

## 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 4 月 26 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591444

研究課題名（和文） 膵癌に対する MDA7/IL-24 を用いた新規遺伝子治療の開発

研究課題名（英文） The novel gene therapy using adeno-associated viral vector mediated MDA7/IL-24 for human pancreatic cancer

研究代表者

相本 隆幸 (AIMOTO TAKAYUKI)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10267122

研究成果の概要（和文）：樹立したハムスター膵癌細胞株を用いハムスター膵癌実験モデルを確立し、MDA7/IL-24 を発現する adeno-associated virus (AAV) ベクターを作製した。新規遺伝子治療と gemcitabine による膵癌治療の相乗効果を検討したところ、遺伝子治療群や併用群では生存期間が延長し、高度な有害事象も認めなかった。今後、さらなる検討が必要であるが、膵癌治療の新たな選択肢として期待される。

研究成果の概要（英文）：We established a orthotropic pancreatic cancer model in hamsters using the pancreatic cancer cell line, PGHAM-1 and generated adeno-associated viral vector expressing MDA7/IL-24. The survival time both in the gene therapy alone and in the gene therapy plus gemcitabine group was longer than that in the control group. There were no detectable side effects. This novel gene therapy is a potentially effective treatment for pancreatic cancer although further studies are needed in the near future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：膵癌、遺伝子治療、MDA7/IL-24, gemcitabine

## 1. 研究開始当初の背景

(1)膵癌は消化器癌の中で最も予後が不良で、5年生存率は10%前後とされる。膵癌の治療は、切除可能であればまず外科的治療が選択されるが、外科治療単独では不十分である。一方、切除不能進行癌では、Gemcitabine の導入により一部の症例で優れた抗腫瘍効果や臨床症状緩和効果が報告されているが、Gemcitabine の奏効率自体は低率で、有効例であっても耐性獲得後は他に効果的な治療

が存在しないのが現状である。

(2)我々は、強力な血管新生抑制作用をもつ Melanoma Differentiation Associated Gene 7/Interleukin-24 (MDA7/IL-24; 以下 IL-24) の抗腫瘍効果を報告してきた。IL-24 は、血管新生抑制作用とともにがん細胞特異的増殖抑制とアポトーシス誘導作用、By stander effect、そして、免疫誘起作用を有しており、近年では抗癌剤や放射線の増強作用や有害

事象の減少効果が報告されている。

## 2. 研究の目的

予後不良とされる膵癌に対し IL-24 を用いた新規遺伝子治療を開発し、Gemcitabine との相乗効果により膵癌の治療成績を向上させるとともにその安全性の検討を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 膵癌転移モデル動物の作製

#### ①ルシフェラーゼ発現膵癌細胞株の樹立

ハムスター膵癌細胞(PGHAM-1)にレンチウイルスベクターにてルシフェラーゼ遺伝子を導入し、ルシフェラーゼ発現膵癌細胞株を樹立する(PGHAM-1/Luc)。

#### ②ルシフェラーゼ発現膵癌実験モデル動物の作製

PGHAM-1/Luc 細胞をハムスターの膵臓に移植し、腫瘍の増殖、転移巣の広がり等を IVIS にて確認する。

### (2) 治療用 AAV ベクターの作製とベクター投与方法の検討

IL-24 発現 AAV ベクターを作製する。投与方法としては、より安全な筋肉注射、を検討する。また、筋肉注射に適した AAV の type を決定する。

### (3) 膵癌細胞に対する IL-24 と gemcitabine の抗腫瘍効果、併用による相乗効果の検討 (in vitro)

PGHAM-1 及びヒト膵癌由来細胞(BxPc3, Capan-1, Panc-1)に IL-24, gemcitabine を投与し、腫瘍増殖抑制効果やアポトーシス誘導を検討する。また、IL-24 併用による gemcitabine の相乗効果を検討する。

### (4) 治療効果実験 (in vivo)

ルシフェラーゼ発現膵癌転移モデル動物に IL-24 発現 AAV ベクター及び gemcitabine を投与し、腫瘍増殖抑制効果、転移抑制効果を IVIS にて経時的に検討するとともに、生存期間、血管新生抑制効果、アポトーシスの誘導、免疫能の誘起等を検討する。

