

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08199

研究課題名(和文) 悪性中皮腫に特徴的な遺伝子異常を標的とした増殖能を有するウイルス医薬の開発

研究課題名(英文) Molecular therapy of replication-competent adenoviruses targeting characteristic gene mutations found in mesothelioma

研究代表者

田川 雅敏 (TAGAWA, Masatoshi)

千葉大学・大学院医学研究院・特任教授

研究者番号：20171572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫は、INK4A/ARF領域の欠損とNF2遺伝子変異という特徴的な遺伝子異常を有している。この結果p53下流経路は失活し、NF2異常はFAK経路の異常、Hippo経路の消失を惹起している。そこでこの遺伝子異常を利用し、増殖性アデノウイルスによる治療法の実験研究を実施した。E1B55kDaを欠損させたAd-E1Bと、p53分子のコヒキチン化を担うMDM2分子の阻害剤を併用すると、リン酸化p53の上昇、NF1分子の発現上昇、ATM-Chk2経路を介してAd-E1B増殖が亢進し、相乗的な抗腫瘍効果が生じた。またFAKおよびMDM2阻害剤の併用も、AKT経路を介して相乗的作用を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

石綿暴露後に発生する悪性中皮腫は、発生部位からして難治性であり、また呼吸機能が減弱した高齢者に多いため、従来とは異なる手法で非侵襲的な治療法が求められる。本研究で使用した遺伝子医薬は胸腔内に投与可能であり、びまん性に進展する当該疾患に有効であり、MDM2・FAK阻害剤は臨床試験で一定の効果が示されている。これらの薬剤は、p53経路が機能的に失活している当該疾患に対して分子標的薬として有用であり、また併用によって相乗的な抗腫瘍効果がみられ、動物モデルでもその有効性が示された。この過程でNF1分子の作用が明らかになり、p53分子との相補的な関係が初めて明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Mesothelioma has characteristic genetic changes, deletion of the INK4A/ARF region and mutation of NF2 gene. The deleted region induces loss of the p53 pathways and uninhibited cell cycle despite the p53 genotype being wild-type. The NF2 mutation is linked with the FAK pathway. We investigated combinatory effects of adenoviruses defective of E1B55kDa (Ad-E1B) and MDM2 inhibitors in mesothelioma with wild-type and mutated p53. Ad-E1B augmented p53 levels in wild-type p53 mesothelioma and MDM2 inhibitors also up-regulated the p53 expression. The combination showed synergistic cytotoxicity through increased viral replications and the ATM-Chk2 pathway. Expression of NF1, one of the cellular factors responsible for Ad replications, increased in the combination. Deletion of p53 or NF1 with siRNAs inhibited the synergism and demonstrated reciprocal regulation between NF1 and p53. We also showed that FAK and MDM2 inhibitors produced synergistic cytotoxicity by suppressing the AKT pathway.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：悪性中皮腫 遺伝子変異 p53経路 MDM2阻害剤 FAK阻害剤 細胞傷害活性

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性中皮腫は胸膜より発生し、胸腔内に進展するため外科的切除が困難で、これまで臨床使用されている抗がん剤の効果も限定的で、極めて予後不良の疾患である。一般に当該患者は高齢者に多く、発症の時点で石綿暴露による呼吸機能をはじめ、各種臓器の機能が低下をきたしている可能性が高く、侵襲度の高い治療法は現実問題として不向きである。したがって非侵襲性の治療が望まれるが、現時点においても有効な薬剤は開発されていない。最近の免疫チェックポイント阻害剤による治療効果も、肺がんに対する効果と大差なく、多くの症例では best care support という選択肢しか残されていないのが現実である。したがって、これらの観点から新たな治療方法の開発が望まれている。

