

機関番号：16301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591952

研究課題名 (和文) キャリアー細胞を用いた卵巣癌特異的癌ワクチン療法の開発

研究課題名 (英文) ovarian cancer-specific vaccine therapy by carrier cell

研究代表者

濱田 雄行 (HAMADA KATSUYUKI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90172973

研究成果の概要 (和文) : 非小細胞性肺癌細胞 A549 に *GFP* 遺伝子を導入した GFP-A549 にオンコリティックアデノウイルス AdE3-*IAI. 3B* を感染したキャリアー細胞は、AdE3-*IAI. 3B* と *GFP* 両者とも翌日に腫瘍内濃度が最高となり、1 週間まで発現が認められ、2 週間後には消失した。A549 細胞から限界希釈法により、A549 細胞より 10 倍抗腫瘍効果の高い EHK-2 細胞を樹立した。AdE3-*IAI. 3B* 感染 EHK-2 細胞を皮下注射したところ OVHM の皮下腫瘍は 40% のマウスにおいて腫瘍形成が抑制され自家抗腫瘍免疫が誘導されていることが明らかとなった。感染条件を検討したところ、200MOI、33 時間が最も良好な抗腫瘍効果を示した。凍結融解による影響を検討したところ、非感染では影響はなく、AdE3-*IAI. 3B* 感染により核膜の分葉化が認められ、凍結融解により核膜の破綻とアデノウイルス粒子の細胞質への遊出が認められた。この条件下で、20% の *in vitro* における抗腫瘍効果の増大が認められ、*in vivo* においても事前免疫後 90% のマウスが完全治癒となった。腹腔内播種性モデルにおいて、AdE3-*IAI. 3B* 感染キャリアー細胞では、1 匹も完全治癒とはならないが、Ad-*mGM-CSF* 同時感染において 100% のマウスが完全治癒となった。これらのマウスに OVHM を皮下移植したところ、すべてのマウスに腫瘍拒絶が認められ自己抗腫瘍免疫が誘導されていることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : *GFP*-introduced non small cell lung cancer A549 cells infected with oncolytic adenovirus, AdE3-*IAI. 3B* was injected into the mouse subcutaneous tumors and DNA contents of *GFP* and AdE3-*IAI. 3B* in the tumors peaked one day later and disappeared two weeks later. EHK-2 cell was established from A549 cells by limiting dilution and showed the 10 time higher antitumor effect than the original A549 cells. OVHM subcutaneous tumor formation was rejected in 40% of mice after the subcutaneous injection of AdE3-*IAI. 3B*-infected EHK-2 carrier cells. This indicated that xenogenic antitumor immunity was introduced after the injection of carrier cells. The infection condition of carrier cells at 200MOI (multiplicity of infection) and 33 hours showed the best antitumor effect. The morphology of non-infected carrier cells was not changed but AdE3-*IAI. 3B*-infected carrier cells showed the nuclear membrane lobulation. After the freeze and thaw of carrier cells, the lobulated nuclear membrane was ruptured and the adenovirus particles were released from the nucleus into the cytoplasm. Under these infection conditions, the *in vitro* antitumor effect increased by 20% and 90% of mouse showed the complete tumor reduction after the prior immunization of adenovirus. In the mouse model of intraperitoneal dissemination of OVHM ovarian cancer cells, the intraperitoneal injection of AdE3-*IAI. 3B*-infected carrier cells did not cure any mice but the carrier cells infected with Ad-*mGM-CSF* and AdE3-*IAI. 3B* showed the complete tumor reduction in all treated mice after the prior adenoviral immunization. The tumor formation of OVHM ovarian cancer cells was rejected in all complete tumor reduced mice treated with carrier cells and self-antitumor immunity was introduced in these mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、産婦人科学