### (5) 抗癌剤との相乗効果や遺伝子治療の安全性の検討

治療効果の得られた遺伝子治療において gemcitabine との相乗効果を検討するとともに、ベクター投与時の肝機能(血中 GOT, GPT)腎機能(BUN, Cre)などの安全性を評価する。

## 4. 研究成果

### (1) 膵癌転移モデル動物の作製

当施設で樹立された PGHAM-1 にレンチウイ

ルスベクターにてルシフェラーゼ遺伝子を導入し、PGHAM-1/Luc の樹立に成功した。

PGHAM-1/Luc をハムスター膵脾葉に移植し、膵癌実験モデルを確立した。膵脾葉への癌生着率は 75%(図 1)、移植 1 週間後より IVIS にて確認された。4 週間後より肝転移が出現し(50%)、その後 20%に腹膜播種を認めた。3 か月以内に全例死亡した(図 2)。

図 1. 膵原発巣と病理組織写真

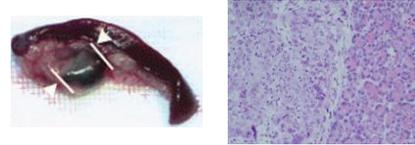
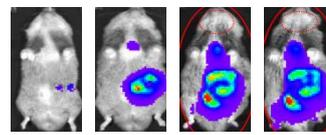


図 2. 移植モデルの経時的観察 (IVIS)

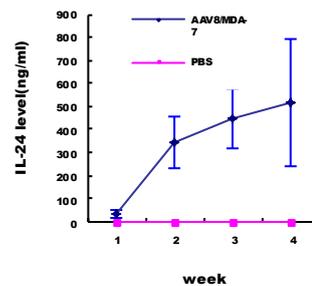


1 週 3 週 7 週 9 週(死亡)

### (2) 治療用 AAV ベクターの作製と AAV 血清型の選択(図 3)

筋肉注射にて高率に治療用蛋白の発現が可能な AAV 血清型を選択後(参考論文⑮) IL-24 発現 8 型 AAV ベクターを筋肉注射で検討したところ、用量依存性・経時的に良好な血清中 IL24 の上昇を認めた。

図 3. 筋肉注射後の血清 IL-24 の変移



### (3) gemcitabine および IL-24 の膵癌細胞に対する増殖抑制効果とアポトーシス誘導、併用による相乗効果の検討

PGHAM-1 に対する増殖抑制効果については、gemcitabine は 3ng/ml で有意に増殖を抑制したが、IL-24 の投与では抑制効果はみられなかった(図 4)。一方、アポトーシス誘導については、gemcitabine が 3ng/ml で有意に誘導したのに対し、IL-24 の投与では誘導がみられなかった(図 5)。

図 4. PGHAM-1 に対する増殖抑制効果

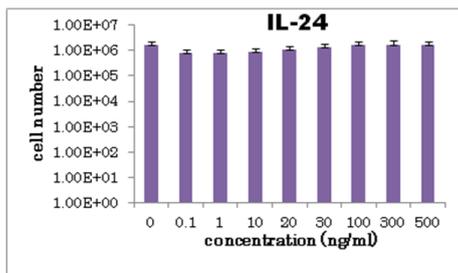
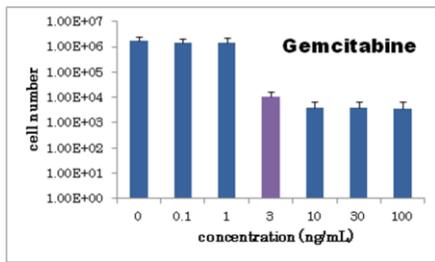
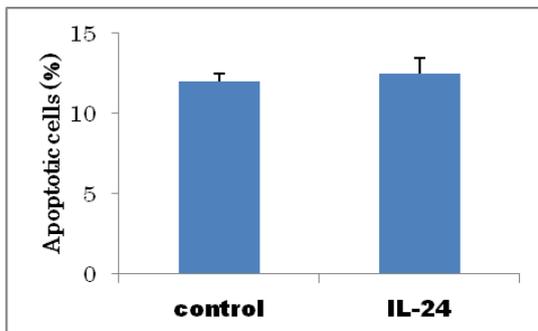
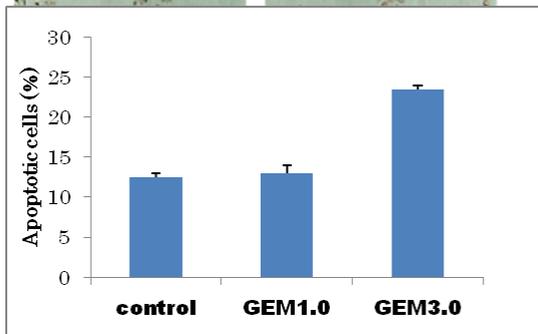
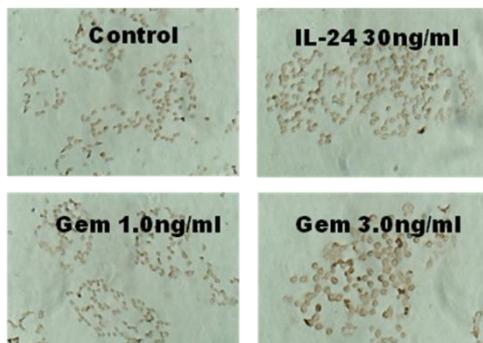


