルとタイプ 5 型のアデノウイルスの感染性、CD46 発現レベルと 35 型ウイルスの感染性に強い相関はなかった。

③細胞傷害活性：上記の腫瘍融解性ウイルスを使用して、食道がん細胞を対象に、WST 法を用いて細胞傷害活性を検討した。細胞傷害活性は使用した細胞によって異なっていたが、当該活性は p53 遺伝子の変異とは関係がなかった。すなわち、多くの抗がん剤では、p53 遺伝子の変異がない細胞ほどより効果があることは対照的である。このとき、また一般に同一細胞では、ミッドカインあるいはサバイビンプロモーターによるアデノウイルスの方が、COX-2 プロモーターによるものに比較して、より殺細胞効果が高かった。ルシフェラーゼ遺伝子を使用した転写活性化能の検討では、COX-2 の方が、ミッドカインあるいはサバイビンプロモーターより高い値を示していたので、この結果は予想外であった。また、タイプ 5 型ウイルスは、ファイバー・ノブ領域置換型ウイルスより、抗腫瘍効果が低く、感染性の高い 35 型の方がより強い殺細胞効果を示していた。この傾向は CAR 分子の発現が低いほど明確で、CAR 分子が比較的高い発現レベルにある細胞では、ファイバー・ノブ領域置換による効果は著明ではなかった。なお、すべての実験において、対照として beta-galactosidase 遺伝子を発現する非増殖性のアデノウイルスを使用した。このときタイプ 5 型ならびにファイバー・ノブ領域のみが 35 型のウイルスを、それぞれ相同のウイルスの対照として使用した。

(2) 細胞周期の検討

上記ウイルスを感染させた後の細胞周期について検討した。アデノウイルス感染によって細胞周期が G2/M 期に移行することがある

が、beta-galactosidase 遺伝子を発現するウイルスを感染させた場合、確かに時間経過とともに若干そのような傾向があったが、基本的には G1 期にとどまっていた。一方、腫瘍融解性のアデノウイルスを感染させた場合、食道がん細胞は S 期から G2/M 期に移行し、その後 4N< の領域に相当する分画が増加した。さらに経過を追うと、時間経過とともに sub-G1 期分画が増加した。この時、生細胞数を検討すると、次第に減少しており、細胞周期から判断すると 4N< 領域分画で細胞周期が停止し、その後 sub-G1 期に移行すると考えられた。

(3) 細胞死の検討

上記のウイルス感染によって細胞数が減少したので、細胞死の経路について検討した。細胞周期で sub-G1 期が増加することから、アポトーシスを想定し、ウイルス感染細胞における caspase-3, caspase-8, caspase-9 蛋白の分解を検討したところ、いずれも cleavage が見られず、また PARP の分解も観察されなかった点から、本細胞死はアポトーシスではなく、非アポトーシス経路を介するものであることが推定された。

(4) キャリアー細胞の検討

ウイルスそのものを腫瘍局所に投与することは可能であるが、ウイルスは液体であるため腫瘍局所に留まることが困難で、血流等によって wash out されてしまう。しかし、当該ウイルスを有する細胞を腫瘍局所に投与すれば、同細胞が局所に留まり、その部位からウイルスを放出すれば、抗腫瘍効果が高まると考えられた。そのような細胞の候補が腫瘍集積性を有する間葉系幹細胞であり、あるいは腫瘍の間質を形成する繊維芽細胞である。しかし、同細胞は CAR 分子の発現が低く、タイプ 5 型ウイルスがほとんど感染しない。そこで、ファイバー・ノブ領域置換型のウイルスで GFP を指標として、感染性を検討すると、間葉系幹細胞や繊維芽細胞では十分に感染し、当該ウイルスの有用性が確認された。

(5) 抗がん剤との併用効果

E1B-55kDa 分子が欠損ウイルスは、上記ウイルスと同様に腫瘍融解能を有している。そこで、同分子欠損ウイルスを食道がん細胞に感染させてみると、MOI 依存的に WST 法にて細胞傷害活性が生じていることが判明した。この時、やはり p53 遺伝子型と殺細胞効果は無関係であった。そこで、本欠損ウイルスと、5-fluorouracil, mitomycin C, etoposide, cisplatin の 4 種の抗がん剤との併用効果を検討した。その結果、cisplatin 以外の薬剤との組み合わせによって、細胞傷害活性は増加したが、cisplatin との併用では殺細胞効

