

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592354

研究課題名(和文) 難治性膀胱癌に対するキメラ型細胞融解性ベクターを用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapy using novel chimeric oncolytic adenovirus vector for intractable bladder cancer.

研究代表者

後藤 章暢 (Gotoh, Akinobu)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70283885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、これまで行われてきたアデノウイルスベクターを用いた治療で効果が認められなかったタイプの膀胱癌に対して、アデノウイルスベクターのファイバーノブを置換することで、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療の効果を増強することが出来るかという課題について実験を行った。結果として、培養実験と動物実験において、ファイバーノブを置換したアデノウイルスベクターによる遺伝子治療の効果を増強することが可能であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined whether the fiber knob substituted adenovirus vector enhance the therapeutic effect of gene therapy for human bladder cancer which do not have a significant effect on therapeutic outcome of adenovirus gene therapy. Our data showed the novel fiber knob substituted adenovirus vector, Ad5F35/MK, is more useful for the gene therapy of bladder cancer than the non fiber knob substituted Ad5/MK is for human bladder cancer in vitro and in vivo.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：膀胱癌 アデノウイルスベクター 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

癌に対する遺伝子治療臨床研究の領域において、欧米を中心に 5 型アデノウイルス (Ad5) ベクターを用いた遺伝子導入法の開発が進んでおり、近年は、細胞融解性 Ad5 を用いた遺伝子治療の基礎および臨床研究が主流となっている。また安全性の面から、導入遺伝子を癌細胞に対し特異的かつ効率良く発現させるために、癌細胞内で特異的に活性化される腫瘍特異的プロモーターを用いた癌遺伝子治療法の開発が盛んにおこなわれている。これまでに我々は、膀胱癌に対する腫瘍特異的プロモーターとしてミドカイン(MK)プロモーターに着目し、ヒト膀胱癌細胞株 KK47 に対する MK プロモーターの有用性および MK プロモーターを組み込んだ細胞融解性 Ad5 ベクターの抗腫瘍効果を証明してきた。しかし、細胞融解性 Ad5 ベクターを用いた遺伝子治療をもってしても、特に悪性度の高い癌においては、期待されたほどの治療効果が得られていないのが現状である。その理由の一つに、特に悪性度の高い癌細胞においては、Ad5 の受容体である Coxsackie and Adenovirus Receptor (CAR) の発現が低く、Ad5 ベクターの導入効率が非常に悪いことが判明している。ヒト膀胱癌細胞株を用いた我々の基礎実験においても、悪性度の高い細胞株では CAR の発現が極めて低く、Ad5 ベクターの導入効率も非常に低い。この問題を解決するため、近年、CAR 非依存的な感染能力を有する様々なベクターの開発が進められているが、未だ臨床応用されていない。今回、悪性度の高い細胞株に対する遺伝子導入効率を向上させるため、我々は、Ad5 ベクターのファイバー・ノブ領域を 35 型アデノウイルス(Ad35)のファイバー・ノブ領域で置換したキメラ型アデノウイルスベクター (Ad5F35)に着目し、その作製方法を検討してきた。Ad35 の受容体である CD46 タンパク質は、赤血球以外のヒト細胞に広く発現してお

り、特に腫瘍細胞では高発現している。我々のデータでは、悪性度の高いヒト膀胱癌細胞株においても CD46 の高発現が認められた。また、Ad5 ベクターおよび Ad5F35 ベクターに LacZ 遺伝子を導入した Ad5-LacZ と Ad5F35-LacZ を用いて遺伝子導入効率を検討した結果、Ad5-LacZ の遺伝子導入効率と比較して、キメラ型アデノウイルスベクターでは悪性度の高いヒト膀胱癌細胞株に対する遺伝子導入効率が劇的に向上した。この結果から、悪性度の高い細胞株に対してアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療を試みる場合、これまで用いられてきた Ad5 ベクターを用いるよりは、CAR 非依存性の感染能力を有するキメラ型細胞融解性アデノウイルスベクターである Ad5F35 ベクターを用いる方が抗腫瘍効果において有用であり、新規遺伝子治療法としての実際の臨床研究に向けた有用な方法と考えられた。

