

## 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5月23日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590879

研究課題名（和文）消化器固形癌に対するキメラ型細胞融解性ウイルスとそのキャリアー細胞による治療

研究課題名（英文）Anti-tumor effects for solid tumors in digestive tracts were produced by a chimeric type of oncolytic adenoviruses and the carrier cells

研究代表者

川村 希代子 (Kawamura Kiyoko)

千葉県がんセンター（研究所）・がん治療開発グループ・上席研究員

研究者番号：80260248

研究成果の概要（和文）：進行した消化器固形癌の治療は難しく、とりわけ化学療法が無効となった症例等に対して、有効な治療手段がないのが現状である。そこで、アデノウイルスの増殖を腫瘍特異的に惹起し、その抗腫瘍効果を検討した。また腫瘍への標的性を増強させるために、当該ウイルスの受容体結合領域を改変し、抗腫瘍効果をより強化する工夫を行った。また、これらのウイルス導入細胞そのものを用いても、抗腫瘍効果が誘導されることを確認している。

研究成果の概要（英文）：It is difficult to effectively treat patients with an extended tumor in the digestive tract in particular those who become refractory to standard chemotherapy. We thereby examined a possible anti-tumor effects produced by replication-competent adenoviruses that preferentially proliferate within the target tumors. We also modified the receptor-binding portion to facilitate the infectivity. The anti-tumor effects were also achieved with the adenovirally transduced cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011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：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：膵臓癌、アデノウイルス、細胞死、がん治療

## 1. 研究開始当初の背景

消化器固形腫瘍の治療は、近年集学的治療により、一定の進歩が見られ、予後の改善が見られている。しかし膵癌にあっては早期発見が難しく、初診時当初より進行癌である症例も少なくなく、そのため化学療法が治療の主体となっている。最近ではゲムシタピンを中心として5-FU製剤との併用の有用性も明らかにされ、膵癌についても予後改善の兆しがあるが、他の消化器固形腫瘍と比較して、そ

の予後の不良さは依然として際立っている。しがたって、従来の枠組みに捉われず、革新的な手法も考慮されるべきであり、本研究ではウイルスの増幅による細胞死による細胞障害活性について検討する。なかでもアデノウイルスは、多くの疫学的調査により発癌性がないことが判明しており、一方細胞障害性が強いことが知られている。そこで、ウイルスの増殖が腫瘍特異的に起これば、腫瘍においてのみ細胞障害活性が誘導され、しかも一

部の腫瘍にウイルスが感染するだけで、感染した腫瘍より次々とウイルスが放出され、腫瘍組織に当該ウイルスが広がっていくことが期待される。また、ウイルスによる細胞障害活性は、抗癌剤や放射線治療とは異なり、免疫応答を弱めることはなく、むしろ増強することから、ウイルスによる細胞死に引き続いて放出される腫瘍抗原が、適切に抗原提示細胞によって処理されれば、抗腫瘍免疫応答をむしろ増強することも可能と考えられる。

また、ウイルスによる細胞死は、抗癌剤による細胞死とその機構が異なれば、両者の併用による効果も期待できるはずである。また、ウイルスそのものを腫瘍に投与する方法も可能であるが、ウイルス感染細胞を当該局所に投与する手法も考えられ、後者はウイルス単独よりも、腫瘍局所にとどまる可能性が高く、より抗腫瘍効果が高いと想定される。

アデノウイルスそのものは凍結等で長期保存が容易であり、内視鏡下、エコーガイド下による腫瘍局所への投与が可能である。また、自己の細胞をウイルスキャリアー細胞として利用すれば、倫理的問題や免疫拒絶の問題は回避される。また、アデノウイルスは最終的に免疫応答によって排除されるため、持続的なウイルス血症を起こすことはなく、ウイルス感染細胞もウイルス放出後は死滅するため、安全に利用可能である。

以上のように、当該治療は従来の治療法の選択肢を広げ、また併用効果によって治療オプションを拡大できる利点がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 腫瘍に特異性を有して細胞障害性を有するウイルスの作成、また同ウイルスの感染性を高めるため、(2) 細胞受容体結合部位にあたるファイバー・ノブ領域の改変、(3) 同ウイルスのヒト膀胱癌細胞における細胞障害活性の検討、(4) 細胞死に関する機構の解析、(5) キャリアー細胞を用いた抗腫瘍効果の検討、である。腫瘍特異性を付与することは、アデノウイルスの初期転写遺伝子である E1A を、腫瘍特異的に発現させることで可能となる。なぜなら E1A はウイルスの増殖や感染細胞の細胞周期を S 期に移行させる働きを有しているからである。したがって、当該分子の発現をヒト腫瘍で特異的に発現する遺伝子の転写調節領域で制御すればよい。これらの遺伝子として、midkine, survivin, cyclooxygenase-2 (COX-2) を選択し、この 5' 側調節領域とウイルス固有の E1A 転写調節領域とを置換することによって、目的のウイルスが作成できることが推定される。また、従来よりベクターとして使用されてきたのはタイプ 5 型のウイルスであり、このウイルスの主な細胞受容体は coxsackie adenovirus receptor (CAR) 分子で