キーワード：婦人科腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

我々がクローニングした卵巣癌特異的遺伝子プロモーター *IAI.3B* を導入したオンコリティックアデノウイルス *AdE3-IAI.3B* は、卵巣癌特異的に細胞融解作用により抗腫瘍効果を示すが、他のウイルスと同様に抗体による感染抑制により抗腫瘍効果は消失する。*AdE3-IAI.3B* を肺癌細胞 A549 に感染したキャリアー細胞を用いると、アデノウイルス粒子を含有した細胞断片が抗体存在下でも癌特異的に取り込まれ、オンコリティックアデノウイルスによる細胞融解作用のみならず事前免疫による抗アデノウイルス CTL 誘導により腫瘍内投与により極めて強力な抗腫瘍効果を示す。しかしながら、卵巣癌腹腔内播種性モデルにおいて *AdE3-IAI.3B* 感染キャリアー細胞の腹腔内投与では抗腫瘍効果は示さない。卵巣癌においては、容易に腹腔内に転移するため、こうした腹腔内播種に対する治療法を確立することが重要である。

2. 研究の目的

オンコリティックアデノウイルス *AdE3-IAI.3B* に加えてアデノウイルス-*mGM-CSF* を同時にキャリアー細胞に感染し、自己抗腫瘍免疫、A549 が多数の腫瘍マーカーあるいは腫瘍抗原を発現する肺癌細胞であることより自家抗腫瘍免疫を誘導してその癌ワクチン作用による抗腫瘍効果を検討した。

3. 研究の方法

免疫機能が正常な B6C3F1 マウスに同種由来の卵巣癌 OVHM を皮下および腹腔内投与して皮下腫瘍および腹腔内播種性の syngeneic mouse model を作製して、その抗腫瘍効果について検討を加えた。

4. 研究成果

非小細胞性肺癌細胞 A549 から limiting dilution により A549 細胞より 10 倍抗腫瘍効果の高い新たな EHK-2 細胞を樹立でき、これをキャリアー細胞として用いた。

*AdE3-IAI.3B* 感染キャリアー細胞を皮下注射したところ OVHM の皮下腫瘍は 40% のマウスにおいて形成が抑制され、異種性抗腫瘍免疫が誘導されていることが明らかとなった。感染条件を検討したところ、200MOI、33 時間が最も良好な抗腫瘍効果を示した。凍結融解による影響を検討したところ、非感染キャリアー細胞では形態系に変化はなく、*AdE3-IAI.3B* 感染によりキャリアー細胞の核膜の分葉化が認められ、凍結融解により核膜の破綻とアデノウイルス粒子の細胞質への遊出が認められた。抗体存在下、非存在下において 20% の *in vitro* における抗腫瘍効果の増大が認められ、*in vivo* においても事前免疫後 90% のマウスが完全治癒となった。腹腔内播種性モデルにおいて、*AdE3-IAI.3B* 感染キャリアー細胞では、1 匹も完全治癒とはならないが、*Ad-mGM-CSF* 同時感染において 100% のマウスが完全治癒となった。これらのマウスに OVHM を再度皮下移植したところ、すべてのマウスに腫瘍拒絶が認められ自己抗腫瘍免疫が誘導されていることが明らかとなった。

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 5 件)

1. Zhang, T., Hamada, K., Hyodo, M., Itoh, H., Tani, K., Goda, H., Nakashiro, K., Hamakawa, H. Gene therapy for oral squamous cell carcinoma with *IAI.3B* promoter-driven oncolytic adenovirus-infected carrier cells. *Oncology Reports*, 25, 795-802, 2011. (査読有り)
2. Ito, T., Yoshihara, C., Hamada, K., Koyama, Y. DNA/polyethyleneimine/hyaluronic acid small complex particles and tumor suppression in mice. *Biomaterials* 31: 2912-2918, 2010. (査読有り)

3. Yoshihara, C., Hamada, K., Koyama, Y. Preparation of a novel adenovirus formulation with artificial envelope of multilayer polymer-coatings: Therapeutic effect on metastatic ovarian cancer, *Oncology Reports*. 23: 733-738, 2010. (査読有り)

