

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25年 5月 30日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390210

研究課題名(和文) 癌幹細胞を標的治療する増殖制御型アデノウイルス開発による革新的な小児癌治療の確立

研究課題名(英文) The development of conditionally replicating adenovirus targeting cancer stem cell for innovative treatment for pediatric cancer

研究代表者

小賤 健一郎(KOSAI KENICHIRO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90301663

研究成果の概要(和文)：

小児の癌は成人と比べ生物学的・臨床的な特性も異なり難治であるため治療法開発で主標的疾患とはされにくい。さらに小児癌への遺伝子治療法の開発の研究もほとんど無い。よって本研究は「小児の癌への革新的治療法の開発」を最終目的とし、「癌幹細胞を標的治療する m-CRA ベクター」という革新的治療法の開発の研究を行い以下の成果を上げた。1.軟部肉腫、グリオブラストーマ、肝芽腫などで、マーカー膜蛋白質や sphere 法による小児癌の癌幹細胞の分離法の確立ができた。2.我々が開発した m-CRA ベクターが、小児癌の癌幹細胞に有効な治療効果を示すことを、1で確立した培養細胞実験にて実証できた。

研究成果の概要(英文)：

Although pediatric carcinomas have different clinical and biological features from those of adult carcinomas, gene therapy for pediatric carcinoma has not been well developed. The present study aims to develop m-CRAs (conditionally replicating adenovirus targeting with multiple tumor-specific factors) that specifically treat cancer stem cells, leading to innovative therapy against pediatric carcinoma. First, we have established the methods to enrich and purify cancer stem cells in soft tissue sarcoma, glioblastoma, hepatoblastoma et al. Second, we revealed that our original m-CRAs efficiently treat cancer stem cells in such pediatric carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2012年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児腫瘍、遺伝子治療、がん幹細胞、アデノウイルスベクター、増殖型ウイルス

1. 研究開始当初の背景

(1)癌遺伝子治療の歴史と臨床応用で明らかとなった問題

癌への遺伝子治療は、世界で数多くの臨床試験が行われ高い安全性は明確になった。一方、当初期待された癌根治レベルの治療効果が得られていない最大の原因は、いかなる

「非」増殖型のベクターでも、生体内の癌細胞に 100%もれなく遺伝子を導入することは物理的理由から不可能（液が達しない癌細胞には当然、遺伝子は導入されない）で、この問題を認識していなかった戦略は遺伝子「未」導入癌細胞からの再発が起こるからである。研究代表者らは遺伝子治療黎明期よりこの問題に取り組み、まず 1990 年代初頭に世界に先駆けアデノウイルスベクターによる免疫治療遺伝子治療である程度克服した。

(2)m-CRA 開発へ

この問題の根本解決として近年期待されているのが、ウイルス増殖が正常細胞では阻止され、癌細胞内では旺盛に起こるように遺伝子改変した癌特異的増殖型アデノウイルス（CRA；Conditionally replicating adenovirus）の開発である。CRA は生体内の癌細胞特異的にウイルス増幅が起こるため、時間経過とともに「投与時は液が接触しなかった癌細胞」にも到達し、増幅ウイルス蛋白により癌へ溶解死を誘導する「人工ウイルス療法」である。しかし CRA ベクターの効率的な標準化作製技術はないという最大の問題より、従来の CRA は「単一因子での不十分な癌特異化」で「治療遺伝子も自由に搭載できない」というレベルで、その大きな潜在能力を完全に発揮できていなかった。研究代表者らは「多因子を搭載して精密に癌特異化/治療が可能な CRA(m-CRA)」という、「次世代」の m-CRA を効率・迅速・容易に作製可能な技術を世界で初めて独自開発してこれを克服し、さらに本技術で既存の CRA を凌ぐ **サバイビン反応性 m-CRA(Surv.m-CRA)** という画期的な癌治療薬の開発にも具体的に成功した。

(3)小児癌への遺伝子治療の国内外での研究状況

一方、小児の癌は近年、治療の進歩はみられるものの、特に浸潤・転移症例は未だ予後が悪く、革新的治療法の開発が切望されている。しかし、小児癌に焦点を当てた遺伝子治療の開発は世界的にも進んでおらず、特に小児癌への CRA 開発は世界でも未だ報告がない。

(4)癌幹細胞の国内外での研究状況

「癌を構成する細胞の中に、自己複製能、多分化能、高い腫瘍形成能を有する少数の『癌幹細胞』が存在し、この癌幹細胞が従来の化学療法や放射線療法に抵抗性であるために癌は難治性である」という説が癌研究では最近注目されている。このように癌幹細胞

