

機関番号：24701
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21890231
 研究課題名（和文） 遺伝子発現型腫瘍融解性ウイルスを用いた胃癌オーダーメイド治療の開発
 研究課題名（英文） Development of custom-made virus therapy for gastric cancer using gene expressing oncolytic virus
 研究代表者
 辻 俊明 (TSUJI TOSHIAKI)
 和歌山県立医科大学・医学部・学内助教
 研究者番号：20549737

研究成果の概要（和文）：

切除不能進行・再発胃癌に対する現在の治療は十分ではない。現在腫瘍融解性ウイルスを用いた治療が期待されており、このウイルスは遺伝子の変異により腫瘍特異的に増殖するがウイルス増殖に必要な遺伝子の変異により抗腫瘍効果が十分でない場合もある。本研究では個々の症例で適切な遺伝子を選択・制御したウイルスの構築を目的とした。免疫染色で遺伝子発現を検討・選択して治療効果の改善を認め、ウイルスを用いた胃癌への治療効果の改善が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Therapies for unresectable advanced and recurrent gastric cancer have been unsatisfactory. New therapies using oncolytic viruses have been expected. These viruses have mutations on their genes and only replicate in tumor cells, but these mutated genes sometimes spoil their oncolytic ability. To enhance their oncolysis, various attempts have been done. In this study, we selected appropriate gene for individual gastric cancer and construct virus expressing that gene to enhance oncolysis. Immunohistochemical study revealed gene expression of individual gastric cancer and therapeutic experiments were undergone and enhanced therapeutic effects were observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,490,000	447,000	1,937,000
2010年度	1,170,000	351,000	1,521,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,660,000	798,000	3,458,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：癌 腫瘍融解性ウイルス 発現制御

1. 研究開始当初の背景

胃癌による死亡者数は年間 5 万人に及び、とりわけ発見が困難で難治性のスキルス胃癌は発見時に手術不可能なことも多く、たとえ切除可能で手術療法、化学療法を行っても再発のリスクは高い。再発形式として最も多い腹膜播種再発に対しては現在化学療法を主体とした治療が行われているが十分といえるだけの治療方法がないのが現状である。われわれの教室では従来型の治療法に抵抗性の難治性消化器癌を対象として樹状細胞を用いた免疫療法やエピトープペプチドによる cancer vaccine 療法などを行っており、これらの療法以外にも腫瘍融解性単純ヘルペスウイルス (HSV) によるウイルス療法の基礎的検討を行ってきた。この HSV ウイルス療法には一部遺伝子を不活化・欠失させた遺伝子組換え腫瘍融解性単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) が用いられて腫瘍細胞内部で特異的に増殖 (制限型増殖) し、正常細胞内では増殖しないため抗癌剤などと異なり腫瘍特異的な治療が行える。この HSV-1 によりウイルス療法の安全性が確保されている一方でウイルス増殖に必要な遺伝子の不活化・欠失により抗腫瘍効果が十分でない場合もあり、現在、HSV-1 の抗腫瘍効果の改善のために抗癌剤との併用やペプチドとの併用など様々な工夫が行われている。われわれは現在、第 3 世代 HSV-1 (T-01) に CD36 を介した腫瘍血管新生の阻害および CD47 を介したアポトーシス作用を持つヒト thrombospondin-1 (TSP-1) 遺伝子を導入したウイルス T-TSP1 で治療効果の増強を行っているがその作用増強は *in vitro* では胃癌細胞株によって差があり、*in vitro* では遺伝子発現のないコントロールウイルス T01 と比較したときにアポトーシス作用も認めた。

しかし、低濃度のウイルスでは抗腫瘍効果に差を認めるが、高濃度のウイルスでは差を認めず、腫瘍の完全消失にまでは至っていないのが現状である。これまでの基礎的検討の結果から胃癌細胞株における TSP-1 による抗腫瘍効果の増強の差は胃癌細胞の種類による発現遺伝子の差が原因であり、臨床におけるスキルス胃癌でも遺伝子発現には差があると考えられる。したがってスキルス胃癌をターゲットとして臨床効果が期待できる遺伝子発現型、small interfering RNA (siRNA) 発現型 HSV-1 ウイルス療法を構築するには個々の症例において適切な遺伝子の選択が必須と考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではより強力な抗腫瘍効果の増強を得るために、臨床検体を用いて個別のスキルス胃癌の遺伝子発現プロファイル解析を行い、個別の腫瘍について腫瘍抑制に働く発現低下分子あるいは高発現している腫瘍促進分子を選択する。個別に腫瘍抑制遺伝子の発現型 HSV-1 および siRNA による腫瘍促進分子ノックダウン型の HSV-1 を作成し、臨床検体から確立した細胞株での HSV-1 の抗腫瘍効果を検討して抗腫瘍効果の高いものを選択する、オーダーメイド型治療の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) スキルス胃癌よりのサンプル組織の採取・細胞株の樹立・遺伝子発現プロファイル作成

