

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390450

研究課題名（和文） 難治性婦人科がんに対する腫瘍融解ウイルス治療法の開発

研究課題名（英文） Development of oncolytic virotherapy against the refractory gynecologic cancers

研究代表者

井上 正樹（INOUE MASAKI）

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：10127186

研究成果の概要（和文）：本研究では薬剤抵抗性を示す癌細胞にはテロメラーゼ依存性腫瘍溶解ウイルスが有効であることを示した。特に、表面抗原 CD117/CD44 陽性細胞は高い増殖能を示しプラチナ抵抗性である。この分画の細胞集団にテロメラーゼ依存性腫瘍溶解ウイルスの効果を *in vitro* で検討した。シスプラチン抵抗性癌細胞やヌードマウス腹膜播種モデルでも同様に抗腫瘍効果が観られた。これは融解ウイルスが薬剤抵抗性の難治性癌に有効であることを示唆する。

次に、GFP 発現型テロメラーゼ依存性腫瘍溶解ウイルス（OBP-401）によって GFP 発光させ、肉眼的に可視した数個の末梢血液中の腫瘍細胞（CTC： Circulating Tumor Cell）を回収できた。Whole Genome Amplification 法にてゲノム増幅後、HPV consensus primer にて PCR・制限酵素反応を行なったところ、原発巣と CTC において同一の HPV-genome が検出された。本法は様々な腫瘍での応用が可能であり、生検不能な深部病変の診断、治療法決定や癌の早期診断、非侵襲性のがん検診等に有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Despite tremendous development in chemotherapy for refractory gynecologic cancers over the past few decades, the prognosis of the advanced cases is still unsatisfactory, and novel treatment modalities are urgent needed. We developed virotherapy for solid tumors using telomerase-specific replication-selective adenoviruses (OBP-301), in which the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene promoter has been inserted to direct tumor-specific E1 gene expression. In vitro treatment of Ovarian cancer cell with OBP-301 induced significant cell death in dose-dependent manner, although normal cells showed no significant cell death. Xenograft mouse model of ovarian cancer cells showed the improved survival of mice treated with Telomelysin. These findings support the therapeutic potential of virotherapy using oncolytic virus.

OBP401 in which GFP gene is driven by the CMV-promotor, selectively replicates only in telomerase-positive cells, and therefore may be a tool for cancer screening. We collected a single cell with GFP from blood samples of cervical cancer patients and detected the same HPV-genotype in both CTC and original cancer tissues. This finding suggests that CTC detecting by OBP401 is the useful non-invasive diagnostic way for cancer screening and early detection of recurrent malignant tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：テロメラーゼ、腫瘍融解ウイルス、難治性がん、腫瘍可視化、末梢血中腫瘍細胞、非侵襲性癌診断、遺伝子診断、先進医療

1. 研究開始当初の背景

我が国において癌は死亡原因の一位を占める。最近の医学・医療の進歩により治癒率の向上がみられるが、晩期癌は言うに及ばず抗癌剤や放射線抵抗性を示す癌はその種類を問わず依然として難治性である。その原因の一つは、癌細胞が抗癌剤に抵抗性を示すことにある。癌細胞は初期に薬剤感受性を示しても再発期には種々の側副経路を構築して薬剤耐性を獲得している。もう一つの大きな原因は再発や残存病変の早期発見が困難である点である。したがって、薬剤耐性を獲得した癌細胞を全く別の概念から殺効果を見いだすことや再発巣を含めた初期病変を非侵襲性に発見することが急務である。特に最近では、分子標的薬の臨床への導入により癌の遺伝子変異や癌細胞内情報伝達系の解明はその治療の面においても重要性を増してきている。特に、微小検体を用いた非侵襲性の検査法の開発は重要である。しかしながら、微小検体には病変部が含まれ可能性は減少する。そこで、効率よく腫瘍細胞を補足し細胞内遺伝子情報を検出するシステムの開発が望まれる。