4. Hamada K., Zhang T., Desaki J., Nakashiro K., Ito H., Tani K., Koyama Y., Hamakawa H. Carrier cell-mediated cell lysis of squamous cell carcinoma cells by squamous cell carcinoma antigen 1 promoter-driven oncolytic adenovirus. *Journal of Gene Medicine*, 12:545-554, 2010. (査読有り)

5, Terao, S., Acharya, B., Suzuki, T., Aoi, T., Naoe, M., Hamada, K., Mizuguchi, H. and Gotoh, A. Improved gene transfer into renal carcinoma cells using adenovirus vector containing RGD motif. *Anticancer research*, 29, 2997-3002, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計 34 件)

1, 濱田雄行、キャリアー細胞による液性免疫解除機構を利用した癌遺伝子治療薬の開発、第 8 回バイオビジネスコンペ JAPAN、2008 年 2 月 19 日、シティプラザ大阪、大阪市。

2, Hamada, K., Zhang, T., Nagai, A., Sawazaki, T., Sumida, M. Induction of antitumor effect by CTL response after the preimmunization of adenovirus in carrier cell-mediated oncolytic adenovirus infection. 99<sup>th</sup> AACR, April 12-16 (13), 2008, San Diego, USA.

3, 濱田雄行、キャリアー細胞全身投与による卵巣癌特異的細胞性免疫性遺伝子治療。第 60 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会、4 月 12 日-15 日 2008 年、パシフィコ横浜、横浜市。

4, Zhang, T., Hamada, K., Goda, H., Nakashiro, K., Hamakawa, H. Title: SCCA1 Promoter-driven Replication-selective Adenovirus for Oral Cancer Gene Therapy. 12th International Congress on Oral Cancer, May 22-25, 2008, Shanghai, China.

5, Hamada, K., Zhang, T., Hattori, Y., Sawazaki, T. and Sumida, M. Gene therapy for solid tumors by A549 carrier cells infected with oncolytic adenovirus driven by IAI.3B promoter. 11th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy. May 28- June 1 (30), 2008. Boston, USA.

6, Shirakawa. T., Hamada, K., Kitajima, K., Mitsuoka, C., Jin, H., Morishita, N., Yamaoka, N., Terao, S., Gotoh, A., Matsuoka, T., Adhim, Z., Nibu, K., Fujisawa, M., Kawabata, M., Wu, J., Zhou,

L., Cao, H., Huang, W. Pre-clinical studies of GMJ2.1: Carrier cell-based adenoviral oncolytic virotherapy for head and neck squamous cell carcinoma.

International Society for Cell and Gene Therapy of Cancer China Conference. September 19-22, 2008, Shijiazhuang, China.

7, 濱田雄行、川田真美、張 婷、白川利朗 キャリアー細胞を用いた細胞性免疫性癌遺伝子治療の感染抑制解除機構と前臨床試験。第 46 回日本癌治療学会総会、10 月 30 日、2008 年、名古屋。

8, Hamada, K., Kawada, M., Zhang, T. Cellular and immune gene therapy for various solid tumors by *IAI.3B* promoter-driven oncolytic adenovirus. 第 67 回日本癌学会、10 月 28 日-30 日 (28), 2008 年, 名古屋。

9, 小山義之、濱田雄行、伊藤智子、芳原智恵子。極微細なプラスミド複合体の調製とその治癒効果。第 19 回アンチセンス RNA-DNA 研究会。11 月 3-6 日、2008 年、福岡。

10, 濱田雄行、癌完全治癒を目指した癌遺伝子治療薬の研究開発と事業化についての進捗状況。第 6 回ジュニアアドベンチャー選手権、11 月 25 日、2008 年、松山。

11, パネルディスカッション 濱田雄行、高知発 癌治療フォーラム—癌は不治の病ではない—「癌治療研究の現状と今後の展開」、JST イノベーションサテライト高知、2008 年 2 月 10 日、高知。

12, 講演、濱田雄行、キャリアー細胞を用いたオンコリティックアデノウイルスによる癌特異的遺伝子治療とその免疫原性克服機構、九州大学先端高分子治療科講演会、2008 年 4 月 28 日、福岡。