図 5. PGHAM-1 に対するアポトーシス誘導



(4) 治療効果実験 (in vivo)

gemcitabine 投与群および治療用 AAV ベクター投与群とも、コントロール群に比べ腫瘍径の縮小傾向がみられ、生存期間の延長を認めた(コントロール群 9 週 VS gemcitabine 群 10 週 Vs AAV ベクター群 10 週)。また、gemcitabine と治療用 AAV ベクターの併用ではさらに生存期間の延長を認めた(併用群 11 週)。

(5) 有害事象

ベクター投与後及び gemcitabine と治療用 AAV ベクターの併用後の肝機能や腎機能に異常はみられず、問題となる有害事象はみられなかった。

(6) 得られた成果の国内外の位置づけとインパクト

実験結果の蓄積がさらに必要であるが、in vitro と in vivo での結果に乖離がみられる点や in vivo で併用効果に期待が持たれた点が興味深い結果といえる。今後、in vivo における併用療法の相乗効果の立証や By stander effect・免疫能の惹起作用についての検討が必要と思われる。この遺伝子治療が膵癌の治療成績の向上に寄与するとすれば、国内外を問わず、インパクトは絶大といえる。同時に、臨床応用にあたり遺伝子治療そのものの安全性を評価することは大変重要で今後の追試実験がさらに必要である。

(7) 今後の展望

in vivo における実験結果の集積が第一に必要である。生存期間の有意な延長が証明されるなら、臨床応用に向け、本治療の作用機序の解明や大型動物での効果判定をめざしたい。

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 22 件)

① Aimoto T, Uchida E, Matsushita A (6 名, 1 番目): Long-term Outcomes after Frey's Procedure for Chronic Pancreatitis with an Inflammatory Mass of the Pancreatic Head, with Special Reference to Locoregional Complications. 査読有 J Nippon Med Sch 80, 2013, 148-154.

② Komiyama H, Miyake K, Asai K, Mizuno K, Shimada T: Cyclical mechanical stretch enhances degranulation and IL-4 secretion in RBL-2H3 mast cells. Cell Biochemistry & Function 査読有 2013, in press.

③ Igarashi T, Miyake K, Asakawa N, Miyake N, Shimada T, Takahashi H: Direct

Comparison of Administration Routes for AAV8-mediated Ocular Gene Therapy. *Curr Eye Res* 査読有 2013, in press.

④ Mizutani S, Suzuki H, Aimoto T (12 人、3 番目): Time-dependent changes in endoscopic findings of intestine in patient with acute superior mesenteric arterial thrombosis after pancreaticoduodenectomy. *Dig Endosc.* 査読有 24, 2012, 289.

⑤ Takeda K, Aimoto T, Yoshioka M (9 人、2 番目): Dedifferentiated liposarcoma arising from the mesocolon ascendens: report of a case *J Nippon Med Sch* 査読有 79, 2012, 385-390.