は革新的治療法開発における最有力ターゲットと考えられる一方で、癌幹細胞を標的治療する方法は未だ確立されておらず、また小児癌における癌幹細胞の研究は非常に限られている。

2. 研究の目的

小児の癌は成人の癌と比べ、生物学的・臨床的な特性も異なり難治でもある一方で、全癌での治療法開発で主標的疾患とはされにくく、小児癌へのオリジナルの遺伝子治療法の開発の研究もほとんど無い。よって本研究は「小児の癌への革新的治療法を開発」することを最終目的とし、そのために研究者のこれまでの「独自開発の m-CRA ベクターによる癌遺伝子治療の研究」と「幹細胞での再生医学研究」を融合することで、「癌幹細胞を標的治療する m-CRA ベクター」という革新的治療法の開発の研究を行う。

3. 研究の方法

(1)小児の癌幹細胞の特性解析と分離法を確立

癌幹細胞 (Cancer stem cell あるいは Cancer-initiating cell) の分画を濃縮・分離する方法として、①セルソーターでの Side population (SP) 分画の分離、②Sphere 法による濃縮、③細胞表面マーカーによるセルソーターや磁気ビーズ法での分離が報告されている。これらは癌腫によって癌幹細胞の生物学的特性やマーカーに違いがあることが示唆され、そのメカニズムの多くも未だ不明である一方で、小児の癌に「焦点」を当てて癌幹細胞分画を濃縮・分離する方法を検討・確立した報告はない。よって軟部肉腫、肝芽腫、グリオブラストーマ等の小児癌細胞にて、癌幹細胞を濃縮・分離する方法の確立を行う。

(2)m-CRA ベクターの小児の癌幹細胞に対する治療効果の検証と小児がんへの治療戦略の確立

我々が既に関し、成人癌での治療効果を実証、報告している Survivin 反応性 m-CRA (Surv. m-CRA) を中心に、上記 1 の系で、癌幹細胞とそれ以外の分画での治療作用と治療効果を調べる。そのためには、癌幹細胞とそれ以外の分画での、survivin の発現様式、survivin promoter の活性様式を明らかにし、そして Surv. m-CRA の癌幹細胞分画への殺傷効果をそれ以外の癌分画と比較して明らかにする。

次に、癌幹細胞で高発現しているある X という分子に着目し、この X 分子の発現に依存

してウイルス増殖制御される m-CRA が、癌幹細胞を標的治療できるか、同様の方法で検証する。

4. 研究成果

(1) 小児の癌幹細胞の特性解析と分離法を確立

軟部肉腫においては FGFR3 と培養条件で癌幹細胞を濃縮、分離できた。グリオブラストーマにおいては、Sphere 法にて効率よく癌幹細胞を濃縮できる系が確立できた。これらの細胞は、分離した癌幹細胞の in vivo 移植でも高い腫瘍形成能を示した。

(2) m-CRA ベクターの小児の癌幹細胞に対する治療効果の検証と小児がんへの治療戦略の確立

これらの系において、癌幹細胞分画においては、Survivin の発現、survivin promoter の活性とも、さらなる亢進がみられた。

Surv. m-CRA は癌の全ての分画を殺傷できるだけでなく、(抗癌剤や放射線療法が治療効果を激減するといわれている) 癌幹細胞分画に対して、治療効果を増強するという、画期的な成果が得られた。

また新規に開発した、癌幹細胞で高発現する X 遺伝子の発現を標的とした X 反応性 m-CRA は癌幹細胞の濃縮分画を効果的に治療できた。興味深い事に、同種の癌幹細胞で分化させた分画においては治療効果が激減した。つまり X 反応性 m-CRA は癌幹細胞を標的治療できる可能性を持つ、これまでに報告がない全く新しい癌溶解性ウイルスとなる可能性が示唆された。

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 9 件)

1. Okabe Y, Takahashi T, Mitsumasu C, Kosai K, MD, Tanaka E, Matsuishi T.: Alterations of Gene Expression and Glutamate Clearance in Astrocytes Derived from an MeCP2-null Mouse Model of Rett Syndrome. *PLoS ONE* 査読有,7(4):e35354, 2012
doi: 10.1371/journal.pone.0035354.
2. Hino S, Sakamoto A, Nagaoka K, Anan K, Wang Y, Mimasu S, Umehara T, Yokoyama S, Kosai K, and Nakao M.: FAD-dependent lysine-specific demethylase-1 regulates

cellular energy expenditure. *Nat. Commun.* 査読有, 27;3:758, 2012
doi:10.1038/ncomms1755 (Open journal)