13, 講演、濱田雄行、キャリアー細胞による遺伝子治療と動物医薬への応用、化血研 KIKUCHI バイオセミナー「三風会 \*」講演会、2008 年 11 月 19 日、熊本。

14, 小山義之、濱田雄行、腫瘍免疫遺伝子治療動物医薬の開発とヒト治療薬への展開、第 9 回バイオビジネスコンペ JAPAN、2009 年 2 月 2 日、シティプラザ大阪、大阪市。

15, Hamada, K., Zhang, T., Huang, W. Preclinical test of oncolytic adenovirus-infected carrier cells for ovarian cancer. 12th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy. May 27-30, 2009, San Diego, USA.

16, Koyama, Y., Yoshihara, C., Hamada, K. Preparation of polymer-coated adenovirus particles and their therapeutic effects in mouse tumor models. 12th Annual Meeting

of American Society of Gene Therapy. May 27-30, 2009, San Diego, USA.

17、Shirakawa, T., Hamada, K., Kitajima, K., Mitsuoka, C., Morishita, N., Yamaoka, N., Saito, A., Matsuoka, T., Adhim, Z., Terao, S., Gotoh, A., Nibu, K., Fujisawa, M., Lee, K., Huang, W. Intravenous injection of allogeneic tumor cell vaccine carrying oncolytic adenovirus (AdE3-IAI.3B) suppresses the growth of multiple lung tumors in mouse squamous cell carcinoma model. 12th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy. May 27-30, 2009, San Diego, USA.

18. Ito, T., Hamada, K., Yoshihara, C., Koyama, Y. High level therapeutic effects of fine plasmid/PEI/Hyaluronic acid ternary complex particles in tumor model mouse. 12th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy. May 27-30, 2009, San Diego, USA.

19、Terao, S., Acharya, A., Suzuki, T., Hamada, K., Mizuguchi, H., Gotoh, A. Improved gene transfer into renal carcinoma cells using an adenovirus vector. 12th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy. May 27-30, 2009, San Diego  
20、Hamada, K. Pharmacological and biosafety test of cancer gene therapy by oncolytic adenovirus - infected carrier cell. 100th AACR annual meeting 2009. April 18-22, 2009, Denver, USA.

21、濱田雄行, 伊藤智子、芳原智恵子、小山義之。 Polyanion-coated nanoparticle を用いた新たな DDS による癌特異的免疫遺伝子治療。 第 61 回日本産科婦人科学会学術講演会。 2009 年 4 月 3-5 日、京都。

22、奥富さやか、芳原智恵子、伊藤智子、民輪雅美、高村健太郎、濱田雄行、小山義之。 自己会合性ポリペプチドゲルを用いた徐放型遺伝子導入注射剤の開発。 日本 DDS 学会。 2009 年 7 月 3-4 日、東京。

23、濱田雄行。 キャリアー細胞を用いたオンコリティックアデノウイルスによる細胞性免疫性癌遺伝子治療の開発。 第 68 回日本癌学会、2009 年 10 月 1-3 日、横浜。

24、芳原智恵子、濱田雄行、小山 義之。 人工エンベロープを持つハイブリッド型アデノウイルスの調製とその遺伝子治療効果。 第 68 回日本癌学会、2009 年 10 月 1-3 日、横浜。

25、濱田雄行、張婷、白川利朗。 キャリアー細胞を用いた細胞性免疫性癌遺伝子治療の前臨床試験。 第 7 回日本臨床腫瘍学会学術集会。 2009 年 3 月 20-21 日、名古屋。

26、小山義之、芳原智恵子、濱田雄行。 ポリマーで多重層コーティングしたアデノウ

イルスの調製とその抗腫瘍効果。 第 19 回バイオ・高分子シンポジウム。 2009 年 7 月 29-30 日、東京。

27、Shirakawa, T., Hamada, K., Kitajima, S., Mitsuoka, C., Saito, A., Matsuoka, T., Adhim, Z., Terao, S., Gotoh, A., Nibu, K., Fujisawa, M., Lee, K. Intravenous Injection of the carrier-cell based oncolytic adenovirus suppresses the growth of multiple lung tumors in mouse squamous cell carcinoma model. 第15回日本遺伝子治療学会、2009年6月9日-11日、大阪大学、大阪。

