

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：93703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09340

研究課題名(和文) エクソソームを利用したパーフォリン遺伝子導入療法の開発

研究課題名(英文) Development of gene therapy using exosomes containing perforin expression vector

研究代表者

水谷 晃輔 (Mizutani, Kosuke)

社会医療法人厚生会中部国際医療センター(研究支援センター)・がん研究部・主任研究員

研究者番号：80397356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではリンパ球が癌細胞を攻撃するために分泌するパーフォリン遺伝子を癌細胞に導入し、癌微小環境中のパーフォリン増加による抗癌効果について検討した。パーフォリンを癌細胞特異的に発現させるため、癌特異的な分泌タンパク(PSA)と表面タンパク(PSMA)を発現する前立腺癌をモデルとした。PSAプロモーター誘導パーフォリン発現ベクターを送達担体であるリポソーム、抗PSMA抗体付加リポソームまたは前立腺癌由来エクソソームに導入し、前立腺癌細胞とヒト末梢血単核球の共培養に添加すると強い癌増殖抑制効果を示した。マウスxenograftモデルでも同様の効果を確認できたため有望な治療法となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行癌や再発癌の治療効果は依然として低い。免疫チェックポイント阻害薬は奏功すると長期にわたる効果が認められることがあるため、今後は免疫を軸とした治療法の開発が望まれる。本研究では癌免疫において必要な役割を果たすパーフォリンに着目し、癌微小環境中のパーフォリン発現を増加させることによってヒト末梢血単核球による癌増殖抑制効果を証明することができた。また遺伝子導入とその効果発現がリポソームのみならずエクソソームでも可能であることが示された。治療薬として癌細胞選択的な発現や担体の癌細胞指向性を有する複雑なシステムであっても良好な結果を示すことができ今後の遺伝子導入療法の可能性拡大に寄与できた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the therapeutic potential of liposomes or exosomes containing perforin expression vector. We aimed to increase the concentration of perforin in the microenvironment of PC in order to enhance the anti-tumor immune response mediated by CTLs and NK cells. The vector introduced to liposomes conjugated with or without anti-PSMA antibody, and exosomes isolated from prostate cancer cells. Perforin functions in concert with cytotoxic lymphocytes, therefore anti-tumor effect of the agents was analyzed in the presence of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Treatment with liposomes significantly inhibited growth of prostate cancer cells when co-incubated with PBMCs. Intravenous administration of liposomes via tail vein increased the level of perforin in tumor xenograft of mouse and significantly decreased the tumor volume. Our results suggest that gene therapy expressing perforin in cancer cells could be a novel therapy for advanced cancer.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 パーフォリン リポソーム エクソソーム PSA PSMA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌の治療法は手術、薬物、放射線治療などの発展によってその成績は徐々に向上しているものの、進行癌では効果が認められないことも多い。近年、再発癌に対しては免疫反応を利用した治療がおこなわれており、従来の治療法と比較して効果が認められることも多い。しかしながら奏効率は 3-4 割にとどまることが多く十分ではない。一方で免疫療法は免疫チェックポイント阻害薬による治療に認められるように、一旦治療が奏功するとその効果が長く継続する症例があることも知られている。そのため癌免疫を軸とした治療法の開発が望まれている。

癌免疫反応の一部を担うリンパ球は、癌細胞を攻撃する際にパーフォリンとグランザイムを分泌し、前者が細胞膜に孔を開け、後者が癌細胞の DNA を切断して癌細胞を死滅させる。このようにパーフォリンは癌免疫で重要な役割を果たしていると考えられるが、パーフォリンを癌治療に応用するという報告はない。そのため癌微小環境においてパーフォリンを増加させることによって免疫細胞による癌細胞攻撃を増強させるための新規癌治療法に着目した。

2. 研究の目的

リンパ球は癌細胞を攻撃する際に、パーフォリンを分泌し細胞膜に孔を開け、グランザイムを放出して DNA を切断し癌細胞を死滅させる (Martínez-Lostao L et al. 2015)。本研究の目的は、このようなパーフォリンを介した生体内での癌免疫反応を増強する新規治療法を確立することである。細胞膜に孔を開けるためには癌細胞にパーフォリンを作用させる必要があるが、生体内で免疫細胞にパーフォリンを過剰に発現させることは有害事象の観点から困難と考える。そのため癌細胞自体にパーフォリンを発現させるという着想を得た。すなわち、癌細胞から分泌されたパーフォリンにより、自身および周囲の癌細胞の細胞膜に孔を開け、リンパ球による癌細胞の攻撃を増幅させる、いわば癌をもって癌を治療する方法を考えた。