①術前に手術標本からのサンプル採取、細胞株の樹立および腫瘍組織の遺伝子プロファイル解析に同意を得たスキルス胃癌患者手術標本より腫瘍の一部をサンプルとして 1cmx1cm で採取し、また、別に一部を OCT コンパウンドで包埋して液体窒素で凍結さ

せ、-80°Cで冷凍保存を行う。

②手術標本より1cmx1cmの腫瘍組織を採取し、シャーレ上でできるだけ細かい組織片とする。滅菌した30ml三角フラスコに組織を回収し、PBS(-)15mlを加えて攪拌し続いて上清を除去し、沈殿した組織を回収する。この操作を3回繰り返す。0.25%トリプシンPBS(-)溶液10mlを加えてクリーンベンチ内で室温で20分間スターラーを用いて組織片ごと穏和に回転させ、細胞を単離する。血清を含んだ培地(RPMI1640+10%FCS)を10ml加えてトリプシンの消化作用を止め、ピペットを用いて組織分散液を出し入れし、組織片から細胞を単離、分散させる。数分の静置後に遊離した細胞を含む上清を回収する。フラスコ内の細胞片についてはPBS(-)で3回洗浄し、再度0.25%トリプシンPBS(-)溶液10mlを加えて上記操作を繰り返す。得られた細胞分散液を300g, 5minで遠心して細胞をペレットとして回収する。培養液(RPMI1640+10%FCS)を加え限外希釈して96well培養プレートで培養し、顕微鏡で腫瘍細胞であることを確認できたものについて継代培養を行い、胃癌細胞株を樹立する。

3)胃癌細胞株が樹立できたもののうち10症例のサンプルについてその一部をOCTコンパウンドにとともに液体窒素で凍結させる。Leica社クリオスタットで薄切し、スライドガラスに貼付し薄切標本作製し、HE染色を行う。HE染色標本を参照として凍結切片の薄切標本のうち腫瘍組織をLeica社laser captured microdissection装置LMD6000で選択的に採取し、QIAGEN社Rneasy Micro Kitを用いてtotal RNAを抽出する。Agilent technologies社製Bioanalyser2100でtotal RNAの質を評価する。Total RNAから42°C2hでfirst strand cDNA合成および16°C2hでsecond strand cDNAを合成する。

cDNA精製の後にin vitro transcriptionを行いcRNAを作成し、37°C14hでビオチン標識を行う。94°C20minでRNAのフラグメント処理を行い、Applied microarrays社製CodeLink Human Whole Genome Bioarraysを用いてアレイ上でハイブリダイズ・スキャニングを行い、スキルス胃癌組織での発現遺伝子プロファイルを作成する。

(2) 遺伝子プロファイルの解析および遺伝子の選択

胃癌細胞株を樹立できたサンプルについて(1)の結果より胃癌症例10例での遺伝子発現を解析し、正常胃粘膜細胞での遺伝子発現と比較して発現上昇を認める遺伝子および発現低下を認める遺伝子を検討し、遺伝子の作用等も考慮に入れて臨床応用可能な遺伝子治療に用いる候補遺伝子を決定する。

(3) 強制発現候補遺伝子の増幅とsiRNA発現型プラスミドの構築

Clontech社製QUICK-Clone cDNAから目的遺伝子(transgene)のopen reading frameに対する5'および3'プライマーを設定し、東洋紡製KOD plusを用いてGeneAmpPCR2400にてPCRを行いcDNAを増幅する。これをTARgetPlusキットを用いてクローニングベクターpTA2にクローニングし、ABI3100でシーケンス反応を行いデータベース上の配列と比較して相違がないことを確認する。siRNAによるノックダウン予定の遺伝子情報をデータベース上から獲得し、タカラバイオ社製ヘアピン型siRNA発現プラスミドpBAsi-hU6にsiRNAオリゴDNAを設計・挿入して、増幅しsiRNA発現型プラスミドpBAsi-hU6siRNAを構築する。

(4) 外来遺伝子発現型HSV-1およびsiRNA発現型HSV-1の作成

強制発現を行う目的遺伝子(transgene)を

pTA2 から enzyme cut し、ベクター SV01(東京大学藤堂具紀博士より提供)のクローニングサイトに ligation して SV-transgene を作成する。また、pBAsi-hU6siRNA のプロモーター領域から siRNA オリゴ部位までをクロンテック社製 Infusion advantage PCR cloning キットを用いて SV01 のプロモーター領域と置換し、SV-si-hU6siRNA を作成する。これらを Cre recombinase による Cre/loxP 組換えを用いて BAC プラスミド T-BAC(東京大学藤堂具紀博士より提供)に挿入し T-BAC-SV-transgene および T-BAC-SV-si-hU6siRNA を作成する。同様にして T-BAC-SV01 も作成する。T-BAC-SV-transgene および T-BAC-SV-si-hU6siRNA および T-BAC-SV01 を pOG44(invitrogen 社)とともに vero 細胞に lipofectamin2000 を用いてリポフェクション法で導入し、FLT/FRT 組換えで BAC シークエンスを除いてウイルス T-transgene および T-si-hU6siRNA および T-01 を作成する。T-transgene、T-si-hU6siRNA は複数の遺伝子について作成し、作成したウイルスは vero 細胞に感染させて複製させ、回収し titer 測定の後-80℃で保存する。