3. Kamisasanuki T, Wang Y, Tokushige S, Terasaki H, Khai NC, Wang Y, Sakamoto T, Kosai K; Targeting CD9 produces stimulus-independent antiangiogenic effects predominantly in activated endothelial cells during angiogenesis: A novel antiangiogenic therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有,16;413(1):128-35, 2011
doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.068.
4. Horikawa Y, Wang Y, Nagano S, Kamizono J, Ikeda M, Komiya S, Kosai K.: Assessment of an altered E1B promoter on the specificity and potency of triple-regulated conditionally replicating adenoviruses (CRA) □ Implications for the generation of ideal m-CRAs. *Cancer Gene Ther* 査読有,18(10):724-33, 2011
doi: 10.1038/cgt.2011.44.
5. Khai NC, Sakamoto K, Takamatsu H, Matsufuji H, Kosai K .: Recombinant soluble form of HB-EGF protein therapy drastically inhibits Fas-mediated fulminant hepatic failure: Implications in clinical application. *Hepatol Res.* 査読有,41:594-596, 2011
doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00805.x.
6. Murakami KI, Kaji T, Shimono R, Hyashida Y, Matsufuji H, Tsuyama S, Maezono R, Kosai K, Takamatsu H.: Therapeutic effects of vitamin A on experimental cholestatic rats with hepatic fibrosis. *Pediatr Surg Int.* 査読有,27(8):863-70, 2011
doi: 10.1007/s00383-011-2853-0.
7. Okabe Y, Kusanaga A, Takahashi T, Mitsumasu C, Murai Y, Tanaka E, Higashi H, Matsuishi T, Kosai K .: Neural Development of Methyl-CpG-Binding Protein 2 Null Embryonic Stem Cells: A System for Studying Rett Syndrome. *Brain Res.* 査読有,1360(11): 17-27,2010
doi: 10.1016/j.brainres.2010.08.090.
8. Miyata S, Takemura G, Kosai K, Takahashi T, Esaki M, Li L, Kanamori H, Maruyama R, Goto K, Tsujimoto A, Takeyama T, Kawaguchi T, Ohno T, Nishigaki K, Fujiwara T, Fujiwara H, Minatoguchi S.: Anti-Fas Gene Therapy Prevents Doxorubicin-induced Acute Cardiotoxicity through Mechanisms Independent of Apoptosis. *Am J Pathol.*

査読有,176(2):687-98, 2010
doi: 10.2353/ajpath.2010.090222.

9. Wang Y, Asakawa A, Inui A, Kosai K. :Leptin gene therapy in the fight against diabetes. *Expert.Opin.Biol.Ther*
査読有 10(10); ,1405-14, 2010
doi: 10.1517/14712598.2010.512286.

[学会発表] (計 16 件)

■ 国際学会

1. Tanoue K, Wang Y, Ikeda M, Mitsui K, Setoguchi T, Komiya S, Natsugoe S, Kosai K. : Efficient treatment of Rhabdomyosarcoma-initiating cells by Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus : Promising m-CRA strategy for treating cancer stem cells. (国際・ポスター) The American Society of Gene Therapy's 15h Annual Meeting, May 16-May 19, 2012 (Philadelphia, USA)
2. Kosai K., Sakamoto K, Khai NC, Wang Y, Maazono R., Tanoue K, Hideo T, Matsufuji H.: HB-EGF/HGF Hepatic Gene Therapy Effectively Inhibits Bile Duct Ligated Cholestatic Liver Injury In Mice In Their Different Therapeutic Modes. The American Society of Gene Therapy's 14h Annual Meeting, May 15-May 22, 2011 (Seattle, USA)

■ 国内学会

1. Ken-ichiro Kosai: Development of conditionally replicating adenovirus specifically targeting and/or efficiently treating cancer stem cells. (国内、口演 [English]) 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19-21 日 (札幌)
2. Kiyonori Tanoue, Yuqing Wang, Takao Setoguchi, Setsuro Komiya, Shoji Natsugoe, Ken-ichiro Kosai. :Survivin-Responsive Conditionally Replicating Adenovirus Efficiently Treats Rhabdomyosarcoma-Initiating Cells. (国内、口演 [Japanese]) 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19-21 日 (札幌)
3. 小賤健一郎、三井薫、王宇清、高橋知之:ヒト ES/iPS 細胞での再生医療の課

題を克服する独自のアデノウイルスベクターと発現技術の開発. (国内・パネルディスカッション) 第 11 回日本再生医療学会総会、2012 年 6 月 12-14 日 (横浜)