(2) 一方ゲノム研究から、悪性中皮腫には2つの特徴的な遺伝子変異があることが判明している。それは INK4A/ARF 領域の欠損と neurofibromatosis type 2(NF2)であり、これらは当該腫瘍細胞の特性に直結している。INK4A/ARF 領域には p14 および p16 遺伝子が含まれ、同領域の欠損によって、p14 分子が抑制する MDM2 分子の機能が亢進し、p16 分子が抑制する CDK 分子の機能が活性化している。MDM2 分子は p53 分子のユビキチン化を担っており、MDM2 機能の亢進は p53 分子の失活に繋がる。したがって、当該領域の欠損は p53 経路の機能的消失、Cyclin/CDK 分子の活性化による細胞増殖を惹起することになる。また、大部分の悪性中皮腫細胞ではがん抑制遺伝子 p53 が野生型であり、これらは細胞周期の停止、細胞死の誘導に関して興味深い視点を与えている。すなわち、悪性中皮腫では p53 遺伝子が野生型であるにもかかわらず p53 経路が失活し、細胞死誘導に抵抗性であり、細胞周期が過剰に活性化している。しかし p53 分子の過剰発現を誘導すると、その経路の下流にある p21 分子が誘導され、同分子による Cyclin/CDK 機能亢進が抑制され細胞周期が停止する。したがって悪性中皮腫細胞では、p53 分子の分解抑制等による当該分子の高発現によって、細胞死誘導と細胞周期停止を引き起こすことが可能である。

(3) 一方 NF2 の変異は、Hippo 経路の消失に繋がっている。同経路における異常は、focal adhesion kinase(FAK)や mTOR 経路の亢進に関与し、がん細胞の病態などに深く関与している。特に FAK 分子はがんの進展に関して、細胞外マトリックスとの接着に関与し、細胞増殖・転移に強い影響を与えている。さらに p53 経路は、FAK 分子や mTOR 経路に対して抑制的に作用し、両者間クロストークの可能性が指摘されている。

(4) 上記のことから、p53 分子発現が悪性中皮腫に治療にとって重要でありことから、p53 経路を標的とした分子治療薬の研究を本研究では実施した。そのために、増殖性のアデノウイルス(Ad)を使用した。これは同増殖によって感染細胞に細胞死が誘導されるからである。さらに当該ウイルスの初期応答遺伝子である E1A 分子は、p53 分子の発現を誘導するが知られている。Ad は胸腔内に導入されると、呼吸運動によってウイルスは胸腔内に拡散し、びまん性に広がっている悪性中皮腫に感染すると想定され、また細胞死を起こした細胞から産生されたウイルス粒子が放出され、胸腔内に次々と拡散していくため、効率的に抗腫瘍効果を誘導することができる。一方上記初期応答遺伝子のなかで、E1B55kDa 分子は p53 と結合し、p53 分子を不活化することから、本研究では同 E1B55kDa 遺伝子を除いたウイルス(Ad-E1B)を作成しこれを使用した。この Ad-E1B は感染細胞において、内因性 p53 分子の発現を誘導することができる。また Hippo 経路を標的として本研究では FAK 分子を取り上げ、その分子阻害剤を使用し、その細胞傷害活性と p53 経路との関係を中心に解析した。

2. 研究の目的

(1) Ad-E1B による抗腫瘍効果：

Ad-E1B は、増殖性ウイルスであるため感染細胞の抗腫瘍効果を誘導することができ、また p53 結合性を有する E1B55kDa 分子の発現を欠いているため、感染細胞の内因性 p53 を上昇させることができる。そこでこの点について、p53 遺伝子型が野生型と変異型の悪性中皮腫細胞を用いて検討し、p53 分子の発現が細胞死の誘導にどのように関わっているかを解析する。また、Ad の増殖に関わる細胞因子と p53 分子との関係、さらには p53 経路の活性化による細胞傷害活性に関して、どのような DNA 傷害経路が関与しているかについても検討する。さらに悪性中皮腫細胞をヌードマウスの胸腔内に投与する in vivo モデルにおいて Ad-E1B の抗腫瘍効果を判定する。

(2) Ad-E1B と MDM2 阻害剤による併用効果とそれに関与する経路の解析：

Ad-E1B によって p53 発現が上昇することが想定されるため、MDM2 阻害剤を併用することによって p53 発現をさらに増加させた場合、Ad のウイルス増殖能・殺細胞効果にどのように影響を与えるかを検討する。この場合 Ad の感染と増殖の指標として E1A 発現を検討し、p53 分子の発現とウイルス増殖の関係について解析する。内因性の p53 分子発現が上昇すれば、感染細胞はより早期に細胞死に陥り、二次的なウイルス産生は低下すると考えられるが、一方で p53

経路が正常であれば、p53 経路の活性化は細胞死に直結し、悪性中皮腫に対する抗腫瘍効果が増大するはずである。したがって p53 発現量の増加はウイルスによる殺細胞効果からみれば相反する事象であり、p53 経路の活性化は増殖性ウイルスによる細胞傷害活性にどのように作用するか、当該実験によって検討する。

(3) FAK 阻害剤による抗腫瘍効果と p53 経路とのクロストーク :