果は増強しなかった。この時、ウイルスと抗がん剤投与の順序を検討してみると、上記3種類の抗がん剤のいずれにおいても、同時投与が最も強く細胞傷害活性を惹起していた。この結果は IC50 値の変化を検討すると明確であり、6種類の食道がん細胞のいずれにおいても、欠損ウイルス単独の場合の IC50 値に比較して、抗がん剤との併用の場合、著明に低下していた。また、この併用効果は、動物実験でも確認された。すなわち、食道がん細胞 TE-11 細胞をヌードマウスに移植して腫瘍を形成させた後、欠損型ウイルスを腫瘍局所に注入し、さらに 5-fluorouracil を投与した場合、併用した場合の方が、それぞれ単独投与の場合よりも強い腫瘍増殖抑制効果が確認された。

したがって以上の結果を纏めると、①ファイバー・ノブ領域置換型の腫瘍融解性を有するアデノウイルスは食道がん細胞に対して細胞傷害活性を有していた。②この細胞傷害活性は非アポトーシス経路と推定され、細胞周期の検討では G2/M 期の停止が観察された。③間葉系幹細胞をはじめ腫瘍局所への集積性が高い細胞に対して、ファイバー・ノブ領域置換型の感染性は高かった。④腫瘍融解能を有するウイルスと抗がん剤との併用は有用であった。

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., Okamoto, S., Suzuki, N., Kobayashi, H., Liang, M., Tada, Y., Tatsumi, K., Hiroshima, K., Shimada, H. and Tagawa, M.: Combinatory cytotoxic effects produced by E1B-55kDa-deleted adenoviruses and chemotherapeutic agents are dependent on the agents in esophageal carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 17: 803-813, 2010. (査読有)

②Li, Q., Kawamura, K., Ma, G., Iwata, F., Numasaki, M., Suzuki, N., Shimada, H. and Tagawa, M.: Interferon- λ induces G1 phase arrest or apoptosis in esophageal carcinoma cells and produces anti-tumor effects in combination with anti-cancer agents. *Eur. J. Cancer* 46: 180-190, 2010. (査読有)

③Ma, 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.* 16: 832-840, 2009. (査読有)

④Liu, L., Wang, S., Shan, B., Shao, L., Sato, A., Kawamura, K., Li, Q., Ma, G. and Tagawa, M.: IL-27-mediated activation of natural killer cells and inflammation produced antitumor effects for human esophageal carcinoma cells. *Scand. J. Immunol.* 68: 22-29, 2008. (査読有)

[学会発表] (計8件)

①Masatoshi Tagawa, et al.: Adenoviruses-mediated expression and cell-mediated delivery of interferon-lambda produced anti-tumor effects to human esophageal carcinoma in vivo. 13th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, May 22, 2010, Washington DC

②田川雅敏、その他: インターフェロナーラムダ発現型アデノウイルスによる食道がんに対する抗腫瘍効果、第69回日本癌学会学術総会、平成22年9月23日、大阪市

③Masatoshi Tagawa, et al.: Chimeric adenoviruses with the type 35 fiber-knob structure produce better cytotoxic effects to various human tumors with down-regulated coxsackievirus and adenovirus receptors. 12th annual meeting of American Society of Gene Therapy, May 29, 2009, San Diego

④川村希代子、その他: 制限増殖型アデノウイルスに対する腫瘍細胞の感受性を決定する因子の検討、第68回日本癌学会学術総会、平成21年10月1日、横浜市

⑤Guangyu Ma, et al.: Anti-tumor effects produced by the combinatory use of E1B-55 kDa-deleted adenoviruses and chemotherapeutic agents for human esophageal carcinoma cells. 11th annual meeting of American Society of Gene Therapy, May 29, 2008, Boston

⑥Masatoshi Tagawa, et al.: Type 5 adenoviruses bearing the type 35-derived fiber-knob region enhanced the infectivity and increased the anti-tumor effects to CAR-low expressing tumors. 16th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, November 15, 2008,

Brugge, Belgium

〔図書〕（計 1 件）

Masatoshi Tagawa, Research Signpost,
Cancer Gene Therapy, 2010, 249

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田川 雅敏 (TAGAWA MASATOSHI)

千葉県がんセンター（研究所）・がん治療開

発グループ・部長

研究者番号：20171572

(2) 研究分担者

島田 英昭 (SHIMADA HIDEAKI)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：20292691

(3) 連携研究者

なし（ ）

研究者番号：