ある。この CAR 分子はヒト腫瘍においてその発現がしばしば低下しており、そのため腫瘍における感染効率が低下していることが知られている。一方タイプ 35 型ウイルスは、その主たる細胞受容体が CD46 分子であり、腫瘍における CD46 分子は、正常細胞に比較してむしろ高発現であることが知られている。したがって、細胞受容体結合領域であるファイバー・ノブ領域を、タイプ 5 型から 35 型へと置換することによって、ウイルスのトロピズムが変わり、より効率的に腫瘍に感染すると想定される。このようにして作成したアデノウイルスの細胞障害活性を、ヒト膀胱癌細胞に感染させ、その抗腫瘍効果を *in vitro* の系で検討し、当該ウイルスの有用性を明らかにする。また、その細胞死の機構については、果たしてアポトーシスであるのか、あるいはオートファジーであるのかを検討する。また、ウイルスを繊維芽細胞に感染させ、この細胞を使用した抗腫瘍効果についても検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞融解性アデノウイルスの作成：  
ヒト腫瘍細胞において高頻度で高発現である上記遺伝子の 5' 側各 DNA フラグメントを用いて、ルシフェラーゼアッセイ法によって、膀胱癌細胞で高値を示す当該転写調節領域を決定した。その領域を、E1A 転写調節領域を除いた部位にクロニングサイトを有するシャトルベクター (pShuttle2-PL/E1A-E1B) に組み入れ、当該転写調節領域による E1A/E1B 遺伝子 (上記シャトルベクターに挿入済) の発現制御を可能にした。このとき使用した転写調節領域は、midkine, survivin, cyclooxygenase-2 (COX-2) 遺伝子の転写開始点より、5' 上流側のそれぞれ 604、521 および 387bp のゲノム DNA である。このプラスミド DNA にタイプ 5 型の場合は、pAdeno-X と、またタイプ 35 型の場合は、あらかじめ作成した Adeno5/35F (ファイバー・ノブ領域部分のみをタイプ 5 型から 35 型に置換したもの) と結合させ、HEK293 細胞にリポフェクチンを用いて導入した。約 2 週間で cytopathic effects が見られた HEK293 細胞よりウイルスが放出され、カラムを用いてウイルスを精製し実験に使用した。ファイバー・ノブ領域の改変については、当該領域 (E3B 14.7K 分子、E4 ORF6/7 分子がコードされている領域の間) について、CAR 結合領域 (accession number M73260 において 31042-32787 に相当) と CD46 結合領域 (accession number AY271307 において 30956-31798 に相当) を置換すればよい。このために、RHSP Ad35 の Eco RI 断片 (23.8 kb から 29.0 kb) と pAdeno-X の Eco RI 断片 (23.9 kb から 29.4 kb) を組み換えることによって Adeno5/35F を作製した。

(2) 細胞融解性アデノウイルスの抗腫瘍効果：

細胞傷害活性については WST 試薬を用いて、相対的な吸光度で表示した。また、生細胞のカウントにはトリパンブルーを用いた染色法を利用した。細胞周期の検討は、propidium iodide を用いてフローサイトメトリーで解析し、細胞の形態についても検討した。

(3) 細胞死の機構についての解析：

細胞死については、上記フローサイトメトリーやトリパンブルーによる染色の他に、アポトーシス・オートファジーに関わる蛋白質の発現をウエスタンブロット法にて解析した。

(4) 繊維芽細胞を用いたキャリアーによる抗腫瘍効果：

ヒト繊維芽細胞 P6X を用いて、インターフェロン・ガンマを発現させるアデノウイルスを感染させ、それより分泌される当該分子の抗腫瘍効果について検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞融解性アデノウイルスの細胞傷害活性：

ヒト膵癌細胞として、PANC-1、AsPC-1、BxPC-3、MIA-PaCa-2 の 4 種類の細胞を対象として検討した。これらの細胞の CAR および CD46 分子の発現をフローサイトメトリーで検出したところ、対照として用いた HEK293 細胞と比較して、CD46 分子の発現は維持されていたが、CAR 分子の発現は MIA-PaCa-2 と BxPC-3 細胞で低下していた。また各細胞へのアデノウイルスの感染効率を検討するために、green fluorescence protein(GFP) 遺伝子を発現するタイプ 5 型およびファイバー・ノブ領域を 35 型へと置換したアデノウイルスを用い、しかもウイルス量を変えて検討した。その結果いずれの細胞においても、タイプ 35 型の方がタイプ 5 型より感染効率は高かった。この場合、CAR 発現が低い MIA-PaCa-2 と BxPC-3 細胞において、MIA-PaCa-2 細胞ではタイプ 5 型の感染効率は低かったが、BxPC-3 細胞ではそのようなことはなく、CAR 分子の発現レベルと感染効率とは一概に相関関係がなかった。