具体的にはパーフォリン発現ベクターを内包させた担体を、癌細胞膜表面に特異的に発現しているタンパクに対する抗体を付加することにより、癌細胞特異的にパーフォリン発現ベクターを導入する。しかしながら、抗体が細胞膜表面抗原と非特異的に反応した場合はパーフォリン発現ベクターが標的以外の細胞にも取り込まれ、標的細胞以外でもパーフォリンが発現する可能性がある。これらは重大な有害事象につながる恐れがあり、それを回避するためプラスミド上のパーフォリン遺伝子の下流に癌特異的遺伝子のプロモーターを配置し癌細胞でのみパーフォリンを発現させることとした。さらにこれら遺伝子を細胞導入するための担体としてリポソーム及び体内動態が有利であると考えられるエクソソームを使用することによって効率の高い遺伝子導入治療を実現する。このようにパーフォリンをターゲットとして、癌細胞ターゲット抗体と癌特異的プロモーターを組み合わせて二重に選択することにより安全性を高めた、新規癌免疫治療法の実現に向けた基礎研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

最初に癌細胞のみでパーフォリンを発現させるために、特異抗原と特異表面抗原を有する前立腺癌をモデルとして選定した。前立腺癌は、細胞表面に前立腺特異的膜抗原 (PSMA) を、さらに血中腫瘍マーカーとして広く利用されている前立腺特異的抗原 (PSA) を発現している。前立腺癌は男性ホルモン依存的に増殖することから、その作用を遮断することにより治療を行うが、早晚再発する。これが去勢抵抗性前立腺癌として知られる病態であり、これらは新規抗アンドロゲン剤やドセタキセルなどの抗癌剤によって加療されるが、最終的には化学療法を含む様々な治療に抵抗性となり、患者を死に至らしめる。そこで次世代の新規治療法を開発する目的で本研究を計画した。本研究では、将来的に去勢・ドセタキセル抵抗性前立腺癌患者への遺伝子導入による治療を目指していることから、去勢・ドセタキセル抵抗性の細胞モデルとして、男性ホルモン非依存性前立腺癌細胞株 (22Rv1) を親株としてドセタキセル耐性株 (22Rv1DR) を樹立した。前立腺癌細胞で特異的にパーフォリンを発現させるために、ヒト PSA 遺伝子のプロモーターの下流にヒトパーフォリン遺伝子 (PRF1) の cDNA を組み込んだ発現プラスミドを構築した。本研究ではエクソソームを送達担体として使用することも検討課題としているが、最初に実績のあるリポソームにこの発現ベクターを内包して効果を確認することとした。このパーフォリン発現ベクター内包したリポソームを 22Rv1DR 細胞に投与して抗腫瘍効果について検討した。また 22Rv1DR は細胞表面に PSMA を有意に多く発現しているため、抗 PSMA 抗体を付加したパーフォリン発現ベクター内包リポソームも作成して抗腫瘍効果を検討した。癌免疫ではリンパ球の抗腫瘍効果について確認する必要があるため、それぞれの薬剤をリンパ球を含むヒト末梢血単核球 (PBMC) と癌の共培養に添加することによって、生体内の癌免疫に近い状態を再現し抗腫瘍効果を検討した。さらに薬剤の全身投与によって期待される抗腫瘍効果を発揮できるかを検討するために、22Rv1DR のマウス xenograft モデルを作成し、マウス尾静脈から薬剤を投与してその効果を検討した。最後に送達担体を前立腺癌由来のエクソソームとしてパーフォリン発現ベクターを含有させ同様の研究を行い、抗腫瘍効果について検討した。エクソソームを使用する研究では、我々の前検討においてエクソソーム分泌が多いことが分かっている前立腺癌細胞株 LNCaP を用いて行った。

4. 研究成果

PSA プロモーター誘導パーフォリン発現ベクター封入リポソーム作成と癌増殖抑制効果

PSA プロモーターによってパーフォリンを発現するベクターを作成しリポソームに内包した (pLipo、図 1A) pLipo を前立腺癌細胞 (PC-3、22Rv1DR) に添加すると、PSA を発現している 22Rv1DR 細胞でのみパーフォリン発現を確認できた (図 2B) 22Rv1DR とヒト末梢血単核球 (PBMC) を共培養すると軽度の癌増殖抑制効果が認められたが、pLipo を追加すると著明な増殖抑制効果が認められた (図 1C)。