⑥ Miyake K, Miyake N, Yamazaki Y, Shimada T, Hirai Y: Serotype-independent Method of Recombinant Adeno-associated Virus (AAV) Vector Production and Purification. *J Nippon Med Sch* 査読有 79, 2012, 394-402.

⑦ Inagawa K, Miyake K, Fukuda K (15 人、13 番目): Induction of cardiomyocyte-like cells in infarct hearts by gene transfer of Gata4, Mef2c, and Tbx5. *Cir Res* 査読有 111, 2012, 1147-1156.

⑧ Sugano H, Matsumoto T, Miyake K, (10 人、3 番目): Successful gene therapy in utero for lethal murine hypophosphatasia. *Hum Gene Ther.* 査読有 23, 2012, 399-406.

⑨ Tamai H, Miyake K, Yamaguchi H, Takatori M, Dan K, Inokuchi K, Shimada T: AAV8 vector expressing IL24 efficiently suppresses tumor growth mediated by specific mechanisms in MLL/AF4-positive ALL model mice. *Blood* 査読有 119, 2012, 64-71.

⑩ Aimoto T, Uchida E, Nakamura Y (8 人、1 番目): Current Surgical Treatment for Chronic Pancreatitis. *J Nippon Med Sch* 査読有 78, 2011, 352-359.

⑪ Katsuno A, Aimoto T, Uchida E, Tabata Y, Miyamoto M, Tajiri T: The controlled release of basic fibroblast growth factor promotes a rapid healing of pancreaticojejunal anastomosis with potent angiogenesis and accelerates apoptosis in granulation tissue. *J Surg Res* 査読有 167, 2011, 166-172.

⑫ Tamai H, Miyake K, Yamaguchi H (8 人、2 番目): Resistance of MLL-AFF1-positive acute lymphoblastic leukemia to tumor necrosis factor-alpha is mediated by S100A6 up-regulation. *Blood Cancer Journal* 査読有 1, 2011, e38.

⑬ Tamai H, Miyake K, Takatori M (8 人、2 番目): Activated K-Ras protein accelerates human

MLL/AF4-induced leukemo-lymphomogenicity in a transgenic mouse model. *Leukemia* 査読有 25, 2011, 888-891.

⑭ Miyake N, Miyake K, Yamamoto M, Hirai Y, Shimada T: Global gene transfer into the CNS across the BBB after neonatal systemic delivery of single-stranded AAV vectors. *Brain Res* 査読有 10, 2011, 19-26.

⑮ Isotani M, Miyake K, Miyake N, Hirai Y, Shimada T: Direct comparison of four adeno-associated virus serotypes in mediating the production of antiangiogenic proteins in mouse muscle. *Cancer Invest* 査読有 29, 2011, 353-359.

⑯ Wakita S, Yamaguchi H, Miyake K, Mitamura Y, Kosaka F, Dan K, Inokuchi K: Importance of c-kit mutation detection method sensitivity in prognostic analyses of t(8;21)(q22;q22) acute myeloid leukemia. *Leukemia* 査読有 25, 2011, 1423-1432.

⑰ Yasuda T, Miyake K, Takada M (12 人、8 番目): Parkin-mediated protection of dopaminergic neurons in a chronic MPTP-minipump mouse model of Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 査読有 70, 2011, 686-697.

⑱ Ueda J, Nakamura Y, Aimoto T (8 人、3 番目): Laparoscopic distal pancreatectomy preserving spleen and splenic vessels for pancreatic insulinoma. *J Nippon Med Sch* 査読有 77, 2010, 175-180.

⑲ Miyake N, Miyake K, Karlsson S, Shimada T: Successful treatment of metachromatic leukodystrophy using bone marrow transplantation of HoxB4 overexpressing cells. *Mol Ther* 査読有 18, 2010, 1373-1378.

⑳ Yasuniwa Y, Miyake K, Kashiwagi E (18 人、9 番目): Circadian disruption accelerates tumor growth and angio/stromagenesis through a Wnt signaling pathway. *PLoS One* 査読有 5, 2010, e15330.

㉑ Matsumoto T, Miyake K, Yamamoto S (12 人、3 番目): Rescue of severe infantile hypophosphatasia mice by AAV-mediated sustained expression of soluble alkaline phosphatase. *Hum Gene Ther* 査読有 22, 2010, 1355-1364.