FAK 阻害剤の感受性については、NF2(merlin)発現との相関が指摘されており、NF2 発現が低い細胞ほど FAK 阻害剤の効果が高いと報告されている。しかし、一方では FAK 阻害剤感受性と NF2 発現とは無関係で、むしろ E-cadherin 発現との関係性を示唆した報告もある。これは FAK 分子が細胞接着に深く関与しており、各細胞の生存がどのような細胞接着に依存しているかによって異なることを意味している。また、p53 遺伝子が野生型の悪性中皮腫細胞に MDM2 阻害剤を作用させると、内因性 p53 分子発現が上昇するが、この時 FAK 阻害剤と併用することによって、抗腫瘍効果がどのように変化するか、その時の p53、細胞死関連分子、mTOR 経路の一つである AKT 分子について検討し、FAK 分子と p53 分子のクロストークについて解析する。

3 . 研究の方法

(1) 抗腫瘍効果の検討 : MDM2 阻害剤として、p53 と MDM2 分子の結合を阻害する nutlin-3a, RG7112 および RITA を用い、FAK 阻害剤としては defactinib (VS-6063) を使用した。悪性中皮腫細胞では p53 野生型として MST0-211H、NCI-H226、NCI-H28 細胞等を使用し、変異型としては EHMS-1、JMN-1B 細胞等を使用した。これらの細胞に Ad-E1B や上記の薬剤を作用させ、WST 法を用いて細胞傷害活性を検討した。薬剤の併用効果に関しては、CalcuSyn software を用いて combination index(CI)を算出した。さらに細胞周期分布をセルソーターで検討した。BALB/c ノードマウスの胸腔内に MST0-211H 細胞を接種し、in vivo 動物実験モデルを作成し、このマウスの胸腔内に Ad-E1B、腹腔内に薬剤を投与し、一定の期間を経て胸腔内の腫瘍重量を測定した。

(2) 細胞内刺激伝達系の解析 : 悪性中皮腫細胞を Ad-E1B や上記の阻害剤で処理し、western blot 法を用いて各分子の発現量を検討し、この時当該分子の活性に関わるリン酸化抗体も使用した。また、上記の細胞に関して、各種抗体や diamidine-2-phenylindole や propidium iodide を用いて免疫染色を行い、各分子の発現や細胞内局在を検討した。

(3) siRNA による蛋白発現の制御 : 分子の発現量を減少させるため、p53、NF1 に対する siRNA を使用して細胞を処理し、その後 Ad-E1B の感染、薬剤との併用効果、免疫染色等を実施した。

(4) ウイルス増殖の検討 : 悪性中皮腫細胞を Ad-E1B や薬剤で処理した後、細胞を lysis させ、その抽出液を使用した tissue culture infectious dose 50 法 (標的として A549 細胞を使用) によって、ウイルス量を plaque forming unit にて検討した。

4 . 研究成果

(1) Ad-E1B による抗腫瘍効果 :

Ad-E1B による悪性中皮腫細胞に対する傷害活性を検討したところ、p53 遺伝子型関わらず各細胞にアポトーシスが誘導されていた。すなわち Ad-E1B そのものによる抗腫瘍効果は、ウイルス増殖による細胞死と考えられた。また野生型 p53 分子を発現する非増殖型の Ad-p53 も同様に検討したところ、p53 遺伝子型に関わらず悪性中皮腫細胞に細胞死が誘導されていた。すなわち使用した悪性中皮腫細胞では、p53 変異型であっても p53 発現から細胞死に至るまでの経路に異常がないことが判明した。Ad-E1B 感染後の p53 発現を検討すると、p53 野生型細胞では p53 Ser15 のリン酸化が増加し p53 発現量が増加していたが、p53 変異型細胞では p53 の発現上昇はみられなかった。さらに siRNA を用いて p53 の発現を消失させると、p53 野生型の細胞では Ad-E1B による細胞傷害活性が消失するが、変異型の細胞では当該活性が変わらなかった。

(2) Ad-E1B と MDM2 阻害剤による併用効果とそれに関与する経路の解析 :