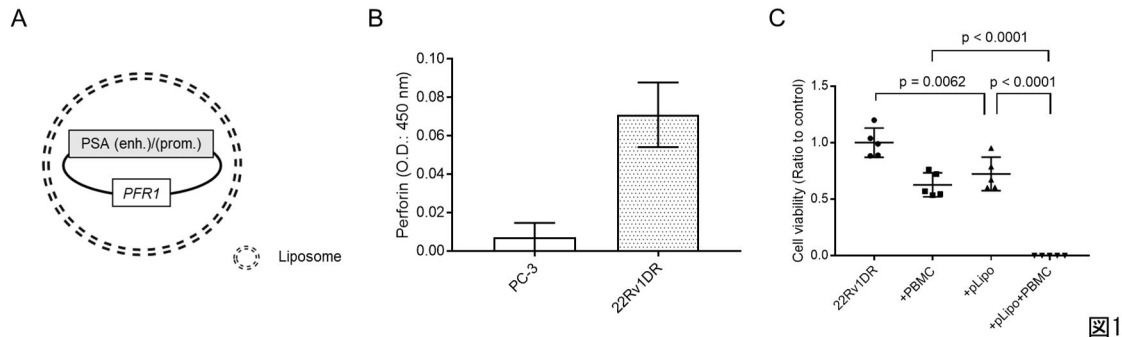


図1

pLipo のマウス xenograft モデルにおける癌増殖抑制効果

で作成した pLipo の効果を *in vivo* で検討するため、22Rv1DR をマウス皮下に接種し xenograft モデルを作成し、2 週間後にマウスをランダムに 2 群に分け、第 2 週、3 週に pLipo を経尾静脈投与した。経時的に腫瘍体積を測定したところ 4 週目で pLipo による有意な癌増殖抑制効果を認めた (図 1A、B)。さらに腫瘍内ではコントロールと比較して有意に多くのパーフォリンを産生していた (図 C)。



図2

抗 PSMA 抗体付加パーフォリン発現リポソームの作成と癌増殖抑制効果

選択的な癌細胞ターゲットのため前立腺癌表面に多く発現している PSMA に対する抗体 (抗 PSMA 抗体) を pLipo に付加した (PSMALipo、図 3A)。抗体を付加した PSMALipo でも 22Rv1DR において効率よく高濃度のパーフォリンを発現した (図 3B)。PBMC との共培養では PSMALipo は著明な癌増殖抑制効果を示した (図 3C)。

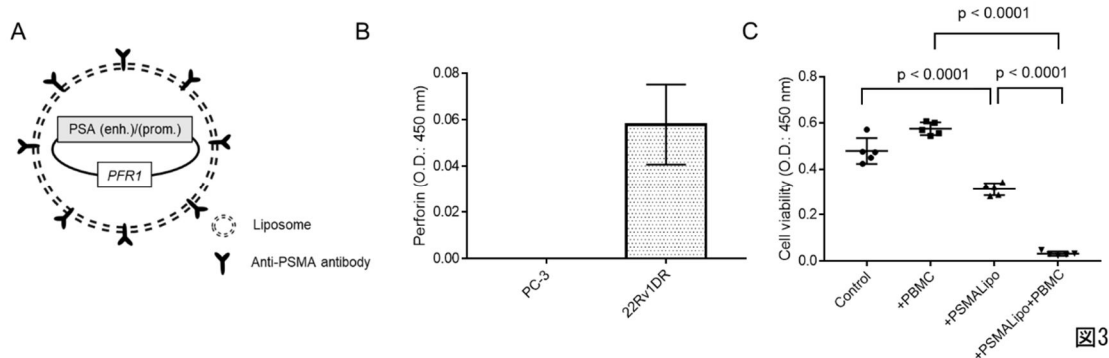


図3

PSMALipo のマウス xenograft モデルにおける癌増殖抑制効果

で作成した PSMALipo の効果を *in vivo* で検討するため、22Rv1DR 皮下 xenograft モデルを作成し、2 週間後にマウスをランダムに 2 群に分け、第 2 週、3 週に PSMALipo を経尾静脈投与した。経時的に腫瘍体積を測定したところ、4 週目で抗 PSMA 抗体と比較して PSMALipo による有意 (p=0.0313) な癌増殖抑制効果を認めた (図 1A、B)。