2. 研究の目的

本研究では、難治性を克服すべく、我々が従来から研究を進めてきたテロメラーゼ活性を組み込んだ新しい概念に基づき、ウイルス自体を活性化し、ウイルスによる細胞殺効果を用いたウイルスによる腫瘍融解療法 (Oncolytic Virotherapy) を開発すること、さらに、このウイルスを用いて非侵襲性に癌細胞を血液中の極少数の腫瘍細胞 (CTC: Circulating Tumor Cell) を検出する方法を

開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)RAD の癌細胞と正常細胞における感染効率の検討

アデノウイルスゲノムの E1A 遺伝子上流に hTERT プロモーターを組み込んだ腫瘍融解ウイルス (TRAD) を作成し、子宮癌細胞株、卵巣癌細胞株および子宮頸部、子宮内膜、卵巣の初期培養正常細胞に感染させウイルス量を測定し、癌細胞と正常細胞でのウイルス複製能を評価する。同時に、より安定的に効果を発揮する TRAD クローンを単離し、量産化への検討を行う。

(2)RAD の殺細胞効果と腫瘍抑制効果

TRAD を精製分離し上記の各種婦人科癌細胞株に感染させ、感染効率および殺細胞効果を確認する。主として WST-1 assay およびクマーシーブルー染色法を用いる。また TRAD に蛍光物質 Green Fluorescence Protein (GFP) の遺伝子を組み込んだウイルスを作製し (TRAD-GFP)、導入効率等も併せて評価する。

(3)RAD の周囲組織や遠隔転移巣への伝搬能の検討

TRAD は本質的にはアデノウイルスであるため、局所のみならず転移巣での TRAD の増殖複製も期待される。マウスで転移モデルを作製の上、側背の上原発巣に TRAD を局所注入後に遠隔腫瘍組織から TRAD-DNA の同定および E1A 蛋白の発現を確認する。すなわちウイルスの遠隔巣での発現を検証する。

(4)RAD-GFP の動物実験系での可視化の検

討

TRAD-GFP(蛍光誘導遺伝子を組み込み)を各種婦人科がん細胞株や生体から採取した癌細胞や正常細胞に種々の濃度で感染させ、経時的に蛍光強度を測定する。GFP 発現を観察して至適濃度および至適時間を検討する。ヌードマウス実験系においても、移植腫瘍や転移病巣の可視化が可能であるか検討する。アデノウイルス DNA 量と蛍光との関連も検討する。

(5)血液中の腫瘍細胞の検出

GFP 発現型テロメラーゼ依存性腫瘍溶解ウイルス(OBP-401)によって GFP 発光させ、肉眼的に可視した末梢血液中の腫瘍細胞(CTC: Circulating Tumor Cell)を顕微鏡観察下に超微量ピペットで単離し、一個の腫瘍細胞の遺伝子解析を行うシステムの解析を行う。これにより少数の腫瘍細胞の検出と腫瘍の遺伝子解析が可能となる。

4. 研究成果

卵巣癌細胞株 SKOV3 を FACS により表面抗原 CD117 と CD44 の発現の有無で癌幹細胞の同定を行い、各分画を回収し、増殖能、コロニー形成能、マウスでの造腫瘍能を各々の分画で評価した。CD117 陽性 CD44 陽性の細胞分画は他の分画に比べて *in vitro* で高い増殖能とコロニー形成能を示し、またマウスでの造腫瘍能も高く癌幹細胞の候補と考えられた。この分画は cisplatin に対して抵抗性が高かったがテロメラーゼ依存性腫瘍溶解には高感受性を示した。また cisplatin 存在下では CD117/CD44 発現分画の増加が認められたがテロメラーゼ依存性腫瘍溶解ウイルスの存在下ではこの変化は消失した。以上より、CD117 陽性 CD44 陽性の卵巣癌幹細胞は cisplatin 抵抗性を示したがテロメラーゼ依存性腫瘍溶解には感受性であり、プラチナ抵抗制卵巣癌への応用あるいはプラチナ製剤との併用療法の有用性が示された。血管内循環中の腫瘍細胞(CTC: Circulating Tumor Cell)の検出結果は以下に示した。