4. 田上聖徳、王宇清、池田美奈子、三井薫、瀬戸口啓夫、小宮節郎、夏越祥次、小賤健一郎:独自開発の増殖型アデノウイルスベクターで癌幹細胞は効果的に治療できる. (国内・ポスター) 第 11 回日本再生医療学会総会、2012 年 6 月 12-14 日 (横浜)
5. 三井薫、井手佳菜子、高山明子、小賤健一郎:増殖型アデノウイルスベクターを用いた安全なヒト ES/iPS 細胞治療の開発. (国内・口演) 第 11 回日本再生医療学会総会、2012 年 6 月 12-14 日 (横浜)
6. 小賤健一郎 : 癌の遺伝子異常を標的とした診断と治療の可能性. (国内・特別講演) 第 175 回日本医学放射線学会九州地方会 2012 年 6 月 9-10 日 (鹿児島)
7. Sakamoto K, Khai NC, Wang Y, Maazono R, Tanoue K, Matsufuji H, Hideo T, Kosai K.: HB-EGF/HGF HEPATIC GENE THERAPY FOR BILE DUCT LIGATED CHOLESTATIC LIVER INJURY IN MICE: THEIR DIFFERENT AND/OR SYNERGIC THERAPEUTIC EFFECTS. (国内・口演) 第 17 回日本遺伝子治療学会 2011 年 7 月 15 日-17 日 (福岡)
8. Kosai K., Horikawa Y, Wang Y, Nagano S, Kamizono J, Ikeda M, Komiya S.: ASSESSMENT OF AN ALTERED E1B PROMOTER ON THE SPECIFICITY AND POTENCY OF TRIPLE-REGULATED CONDITIONALLY REPLICATING ADENOVIRUSES (CRA): A NEW INSIGHT TO GENERATE IDEAL m-CRAS. (国内・口演) 第 17 回日本遺伝子治療学会 2011 年 7 月 15 日-17 日 (福岡)
9. 岡部恭典、久佐賀晃、高橋知之、光益千秋、村井恵良、東英穂、松下豊次郎、小賤健一郎、田中永一郎:RTT モデル

ES 細胞由来神経細胞の電気生理学的解析. (国内・シンポジウム) 第 88 回日本生理学会大会、2011 年 3 月 28-30 日 (横浜)

10. 小賤健一郎、岡部共典、久佐賀晃、高橋知之、光益千秋、村井恵良、田中永一郎、松石豊次郎: MeCP2 遺伝子欠損 ES 細胞の in vitro 文化誘導法による Rett 症候群/神経発生の研究システム (国内・口演) 第 10 回日本再生医療学会 2011 年 3 月 1-2 日 (東京)
11. 坂本浩一、Ngin Cin Khai、王宇清、前蘭理恵、高松英夫、松藤凡、小賤健一郎: 胆道閉塞性肝疾患への HB-EGF 生体内再生医療 (国内・口演) 第 10 回日本再生医療学会 2011 年 3 月 1-2 日 (東京)
12. 寺崎寛人、上笹貫太郎、徳重沙織、Ngin Cin Khai、Wang Yuqing、坂本泰二、小賤健一郎: 膜蛋白 CD9 の標的治療は General に作用する新規血管新生阻害剤となる (国内・ポスター) 第 10 回日本再生医療学会 2011 年 3 月 1-2 日 (東京)
13. Yoshiharu Horikawa, Ken-ichiro Kosai. Improved survivin-responsive m-CRA for efficient and safer cancer therapy: A new rule of E1B promoter replacement. (国内・ポスター発表) 第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22-24 日 (大阪)
14. 上笹貫太郎、徳重沙織、坂本泰二、小賤健一郎. 膜蛋白 CD9 標的 RNAi は General に作用する新たな血管新生阻害剤となる. (国内・ポスター発表) 第 114 回日本眼科学会総会、2010 年 4 月 15-18 日

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 1 件)

1. 名称: 癌幹細胞を標的とするウイルスベクター
発明者: 小賤健一郎、王宇清
権利者: 鹿児島大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2012/002031
出願年月日: 2012 年 3 月 23 日

国内外の別: 国外

その他 10 件

○ 取得状況 (計 7 件)

1. 名称: サービビン (Survivin) プロモーターを含む増殖型ベクターを有効成分とする医薬
発明者: 小賤健一郎、神囿純一、永野聡
権利者: 小賤健一郎
種類: 特許
番号: US 8,142,770 B2
取得年月日: 2012 年 3 月 27 日
国内外の別: 国外

その他 6 件

[その他]
ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~anatomy2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小賤 健一郎 (KOSAI KENICHIROU)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 90301663

(2) 研究分担者

三井 薫 (MITSUI KAORU)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号: 40324975

入江 理恵 (IRIE RIE)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 90381178

(3) 連携研究者

近藤 亨 (KONDO TORU)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授
研究者番号: 30270573