

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3月19日現在

機関番号：14501
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21390462
 研究課題名（和文）キャリアー細胞を用いたアデノウイルスベクターによる頭頸部癌の遺伝子治療
 研究課題名（英文）Genetherapy for Head and Neck Cancer using carrier cell-based delivery of replication-selective adenoviral vector
 研究代表者
 丹生 健一（NIBU KEN-ICHI）
 神戸大学 医学研究科 教授
 研究者番号：20251283

研究成果の概要（和文）：

頭頸部癌に対しては、手術療法と放射線療法、化学療法を組み合わせた様々な集学的治療法が試みられている。しかし、多くが5年生存率30%前後の予後不良な進行癌であり、新たな治療法の確立が望まれる。本研究では、癌特異的に高発現するミドカインのプロモーター下にウイルスの自己増殖に必要な遺伝子を導入したアデノウイルスベクターを作成した。この基本ベクターに、抗腫瘍効果が期待できるEGFRとVEGFのsiRNAを発現するユニットを導入し、制限増殖型かつ抗腫瘍効果を併せ持つアデノウイルスベクターを作成した。

研究成果の概要（英文）：

While multimodal treatments have been performed for the treatment of head and neck cancers, the prognoses of the patients with advanced head and neck cancer are still poor. The estimated survival rates of those patients are around 30%. New strategies for the treatment for head and neck cancer are desirable. To address this issue, we developed the midkine promoter-driven replication-selective adenoviral vector containing siRNA for EGFR or VEGF. With this adenoviral vector, synergistic effect of oncolytic adenovirus and inhibition of oncogene via RNA interference is effect.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌・遺伝子治療・アデノウイルス・ミドカイン・siRNA・Gene therapy

1. 研究開始当初の背景

現在、頭頸部癌に対しては手術療法、放射線療法、化学療法を組み合わせた様々な集学的治療が試みられている。しかしながら、その多くを占める進行癌の5年生存率は30%前後と予後不良であり、breakthroughとなる新たな治療法の登場が待ち望まれる。アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療が、頭頸部癌に対しても既にいくつかの臨床試験が行われているが、現在のところ、補助的な効果は認められるものの、従来の治療法を超えるまでの成果は挙げられていない。その理由の一つとして、現在一般に遺伝子導入に用いられているアデノウイルスベクターが、ウイルスが無制限に増殖しないように、ウイルスの自己増殖に必要な遺伝子が除かれた非増殖型ウイルスベクター(RRAV)であること挙げられる。RRAVは標的細胞に感染させても、その細胞が死滅するとともに消滅してしまい、一時的な抗腫瘍効果に終わってしまうからである。このような背景から開発されてきたのが、正常細胞内では増殖できず、標的とする細胞内で特異的に増殖することができる増殖制限型アデノウイルスベクター(RSAV)である。RSAVは、感染した癌細胞の中で増殖し、その細胞が死滅しても周囲の細胞に更に感染するため、理論的に一回の投与でも波及的抗腫瘍効果が期待できる。

我々はこれまで、COX-2を高発現している腫瘍細胞を標的とした「増殖制限型アデノウイルスベクター」を用いて「腫瘍溶解」による頭頸部癌治療について研究してきた。COX-2プロモーター下流にウイルスの自己増殖に必要な遺伝子(E1AE1B)を導入したアデノウイルスは、*in vitro* や *in vivo* にお

いて、頭頸部癌の増殖を抑えることを確認し、アデノウイルスを用いた遺伝子治療が、頭頸部癌に対する新たな治療戦略になる可能性を報告してきた。

本研究では、1) 増殖制限型アデノウイルスベクターを用い、2) 抗腫瘍効果を持つ遺伝子を組み込み、更に、3) キャリアー細胞を用いた全身投与により転移巣をも含めたより強力な治療を目指した。

2. 研究の目的

増殖制限型アデノウイルスベクターに抗腫瘍効果を持つ遺伝子を付加し、キャリアー細胞を用いて投与することにより、頭頸部癌を標的とした新たな一腫瘍溶解性ウイルスによる遺伝子治療法を開発する。

3. 研究の方法

- 1) ミドカインプロモーター下流にウイルスの自己増殖に必要なE1AE1B遺伝子を付加したユニットを、基本アデノウイルスベクターに導入する。
- 2) 抗腫瘍効果を持つと考えられるEGFRとVEGFのsiRNA配列を文献から引用、この配列を市販されているヒトRNAポリメラーゼプロモーターU6でsiRNAを発現するためのベクターに導入する。
- 3) U6プロモーターとsiRNA配列のユニットを、先に作成したアデノウイルスベクターに導入する。
- 4) シーケンス等で、遺伝子が導入されていることを確認する。
- 5) 制限増殖型かつ抗腫瘍効果を併せ持つアデノウイルスベクターを293細胞に感染させ、ウイルス産生を行う。
- 6) ウイルスの大量培養を行い、*in vitro* および *in vivo* 実験に進む。

4. 研究成果

- 1) 癌に高発現しているミドカインプロモーター下流で癌細胞特異的に増殖可能かつアデノウイルスベクターを作成し、
- 2) 同時に抗腫瘍効果を望める遺伝子を導入した、腫瘍溶解効果と遺伝子量を調整した抗腫瘍効果を併せ持つアデノウイルス