原発巣の HPV type データが得られている子宮頸癌患者(初発・再発患者とも含む)よりインフォームド・コンセントのもとに得られた末梢血 5ml を溶血処理後、OBP-401 を感染させた。24 時間インキュベーション後に白血球を除外するために CD45(白血球共通抗原)蛍光ラベルを追加し、GFP 陽性かつ CD45 陰性の細胞を蛍光顕微鏡下に微小ピペットにて回収した。Whole Genome Amplification 法にてゲノム増幅後、HPV consensus primer にて PCR・制限酵素反応

を行い HPV-genotyping した。末梢血からの CTC 回収が可能であった 5 例では全例において原発巣と CTC において一致した HPV-genome が検出された。以上より単一の末梢血中腫瘍細胞を回収しそれを用いて遺伝子解析を行うことが可能であった。本法は様々な腫瘍での応用が可能であり、生検不能な深部病変の診断、治療法決定、や癌の早期診断、非侵襲性のがん検診等に有用であると考えられる。

今後はゲノム上の遺伝子変異の解析に耐えるようシステムに改良する。本法は様々な腫瘍での応用が可能であり、生検不能な深部病変の診断、治療法決定、や癌の早期診断、非侵襲性のがん検診等に有用であると考えられる。

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 15 件)

- ① Takakura M, Nakamura M, Kyo S, Hashimoto M, Mori N, Mizumoto Y, Fujiwara T, Inoue M. Intraperitoneal administration of telomerase-specific oncolytic adenovirus sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin and affect survival in a xenograft model with peritoneal dissemination. *Cancer Gene Therapy*. 17(2010) 11-19. 査読有
- ② Nakamura M, Kyo S, Zhang B, Mizumoto Y, Takakura M, Maida Y, Mori N, Hashimoto M, Ohno S, Inoue M. Prognostic impact of CD133 expression as a tumor initiating marker in endometrial cancer. *Human pathol* 41(2010) 1516-1529. 査読有
- ③ Ikoma T, Kyo S, Maida Y, Ozaki S, Takakura M, Nakao S, Inoue M. Bone marrow-derived cells from male donors can compose endometrial glands in female transplant recipients. *Amer J Obstet Gynecol*. 201(2009) e1-8. 査読有

[学会発表] (計 24 件)

- ① 高倉正博, 京哲, 中村充宏, 毎田佳子, 森紀子, 水本泰成, 保野由紀子, 張秀智, 井上正樹, 婦人科癌における GFP 発現テロメラーゼ特異的増殖型アデノウイルスを用いた末梢血中腫瘍細胞の検出, 第 70 回日本癌学会, 2011 年 10 月 3 日, 名古屋国際会議場(愛知県)
- ② 中村充宏, 京哲, 高倉正博, 毎田佳子, 水本泰成, 保野由紀子, 井上正樹, 第 63 回日本産科

婦人科学会,2011年8月30日,大阪国際会議場(大阪府)

- ③ 高倉正博,京哲,中村充宏,毎田佳子,橋本学,森紀子,水本泰成,生駒友美,井上正樹,テロメラーゼ依存性腫瘍融解ウイルスは卵巣癌幹細胞に対して有効である,第62回日本産科婦人科学会,2010年4月24日,東京フォーラム(東京都)
- ④ 高倉正博,京哲,中村充宏,橋本学,森紀子,水本泰成,藤原俊義,浦田泰生,井上正樹,Virotherapy for platinum-resistant ovarian cancer to overcome CDDP resistance using tumor-specific replication-selective adenovirus.,第68回日本癌学会,2009年10月1日,横浜パシフィコ(神奈川県)

[図書] (計1件)

- ① 井上正樹,永井書店,症例から学ぶ婦人科腫瘍学入門,2011年,1~370頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 正樹 (INOUE MASAKI)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：10127186

(2) 研究分担者

京 哲 (KYO SATORU)
金沢大学・医学系・講師
研究者番号：50272969

高倉 正博 (TAKAKURA MASAHIRO)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号：20313661

中村 充宏 (NAKAMURA MITSUHIRO)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号：50377397