㉒ Miyake K, Utsugisawa T, Flygare J, Kiefer T, Hamaguchi I, Richter J, Karlsson S: RPS19 deficiency leads to reduced proliferation and increased apoptosis but does not affect terminal erythroid differentiation in a cell line model of Diamond-Blackfan anemia. *Stem Cells* 査読

有 26, 2010, 323-329.

[学会発表] (計 37 件)

- ①相本隆幸: 膵癌に対する左方アプローチ膵頭十二指腸切除術、日本臨床外科学会総会 (第 74 回)、2012 年 12 月、東京
- ②相本隆幸: 膵癌に対する左方アプローチ膵頭十二指腸切除術、日本消化器外科学会大会 (第 10 回)、2012 年 10 月、神戸
- ③相本隆幸: 膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) 由来浸潤癌に対する治療戦略、日本消化器外科学会総会 (第 67 回)、2012 年 7 月、富山
- ④Aimoto T: Left posterior approach for pancreaticoduodenectomy for pancreatic head cancer, 44th meeting of the European Pancreatic Club, 2012.6, Prague, Czech
- ⑤相本隆幸: 切除可能膵癌に対する Gemcitabine を用いた術前化学療法、日本肝胆膵外科学会・学術集会 (第 24 回)、2012 年 5 月、大阪
- ⑥相本隆幸: 膵頭十二指腸切除術に対する行程別教育プログラムの実績と成果、日本外科学会 (第 112 回)、2012 年 4 月、千葉
- ⑦Iijima O, Miyake K: Rescue of lethal hypophosphatasia mice by neonatal ex vivo gene therapy using lentivirally transduced bone marrow cells. 54th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, 2012.12, Atlanta, USA
- ⑧Miyake N, Miyake K: AAV9 mediated gene therapy of MLD model mice. 20th Annual Meeting of the European Society of Gene & Cell Therapy, 2012.10, Versailles, France
- ⑨Miyake N, Miyake K: Gene therapy of adult MLD model mice by intrathecal administration of type 9 AAV vector. 第 4 回国際ライソゾーム病フォーラム・第 17 回日本ライソゾーム病研究会、2012 年 10 月、東京
- ⑩Miyake N, Miyake K: Successful treatment of adult MLD model mice by intrathecal administration of type 9 AAV vector. The 18th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2012 年 6 月、熊本
- ⑪Sugano H, Miyake K: Successful gene therapy in utero for lethal murine hypophosphatasia. 6th Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia International Symposium, 2012.5, Huingue, France
- ⑫Miyake N, Miyake K: Gene therapy of adult MLD model mice by intrathecal administration of type 9 AAV vector. 15th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy, 2012.5, Philadelphia, USA

- ⑬相本隆幸: 当科における膵頭十二指腸切除術に対する教育プログラム、日本消化器外科学会大会 (第 9 回)、2011 年 11 月、福岡
- ⑭相本隆幸: グループ膵癌、日本癌学会学術総会 (第 70 回)、2011 年 10 月、名古屋
- ⑮相本隆幸: 切除可能膵癌に対する術前化学療法、日本癌治療学会学術集会 (第 49 回)、2011 年 10 月、名古屋
- ⑯相本隆幸: 膵頭十二指腸切除術後の膵液瘻に対するドレーン管理、日本消化器外科学会総会 (第 66 回)、2011 年 7 月、名古屋
- ⑰相本隆幸: 切除可能膵癌に対する gemcitabine を用いた術前化学療法、日本膵臓学会大会 (第 42 回)、2011 年 7 月、青森
- ⑱Aimoto T: Efficacy of a fluted drain with continuous suction on pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy. 43rd meeting of the European Pancreatic Club, 2011.6, Magdeburg, Germany
- ⑲相本隆幸: PD 術後膵液瘻に対するドレーン管理: 基礎的実験と臨床例の検討、日本肝胆膵外科学会・学術集会 (第 23 回)、2011 年 6 月、東京
- ⑳玉井 勇人, 三宅 弘一: The effect and specific mechanisms of systemic gene therapy using AAV8-IL24 in MLL/AF4 Tg mice. 第 73 回日本血液学会学術集会、2011 年 10 月、名古屋
- ㉑Miyake N, Miyake K: Gene Therapy for MLD by Intrathecal Administration of Type 9 AAV Vector Expressing ASA. The 17th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2011 年 7 月、福岡
- ㉒Miyake K: AAV Type 8 Mediated Bone-Targeted and Muscle Directed Neonatal Gene Therapy for Hypophosphatasia. The 17th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2011 年 7 月、福岡
- ㉓Miyake K: Development of cell targeting strategy using HIV vector pseudotyped with HIV envelope. The 17th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2011 年 7 月、福岡
- ㉔Matsumoto T, Miyake K: Successful Treatment of Hypophosphatasia Model Mice by a Single Intramuscular Injection of AAV Type 8 Vector Expressing Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase. 14th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy, 2011.5, Seattle, USA
- ㉕Miyake N, Miyake K: Intrathecal Administration of Type 9 AAV Vector Expressing Arylsulfatase A Is Effective for Reduction of Sulfatide Storage but Not for Correction of Neurological Deficits in