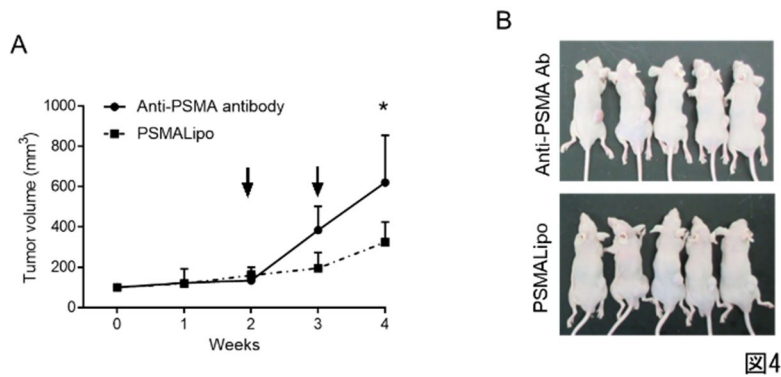


図4

PSA プロモーター誘導パーフォリン発現ベクター導入エクソソーム作成と癌増殖抑制効果

PSA プロモーターによってパーフォリンを発現するベクターをエクソソームに導入するため、PSA 発現前立腺癌細胞である LNCaP 細胞上清より、ポリマー沈殿法を用いてエクソソームを回収した。そのエクソソームにパーフォリン発現ベクターを導入し PSA プロモーター誘導パーフォリン発現ベクター封入エクソソーム (pExo) を作成した。pExo を PSA 発現前立腺癌細胞 (LNCaP) に添加し強固なパーフォリン発現を確認した。(図 5A) LNCaP とヒト末梢血単核球 (PBMC) の共培養に pLipo を追加すると著明な増殖抑制効果が認められた (図 5B)。

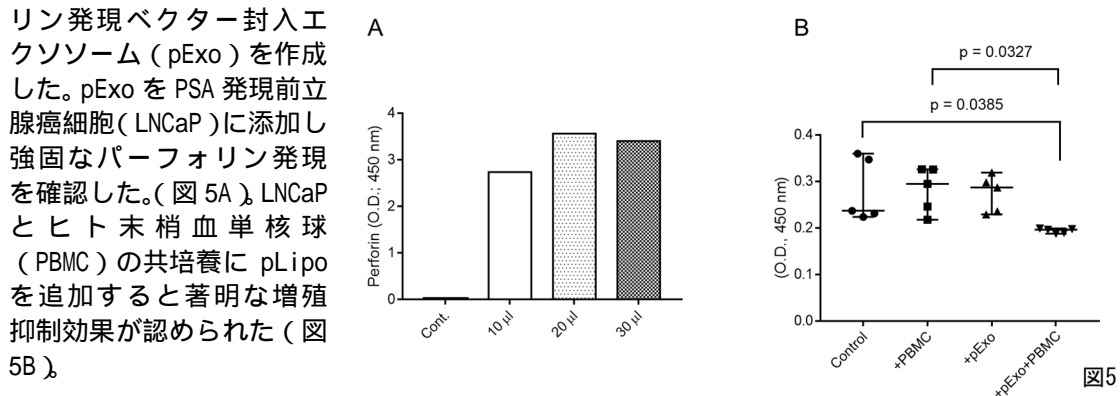


図5

以上から遺伝子導入による腫瘍微小環境中のパーフォリン発現増加は癌免疫細胞による癌抑制効果に寄与することが明らかとなった。この効果はヒト末梢血単核球を用いた *in vitro* でもマウス xenograft モデルの *in vivo* でも同様に認められたことからヒト生体内でも抗癌効果が見込まれ、化学療法耐性となった前立腺癌に対する新しい治療法となる可能性がある。また遺伝子導入のための担体としてはリポソーム、抗体付加リポソームと同様にエクソソームも有望であることが示された。今後はエクソソームに癌細胞選択性を持たせるために、二重特異性モノクローナル抗体を用いた方法により精度が高い遺伝子導入方法を開発していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kosuke Mizutani, Kyojiro Kawakami, Yasunori Fujita, Taku Kato, Manabu Takai, Daiki Kato, Koji Iinuma, Takuya Koie, Masafumi Ito	4. 巻 12
2. 論文標題 Gene therapy of prostate cancer using liposomes containing perforin expression vector driven by the promoter of prostate-specific antigen gene	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-03324-6.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 1件）

1. 発表者名 Kosuke Mizutani, Kyojiro Kawakami, Yasunori Fujita, Taku Kato, Manabu Takai, Daiki Kato, Koji Iinuma, Takuya Koie and Masafumi Ito
2. 発表標題 Prostate cancer targeted therapy using PSA promoter-driven perforin expression vector encapsulated in liposomes conjugated with anti-PSMA antibody
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水谷晃輔、川上恭司郎、加藤卓、加藤大貴、高井学、飯沼光司、土屋朋大、伊藤雅史、古家琢也
2. 発表標題 二重選択性を用いた抗体修飾プラスミド内包 リポソームによる癌免疫治療法の開発
3. 学会等名 第71回日本泌尿器科学会中部総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	藤田 泰典 (Yasunori Fujita) (30515888)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員 (82674)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	加藤 卓 (Kato Taku) (50596202)	藤田医科大学・医学部・准教授 (33916)	
研究分担者	川上 恭司郎 (Kawakami Kyojiro) (90589227)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員 (82674)	

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