ベクターを作成した。

- 3) 抗腫瘍効果を持つ遺伝子として、癌細胞の増殖、分化に関係する EGFR および VEGF の発現を抑制するため、それらの siRNA を導入することにした。各 siRNA はヒト U6 プロモーターでその発現がコントロールされる発現ベクターに導入した。
- 4) この発現ベクターを頭頸部癌培養細胞に感染させたところ、EGFR や VEGF の発現が抑えられたことを確認した。
- 5) 同配列部分を制限増殖型アデノウイルスベクターに導入した。

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 10 件)

1) Adhim Z, Lin X, Huang W, Morishita N, Nakamura T, Yasui H, Otsuki N, Shigemura K, Fujisawa M, Nibu K, Shirakawa T. E10A, an adenovirus-carrying endostatin gene, dramatically increased the tumor drug concentration of metronomic chemotherapy with low-dose cisplatin in a xenograft mouse model for head and neck squamous-cell carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 19 144-152 2012

2) Adhim Z, Matsuoka T, Bito T, Shigemura K, Lee KM, Kawabata M, Fujisawa M, Nibu K, Shirakawa T. In vitro and in vivo inhibitory effect of three Cox-2 inhibitors and epithelial-to-mesenchymal transition in human bladder cancer cell lines. *Br J Cancer.* 102 393-402 2011

3) Sasaki R, Yasuda K, Abe E, Uchida N, Kawashima M, Uno T, Fujiwara M, Shioyama Y, Kagami Y, Shibamoto Y, Nakata K, Takada Y, Kawabe T, Uehara K, Nibu K, Yamada S. Multi-institutional analysis of solitary extramedullary plasmacytoma of the head and neck treated with curative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012 82:626-34.

4) Tahara M, Minami H, Hasegawa Y, Tomita K, Watanabe A, Nibu K, Fujii M, Onozawa Y, Kurono Y, Sagae D, Seriu T, Tsukuda M. Weekly paclitaxel in patients with recurrent or

metastatic head and neck cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011 68:769-76.

5) Nibu K, Ebihara Y, Ebihara M, Kawabata K, Onitsuka T, Fujii T, Saikawa M. Quality of life after neck dissection: a multicenter longitudinal study by the Japanese Clinical Study Group on Standardization of Treatment for Lymph Node Metastasis of Head and Neck Cancer. *Int J Clin Oncol.* 2010 15:33-8.

6) Katoh C, Saitoh M, Tsuneyuki M, Tanimoto H, Hashikawa K, Tahara S, Otsuki N, Nibu K. Blowing ratio as an evaluation tool for velopharyngeal function after oral and oropharyngeal cancer resection. *Head Neck.* 2010 32:1012-8.

7) Komaba H, Goto S, Fujii H, Hamada Y, Kobayashi A, Shibuya K, Tominaga Y, Otsuki N, Nibu K, Nakagawa K, Tsugawa N, Okano T, Kitazawa R, Fukagawa M, Kita T. Depressed expression of Klotho and FGF receptor 1 in hyperplastic parathyroid glands from uremic patients. *Kidney Int.* 2010 77:232-8.

8) Yoshida K, Sasaki R, Nishimura H, Okamoto Y, Suzuki Y, Kawabe T, Saito M, Otsuki N, Hayashi Y, Soejima T, Nibu K, Sugimura K. Nuclear factor-kappaB expression as a novel marker of radioresistance in early-stage laryngeal cancer. *Head Neck.* 2010 32:646-55.

9) Takano T, Yane K, Oue T, Otsuki N, Nibu K, Hidaka Y. Outpatient administration of radioactive iodine after total thyroidectomy for pediatric thyroid cancer: a report of three cases. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009 73:1810-3.

10) Nakagawa T, Tanaka H, Shirakawa T, Gotoh A, Hayashi Y, Hamada K, Tsukuda M, Nibu K. Cyclooxygenase 2 promoter-based replication-selective adenoviral vector for hypopharyngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009 135:282-6.

[学会発表] (計 3 件)

1) Yonezawa K, Otsuki N, Nibu K. Serum and tissue metabolomics of head and neck cancer. 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology- Head and Neck Surgery. Dec 8 2011, Kobe, Japan.

2) Adhim Z, Lin X, Huang W, Nakamura T, Yasui H, Otsuki N, Nibu K¹, Fujisawa M, Shirakawa T. E10A, an adenovirus carrying endostatin gene, enhanced anti-tumor effect of

metronomic chemotherapy with low dose cisplatin in a xenograft mouse model for head and neck squamous cell carcinoma. 14th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy and Cellular Therapy, May 18 2011 Seattle

3) Adhim Z, Otsuki N, Shirakawa T, Morishita N, Kawabata M, Nibu K. Gene silencing with siRNA targeting E6/E7 as a therapeutic intervention against Head and Neck Cancer containing HPV16 cell lines. San Francisco 2011 Annual Meeting of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Sept 11 2011 San Francisco

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/jibi/1.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹生 健一 (Nibu Kenichi)
神戸大学・医学研究科・教授
研究者番号：20251283

(2) 研究分担者

大月 直樹 (Otsuki Naoki)
神戸大学・医学研究科・准教授
研究者番号：40343264

(3) 研究分担者

白川 利郎 (Shirakawa Toshiro)
神戸大学・医学研究科・准教授
研究者番号：70335446