Adult Metachromatic Leukodystrophy Model Mice with Overt Neurological Symptoms. 14th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy, 2011.5, Seattle, USA

②⑥相本隆幸：膵液瘻なき膵消化管吻合術をめざして：bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲル投与の意義、日本創傷治癒学会（第40回）、2010年12月、東京

②⑦相本隆幸：IPMN 由来の浸潤癌における外科治療成績、日本臨床外科学会総会（第72回）、2010年11月、横浜

②⑧相本隆幸：IPMN 由来の浸潤癌症例の臨床病理学的検討、日本消化器外科学会大会（第8回）、2010年10月、横浜

②⑨相本隆幸：バイオマテリアルを用いた膵空腸吻合部の創傷治癒促進の試み-術後膵液瘻克服をめざして、日本消化器外科学会総会（第65回）、2010年7月、下関

③⑩相本隆幸：肝胆膵外科領域における術後合併症対策：胆汁漏及び膵液漏対策を中心に、日本消化器外科学会総会（第65回）、2010年7月、下関

③⑪Aimoto T: Controlled release of basic fibroblast growth factor causes rapid healing of pancreaticojejunostomy, 42th meeting of the European Pancreatic Club, 2010.6, Stockholm, Sweden.

③⑫相本隆幸、膵腸吻合部の創傷治療に対するbFGF 含浸ゼラチンハイドロゲル投与の意義、日本外科学会定期学術集会（第110回）、2010年4月、名古屋

③⑬Tamai H, Miyake K: The Activated K-RAS Protein Accelerates Human Derived-MLL/AF4 Induced Leukemo- Lymphomogenicity In Transgenic Mice Model. 18th European Society of Gene and Cell Therapy Annual Congress, 2010.10, Prague, Czech

③⑭Tamai H, Miyake K: MLL/AF4 Positive Acute Lymphoblastic Leukemia Has Resistance to Tumor Necrosis Factor-Alpha Caused by up-Regulation of S100A6. 18th European Society of Gene and Cell Therapy Annual Congress, 2010.10, Prague, Czech

③⑮三宅 弘一, Wang Nanya: Development of adeno-associated viral (AAV) vector mediated muscle directed systemic anti-angiogenic cancer gene therapy. 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月、大阪

③⑯玉井 勇人, 三宅 弘一: Gene Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia with MLL/AF4 Using AAV8-IL24. 第72回日本血液学会総会、2010年9月、横浜

③⑰玉井 勇人, 三宅 弘一: Establishment and Characterization of A New Lymphoid Malignancy Mouse Model Induced by the

combination of MLL/AF4 and K-RAS. 第72回日本血液学会総会、2010年9月、横浜

〔図書〕（計2件）

①Miyake K, Shimada T, InTech, Novel Gene Therapy Approaches, 2013, 396 (119-127) .

②Miyake K, Shimada T, InTech, Viral Gene Therapy, 2011, 450 (355-370) .

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

相本 隆幸 (AIMOTO TAKAYUKI)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10267122

### (2) 研究分担者

三宅 弘一 (MIYAKE KOUICHI)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：90267211