また各種転写調節領域のルシフェラーゼアッセイの結果は、細胞ごとに、また各調節領域によって異なっていたが、どの細胞においても、またその調節領域においても、SV40T 抗原の転写活性化能よりも強い活性を示した。そこで、それぞれのアデノウイルスを、各細胞に感染させて、WST 法にて細胞傷害活性を検討すると、どの組合せにおいても細胞傷害活性が検出された。時間経過を検討すると、アデノウイルスを感染させて 3 日目までは、細胞増殖に変化はないが、4 日目ごろより細胞が死滅しはじめ、10 日ほどで完全に細胞死が誘導されていた。この時対照として用

いた beta-galactosidase(LacZ) 遺伝子を発現するアデノウイルスでは全く細胞増殖に影響を受けなかった。細胞の形態を検討すると、ウイルス感染細胞にあつては典型的な cytopathic effect が観察されており、同 effect が観察された細胞は、トリパンブルーで染色されていた。そこで、この感染細胞について細胞周期を検討すると、細胞死の増加によって sub-G1 分画が増え、確かにアポトーシスが誘導されていることが確認された。

タイプ 5 型と 35 型の抗腫瘍効果の比較は、細胞傷害活性を検出する WST 法における IC50 値を使用して検討した。その結果、いずれの膵癌細胞においても、またどの転写活性化領域を用いても、タイプ 35 型の方がタイプ 5 型に比べて、IC50 値は低値を示し、タイプ 35 型の方がより強い細胞傷害活性を示していた。この時ウイルス量としては virus particle を同じにして細胞傷害活性を検討したので、感染効率の改善とともに抗腫瘍効果が増強したことは明らかである。

(2) 各種パラメーターと細胞傷害活性との検討：

細胞傷害活性の指標として、IC50 値を使用し、細胞受容体分子の発現はフローサイトメトリーでの蛍光量、ウイルスの感染効率としては GFP 発現量の平均蛍光量、転写活性化能としては SV40T 抗原を標準としたルシフェラーゼ活性を用いて、細胞傷害活性と上記の指標との間に相関性があるかどうかを検討した。その結果 IC50 値とは上記のいずれの値とも相関性は見出せなかった。このことはアデノウイルスの殺細胞効果に、単一のバイオマーカーは指標になりえないことが判明した。その理由としては、細胞の感染効率は、CAR 分子あるいは CD46 分子以外の受容体との影響をうけること、CAR 分子あるいは CD46 分子が低値を示した場合は、各細胞受容体の感染効率への寄与レベルが異なること、さらには受容体発現の閾値の存在などが想定される。細胞自体についても、細胞死に対する感受性の違い、またアデノウイルス感染によって誘導される分子、例えばインターフェロン蛋白によるウイルスの不活化と同蛋白による細胞傷害活性、またウイルス増殖能の各細胞における違いなど、さまざまな因子がウイルスの殺細胞効果に影響を与えていると考えられる。同ウイルスを用いた効果を判定する上で、どのようなバイオマーカーが適切であるかを検討することは、今後有意義と考えられる。

(3) 細胞死の機構解析：

アデノウイルスで細胞死が誘導されていたので、caspase 経路の関与について検討した。その結果、caspase-8 および caspase-9 の cleavage はどの細胞においても弱く、また

caspase-3ではcleavageは観察されなかった。一方PARPのcleavageもLacZ遺伝子を発現するアデノウイルスによる感染細胞と比較しても大差がなかった。以上のことは、おそらく内因性あるいは外因性のアポトーシス経路について、当該細胞死に関与していない可能性が示唆している。そこで、オートファジーの可能性を、同経路に関わる蛋白質発現によって検討した。その結果、beclin-1, Atg5の発現はLacZ発現のアデノウイルス感染の場合と同じであり、またLC3A/BIとLC3A/BIIとの発現の移行についても検出されなかった。したがって、当該ウイルスによる細胞死は、caspase非依存的なアポトーシスであり、オートファジーの関与はないものと考えられる。