MDM2 阻害剤による悪性中皮腫に対する細胞傷害活性を検討すると、p53 野生型細胞での IC₅₀ は変異型に比較して低値であり、しかも野生型細胞では内因性 p53 分子の発現、リン酸化 p53 Ser15 の発現は上昇していた。この時さらに詳細に検討すると、nutlin-3a を使用した場合 DNA 傷害の指標である gamma-H2AX の発現上昇はなかったが、RG7112 および RITA を使用すると同分子の発現上昇がみられた。すなわち nutlin-3a は p53 と MDM2 の結合のみを阻害するが、RG7112・RITA は同結合阻害のみならず DNA 損傷も引き起こすことが判明した。そこでさらに、悪性中皮腫細胞を p53 の siRNA で処置し、p53 発現を低下させると野生型細胞に対する nutlin-3a および RG7112 による殺細胞効果は消失した。このことから p53 発現は Ad-E1B のみならず、MDM2 阻害剤による抗腫瘍効果に重要な働きをしていることが判明した。

上記のことから、Ad-E1B と MDM2 阻害剤を併用すると p53 発現が増大し、細胞傷害活性が高まることが期待された。そこで両者を併用して、殺細胞効果を CalcuSyn software で解析すると p53 野生型の細胞では CI 値が 1 以下で相乗効果を示したのに対して、変異型の細胞では同値が 1 以上で拮抗的に作用した。この時処理した細胞の細胞周期を検討してみると、p53 野生型では両者の併用によって sub-G1 分画の細胞、annexin-V 陽性細胞が、それぞれ単独処理の場合に比較して有意に増加していた。すなわち両者の併用によってアポトーシスが増加していたことが判明した。そこで、細胞死に関する機構を解析してみると、併用によって p53、リン酸化 p53 の発現は増加し、caspase-3・PARP の cleavage は増加していたが、caspase-8・caspase-9 の cleavage、Fas・FADD の発現は細胞によって異なり、外因性あるいは内因性のアポトーシスの誘導は細胞の種類に依存していた。この時変異型の細胞では p53、リン酸化 p53 の発現は増加していなかった。また Atg-5、Beclin-1、LC3A/B I・LC3A/B II の発現には差がなく、オートファジーは上記の細胞死には関係していないことが明らかになった。次に細胞死における DNA 傷害の関与について検討した。Nutlin-3 処理ではリン酸化 KAP1、gamma-H2AX の発現上昇はなかったが、RG7112 および Ad-E1B 処理では当該リン酸化蛋白の発現は増加し、Ad-E1B 感染後に nutlin-3a あるいは RG7112 で処理すると、単独処理に比較して当該リン酸化蛋白の発現は上昇していた。この時リン酸化 ATR・Chk1 の発現は併用によって変化しなかったが、リン酸化 ATM・Chk2 発現は併用によって増加した。したがって、DNA 傷害に関しては主に ATM-Chk2 経路が活性化されていたことが明らかになった。上記の点を踏まえて、ウイルス増殖に関しても MDM2 阻害剤との併用効果を検討した。Ad-E1B 感染した細胞の lysate を使用したウイルス増殖能を検討すると、Ad-E1B 感染による二次性ウイルス産生は、MDM2 阻害剤との併用で増加しており、E1A 分子の発現も同様に増加していた。また、胸腔内に接種した悪性中皮腫に対して、Ad-E1B と MDM2 阻害剤を投与して抗腫瘍効果を検討したところ、併用群では単独群に比較して有意に腫瘍の増殖を抑制していた。