28、寺尾秀治、Acharya Bishunu、鈴木透、濱田雄行、後藤章暢。 ヒト膀胱癌細胞株に対するIAI.3Bプロモーターを組み込んだ制限増殖型アデノウイルスベクターの有用性の検討。 第59回日本泌尿器科学会中部総会、2009年10月29-31日、金沢。

29、芳原智恵子、小山義之、濱田雄行。 人工エンベロープを付与した腫瘍溶解性アデノウイルスによるガン遺伝子治療効果。 第31回日本バイオマテリアル学会、2009年11月16-17日、京都。

30、小山義之、芳原智恵子、伊藤智子、濱田雄行。 ポリアニオンで被覆した微小なプラスミド複合体による抗腫瘍遺伝子治療効果。 第31回日本バイオマテリアル学会、2009年11月16-17日、京都。

31、小山義之、濱田雄行、腫瘍免疫遺伝子治療動物医薬の開発とヒト治療薬への展開。 第9回バイオビジネスコンペ JAPAN、2009年2月2日、シティプラザ大阪、大阪市。

32、Terao, S., Acharya, B., Suzuki, T., Hamada, K., Mizuguchi, H., Gotoh, A. Improved gene transfer into renal carcinoma cells using an adenovirus vector. 13rd Annual meeting of American society of gene and cell therapy (ASGCT) 19-22, May, 2010, Marriot Wardman Park Hotel Washington DC, USA.

33、Hamada, K., Zhang, T., Nakashiro, K., Hamakawa, H. Gene therapy for head and neck squamous carcinoma cells by IAI.3B promoter-driven oncolytic adenovirus-infected carrier cells. 13rd Annual meeting of American society of gene and cell therapy (ASGCT) 19-22, May, 2010, Marriot Wardman Park Hotel, Washington DC, USA.

34. Koyama, Y., Tojyo, M., Yoshihara, C., Hamada, K. and Ito, T. Small plasmid/PEI/anionic polysaccharide ternary complex particles: toxicity and animal clinical study. 13rd Annual meeting of American society of gene and cell therapy (ASGCT) 19-22, May, 2010, Marriot Wardman Park Hotel,

Washington DC, USA.

35. 濱田雄行, 伊藤智子、芳原智恵子、小山義之. 超微細粒子化コンドロイチン硫酸-被覆 DNA 複合体を用いた新たな DDS による癌特異的免疫遺伝子治療 第 62 回日本産婦人科学会総会、2010 年 4 月 22-25 日、東京.

36. 小山義之、芳原智恵子、濱田雄行. 人工エンベロープを持つ腫瘍溶解性アデノウイルスの調製とその卵巣腫瘍腹腔内転移モデルにおける遺伝子治療効果 第 62 回日本産婦人科学会総会、2010 年 4 月 22-25 日、東京.

37. Hamada, K., Zhang, T., Shirakawa, T., Huang, W. Preclinical biosafety test of oncolytic adenovirus-infected carrier cell for phase I study. 101th annual meeting of American society of cancer research(AACR), 4-17-22, 2010 Washington DC, USA.

〔図書〕(計 2 件)

1, 濱田雄行. 平成 19 年度ジュニアアドベンチャー選手権者による進歩状況報告書、平成 20 年 11 月 25 日、最優秀賞、癌完全治癒を目指した癌遺伝子治療薬の研究開発と事業化、p1-6、2008 年 11 月、愛媛県テクノプラザ編集

2, Katsuyuki Hamada. Cancer gene therapy, 13 gynecologic gene therapy, 195-210, 2010, Research signpost, M. Tagawa edt.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

濱田 雄行 (HAMADA KATSUYUKI)  
愛媛大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：90172973