(4) キャリアー細胞を用いた抗腫瘍効果：間葉系幹細胞を用いてウイルスの感染効果を検討したところ、タイプ5型のウイルスは全く感染しなかったが、タイプ35型ウイルスについても感染効率が低く、同細胞を用いての抗腫瘍効果の検討は難しいと思われた。そこで繊維芽細胞であるP6X細胞をキャリアー細胞として使用すると、タイプ35型のウイルスが良く感染することが判明した。そこで同細胞に非増殖型でインターフェロン・ラムダを発現させるアデノウイルスを感染させ、同インターフェロンの分泌を確認した。インターフェロン・ラムダは特定の細胞に細胞傷害活性があることが判明している。そこで同アデノウイルスを感染させたP6X細胞と腫瘍細胞とを混和して、培養すると腫瘍細胞に細胞傷害活性が誘導されたが、P6Xは同インターフェロンの受容体分子を欠くため、細胞傷害活性は示さなかった。そこで同アデノウイルスをまずP6X細胞に感染させ、腫瘍細胞と混和してヌードマウスの皮下に接種したところ、当該腫瘍の発育は、対照であるLacZ遺伝子を発現するアデノウイルスを感染させたP6X細胞を用いた場合に比較して、著しくその腫瘍増殖が抑制されていた。また、同様な実験系において、あらかじめ皮下に作製した腫瘍局所に同インターフェロンを発現するアデノウイルスを直接接種しても、抗腫瘍効果は誘導されなかった。

本実験にあたっては、もともとは細胞融解性アデノウイルスを用いて上記手法の有用性を検討する予定であったが、動物実験施設の都合もあり、実施できなかった。しかし、上記のように、細胞傷害活性のあるアデノウイルスを使用した場合、ウイルスそのものを用いた場合に比較して、キャリアー細胞を用いた方が高い有用性が示され、この結果から細胞融解性アデノウイルスを使用した場合にも、同様な結論が得られると想定される。

## 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6件)

① Tagawa, M., Kawamura, K., Li, Q., Tada, Y., Hiroshima, K. and Shimada, H.: A possible anti-cancer agent, type III interferon, activates cell death pathways and produces anti-tumor effects. Clin. Dev. Immunol. 2011: 1-6, 2011. Article ID 479013, 2011. doi:10.1155/2011/479013 査読有

② Li, Q., Kawamura, K., Okamoto, S., Fujie, H., Numasaki, M., Namba, M., Nagata, M., Shimada, H., Kobayashi, H. and Tagawa, M.: Adenoviruses-mediated transduction of human esophageal carcinoma cells with the interferon-lambda genes produced anti-tumor effects. Br. J. Cancer. 105: 1302-1312, 2011. doi:10.1038/bjc.2011.379 査読有

③ Li, Q., Kawamura, K., Okamoto, S., Yamanaka, M., Yang, S., Yamauchi, S., Fukamachi, T., Kobayashi, H., Tada, Y., Takiguchi, Y., Tatsumi, K., Shimada, H., Hiroshima, K. and Tagawa, M.: Upregulated p53 expression activates apoptotic pathways in wild-type p53-bearing mesothelioma and enhances cytotoxicity of cisplatin and pemetrexed. Cancer Gene Ther. 19: 218-228, 2012 doi:10.1038/cgt.2011.86 査読有

④ Fukamachi, T., Chiba, Y., Wang, X., Saito, H., Tagawa, M. and Kobayashi, H.: Tumor specific low pH environment enhance the cytotoxicity of lovastatin and cantharidin. Cancer Lett. 297: 182-189, 2010. doi:10.1016/j.canlet.2010.05.010 査読有

⑤ Ma, 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. doi:10.1038/cgt.2010.37 査読有

⑥ Ma, 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. doi:10.1038/cgt.2009.21 査読有

〔学会発表〕(計3件)

①山内 駿、川村希代子、岡本慎也、楊珊、江媛媛、深町利彦、小林 弘、多田裕司、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三、田川雅敏：制限増殖型アデノウイルスは、腫がん細胞においてアポトーシス、オートファジー非依存的な細胞死を誘導する、平成23年10月3日、名古屋市

②川村希代子、岡本慎也、深町利彦、小林 弘、楊珊、久保秀司、山中満佳子、多田裕司、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三、田川雅敏：悪性中皮腫における細胞融解性アデノウイルス感受性の検討、第69回日本癌学会学術総会、平成22年9月23日、大阪市

③川村希代子、李 全海、武井優輝、山口直人、藤森浩中、多田裕司、山中満佳子、滝口裕一、巽浩一郎、廣島健三、島田英昭、田川雅敏：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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川村 希代子 (KAWAMURA KIYOKO)  
千葉県がんセンター・がん治療開発グループ・上席研究員  
研究者番号：80260248

### (2) 研究分担者

田川 雅敏 (TAGAWA MASATOSHI)  
千葉県がんセンター・がん治療開発グループ・部長  
研究者番号：20171572

山口 武人 (YAMAGUCHI TAKETO)  
千葉県がんセンター・医療局・診療部長  
研究者番号：00241969

### (3) 連携研究者

なし