これらの結果は Ad-E1B の抗腫瘍効果とウイルス複製に、p53 野生型細胞では p53 経路の活性化が重要な作用を示すことを示している。そこで Ad の感染に関与する細胞性因子の発現を検討した。その結果、Ad-E1B と MDM2 阻害剤の併用で NF1 分子のみが発現が増加し、その他 TFIIID、Oct1 等の分子の発現上昇はなかった。NF1 分子にはいくつかの subtype が存在するが、その中でも NF1-X のみが発現上昇を示した。NF1-X は主に細胞質に分布しているが、核の中にも存在し、核内では p53 と共存していると考えられる。そこで NF1 の発現に関して siRNA を用いてノックアウトしてみると、Ad-E1B と MDM2 阻害剤併用による相乗的な抗腫瘍効果は消失した。また NF1 発現減少によって、併用による E1A 発現の増強、caspase-3 の cleavage の増加は消失し、そればかりか p53 発現も低下した。そこで免疫染色法を用いて、NF1 発現低下によって p53 発現が siRNA 処理後 24 時間から低下していることを確認した。また p53 発現を siRNA で低下させると、NF1 分子の発現は低下していた。すなわち p53 発現レベルによって NF1 発現が左右され、NF1 発現低下によって p53 発現が低下することから、両分子の発現は相補的であることが判明した。そこで併用効果における NF1 分子の発現上昇には、p53 分子の発現、Ad の増殖あるいはその双方が関与している可能性があり、これを検討するために野生型 p53 分子を発現し E1A 分子の発現がない Ad-p53、および E1A 発現をヒト由来の転写調節因子 (survivin) で制御し E1B55kDa 遺伝子を有する Ad-Sur を用いて、NF1 分子の発現誘導を検討した。その結果、Ad-p53 感染によってウイルス増殖がなくとも NF1 分子の発現があり、また Ad-Sur 感染によって p53 発現がなくとも NF1 発現が見られた。しかし、Ad-Sur 感染による NF1 発現誘導は Ad-E1B による誘導よりも低レベルであった。このことより上記の併用による抗腫瘍効果、ウイルス増殖には p53 発現誘導が重要な働きをすることが判明した。これらの結果を総合すると、Ad-E1B と MDM2 阻害剤によって ATM-Chk2 経路および p53 経路が活性化し、その結果 NF1 分子の発現が誘導されてウイルス増殖促進が起こり、これによってアポトーシスが誘導され相乗的な抗腫瘍効果が惹起されたと結論づけられた。

(3) FAK 阻害剤による抗腫瘍効果と p53 経路とのクロストーク：

悪性中皮腫細胞を用いて、FAK 阻害剤である defactinib の細胞傷害活性を検討したところ、IC₅₀ 値は p53 の遺伝子型によらず一定であり、merlin、FAK、E-cadherin の各分子の発現レベルとは無関係であった。この defactinib 処理によって、caspase-9、PARP の cleavage は起こらなかったが、AKT 分子の脱リン酸化が起こり、細胞によっては p53 分子の発現上昇が、リン酸化 FAK の低下とともに生じていた。また nutlin-3a 処理によって p53 野生型細胞では、細胞傷害活性と共に p53 発現が上昇していたが、このときリン酸化 FAK の脱リン酸化も生じていた。さらに RITA 処理によって、p53 変異型細胞においても野生型と同様に p53 発現上昇によって、FAK 分子の脱リン酸化が惹起されていた。そこで、defactinib と MDM2 阻害剤との併用効果を CalcuSyn software によって検討すると、多くの場合 p53 の遺伝子型によらず CI 値が 1 以下であり、両薬剤は相乗的に作用していた。この薬剤併用の際、使用した細胞によって異なるものの、p53 発現上昇とリン酸化 FAK 発現の低下がおこり、またリン酸化 AKT の発現が低下していた。上記のことは p53 発現と FAK 活性とは相関しており、AKT 分子の発現低下は細胞死ではなく細胞増殖抑制の結果と考えられた。したがって、FAK 阻害剤と MDM2 阻害剤の併用、また FAK 阻害剤と Ad-E1B の併用も p53 野生型の悪性中皮腫の治療には有効と推定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsunaga, W., Hamada, K., Tagawa, M., Morinaga, T. and Gotoh, A	4. 巻 41
2. 論文標題 Cancer cell-specific transfection of hCas9 gene using Ad5F35 vector	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 3731-3740
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15164	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nguyen, T.T.T., Shingyoji, M., Hanazono, M., Zhong, B., Morinaga, T., Tada, Y., Shimada, H., Hiroshima, K. and Tagawa, M.	4. 巻 12
2. 論文標題 An MDM2 inhibitor achieves synergistic cytotoxic effects with adenoviruses lacking E1B55kDa gene on mesothelioma with the wild-type p53 through augmenting NFI expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death Dis	6. 最初と最後の頁 663
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41419-021-03934-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masatoshi Tagawa, Thao Thi Thanh Nguyen, Takao Morinaga, Yuji Tada, Kenzo Hiroshima
2. 発表標題 An MDM2 inhibitor induces expression of NFI, a cellular factor for adenovirus replications, and augmented cytotoxic effects of adenoviruses through DNA damage pathways
3. 学会等名 14th International Oncolytic Virotherapy Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takao Morinaga, Masatoshi Tagawa
2. 発表標題 A drug targeting the G2/M phases enhances replications and cytotoxicity of oncolytic adenoviruses in p53-deficient cells
3. 学会等名 14th International Oncolytic Virotherapy Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 田川雅敏	4. 発行年 2023年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 722
3. 書名 遺伝子治療開発研究ハンドブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------