(5) 外来遺伝子発現型 HSV-1(T-transgene) および siRNA 発現型 HSV-1(T-si-hU6siRNA)の胃癌細胞への抗腫瘍効果および確立胃癌細胞株および vero 細胞でのウイルス複製能の検討

①胃癌患者から確立した胃癌細胞株 1x10⁴ 個に対して複数の外来遺伝子を発現する T-transgene および T-si-hU6siRNA およびコントロールウイルス T-01 を MOI=0, 0.01, 0.1 で感染させ、MTS アッセイにてコントロール群と比べてその抗腫瘍効果を比較検討

し、抗腫瘍効果の高いものを選択する。

②2x10⁴ 個の胃癌細胞に対して MOI=0.01、MOI=0.1 でそれぞれのウイルスを感染させて 24 時間後、48 時間後にセルスクレイパーで回収し、遠心後上清を 6well plate の vero 細胞に希釈して感染させ、titer を測定してウイルス複製能を比較する。

(6) T-transgene および T-si-hU6siRNA による遺伝子発現およびノックダウンの検討
スキルス胃癌から確立した胃癌細胞株にウイルス T-transgene および T-si-hU6siRNA を感染させて 24 時間後、48 時間後に QIAGEN RNeasy mini kit を用いて total RNA を抽出する。抽出した RNA は Bioanalyzer 2100 を用いての品質を評価し、Promega 製 ImProm-II ReverseTranscription System で cDNA を作成する。Roche 製 LightCycler を用いて real time RT-PCR を行い、強制発現させた目的遺伝子およびノックダウンした遺伝子の発現を定量し、ウイルス感染させていない細胞株と比較する。

4. 研究成果

手術標本からのサンプル採取を行い、腫瘍組織からの遺伝子プロファイルを解析・腫瘍細胞株の樹立を試みたが、術前化学療法施行のため腫瘍組織の線維組織への置換が強く、また腫瘍組織中の腫瘍細胞の viability が低かったため腫瘍細胞のみの単離培養が困難で、4 型胃癌切除標本中の腫瘍細胞の腫瘍細胞株の樹立は行えなかった。切除標本からの microdissection による腫瘍細胞の遺伝子発現プロファイル解析結果は解析可能な切除症例数が少なく、遺伝子発現プロファイル解析では明らかな発現の上昇および低下の傾向は認められなかった。そのため免疫染色にて 4 型胃癌の発現分子を検討した。

4 型胃癌では免疫染色で TGF-beta の発現

低下を認め、TSP-1 の発現も低下が認められたため TGF-beta を強制発現遺伝子候補として TGF-beta 発現型腫瘍融解性ヘルペスウイルスを新規に作成した。新規に作成した TGF-beta 発現型腫瘍融解性ヘルペスウイルスおよび TSP-1 発現型腫瘍融解性ヘルペスウイルスにより既存の 4 型胃癌細胞株での治療実験を行い、MOI=0.01 では抗腫瘍作用の上乗せ効果を有意に認めたが MOI=0.1 では有意差は認めなかった。ウイルスの増殖能については発現遺伝子の導入によりウイルス複製能の変化は認めなかった。現在他の遺伝子についても 4 型胃癌細胞での発現分子の免疫染色による検討を行い、遺伝子発現・抑制型腫瘍融解性ヘルペスウイルスを作成して 4 型胃癌治療に対するウイルスライブラリーを作成中である。

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 1 件)

1. Ojima T, Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Naka T, Katsuda M, Iida T, Tsuji T, Hayata K, Takifuji K, Yamaue H. Clinicopathological characteristics of remnant gastric cancer after a distal gastrectomy. J.Gastrointest Surg. 2010;14:277-81. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 辻 俊明, Stage II・III胃癌における TS-1 術後補助化学療法の実状と問題点, 日本胃癌学会, 2011 年 3 月 4 日, 三沢
2. 辻 俊明, 腫瘍免疫応答誘導と分子標的機能を兼ねたウイルス製剤の開発にむけて, 日本バイオセラピー学会, 2010 年 12 月 10 日, 大阪

3. 辻 俊明, 腫瘍溶解性ウイルスを用いた新規胃癌治療の開発, 日本癌治療学会, 2010 年 10 月 29 日, 京都
4. Tsuji T, Thrombospondin-1 expression enhances antitumoral efficacy of oncolytic Herpes Simplex for gastric cancer. International conference of the Asian clinical oncology society, 2010 年 8 月 27 日, 岐阜
5. 辻 俊明, 腫瘍特異的免疫誘導能を有する腫瘍融解性ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) と thrombospondin-1 の併用効果, 癌免疫外科研究会, 2010 年 5 月 21 日, 大阪
6. 辻 俊明, 機能遺伝子搭載型腫瘍溶解性ヘルペスウイルスを用いた胃癌治療の開発, 日本バイオセラピー学会, 2009 年 11 月 27 日, 大阪

6. 研究組織

(1)研究代表者

辻 俊明 (TSUJI TOSHIAKI)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教
研究者番号：20549737

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：