そこで本研究で我々は、難治性膀胱癌に対する新規治療法としてキメラ型細胞融解性アデノウイルスベクターである Ad5F35 ベクターを用い、この方法の確立は多くの難治性膀胱癌患者に対して福音となると考えている。また新規の生物製剤の創薬事業としても本研究成果は純国産遺伝子治療法に相当し、これまでの本分野の治療法の権利の大半が欧米におさえられている現状を打開するものと考えている。

2. 研究の目的

本研究では、再発率が高く、予後不良である浸潤性膀胱癌に対する QOL を重視した新規治療法として純国産の遺伝子治療薬の開発を目指す。過去に、本疾患に対する様々な実験的治療法が施行されてきたが、未だ有用な治療法は確立されていない。これまでの課題を克服するために、ヒト膀胱癌細胞株に対する腫瘍特異性プロモーターであるミドカインプロモーターを組み込み、Ad5 のファイ

バー・ノブ領域を Ad35 のファイバー・ノブ領域で置換した CAR 非依存性の感染能を有するキメラ型細胞融解性アデノウイルスベクターである Ad5F35 ベクターを作製する。それを用いた難治性膀胱癌に対する新規治療法の臨床応用への可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1)キメラ型細胞融解性アデノウイルスベクター (Ad5F35/MK)の作製

Ad5 のファイバー・ノブ領域を Ad35 のファイバー・ノブ領域で置換したプラスミドベクター (pAd5F35) を作製する。Ad5 の E1A 転写調節領域を除き、そこにマルチクローニング部位とその 3' 下流に E1A、E1B 遺伝子を有するプラスミドベクター (pS-PL/ E1A-E1B) を作製し、腫瘍特異性プロモーターとして MK プロモーターをマルチクローニング部位に挿入する。上述の両プラスミドベクターを制限酵素ユニーク部位と呼ばれる I-CeuI と PI-SceI で切断して得られた断片をライゲーションして、1本のプラスミドベクターとする。得られたプラスミドベクターに PacI 処理を加えて、293 細胞にトランスフェクションすることで、キメラ型細胞融解性アデノウイルス Ad5F35/MK ベクターを作製する。作製した Ad5F35/MK ベクターを、293 細胞へ感染させることで増殖させた後、Ad5F35/MK を精製し、精製されたウイルスの生物学的および物理的タイターを測定する。作製した Ad5F35/MK ベクターを、各種のヒト培養細胞を用いて、様々なウイルス粒子数で感染させ、殺細胞効果を Alamar blue assay により検討し、非治療群および Ad5F35/MK 投与群における抗腫瘍効果の比較検討を行う。

(2)ヒト膀胱癌細胞株における抗腫瘍効果の検討

本研究で用いるヒト膀胱癌細胞株は、これまでの我々のデータによって Ad5 ベクターの

導入効率が低いと判断された細胞株 (T24、TCC-SUP、253J) と Ad5 ベクターの導入効率が高いと判断された細胞株 KK47 である。様々なウイルス粒子数で Ad5F35/MK ベクターをヒト膀胱癌細胞株に感染させ、殺細胞効果を Alamar blue assay などにより検討し、非治療群および Ad5F35/MK 投与群における抗腫瘍効果の比較検討を行う。

(3)マウスを用いた抗腫瘍効果の検討

膀胱癌細胞株 T24 を用いて、in vivo における抗腫瘍効果の検討を行う。Balb/C nu/nu マウスの背側皮下に該当する細胞株 (1×10^6 個/腫瘍) を移植し、マウス膀胱癌皮下腫瘍モデルを形成する。腫瘍径が 5mm に到達した時点で、アデノウイルスベクターによる治療を開始する。本実験は、PBS 投与群 (非治療群)、Ad5/MK 投与群、および Ad5F35/MK 投与群に振り分け、各群 6 匹のマウスを使用する。治療前より 1 週間ごとに腫瘍体積を測定し、抗腫瘍効果を検討する。また、非治療群の最大腫瘍体積がマウス体重の 10% に到達した時点でマウスを兵庫医科大学での動物実験規程に従って屠殺し、治療部位の病理組織学的検討を行う。

4. 研究成果

(1)キメラ型細胞融解性アデノウイルス (Ad5F35/MK) ベクターの作製

Ad5 のファイバー・ノブ領域を Ad35 のファイバー・ノブ領域で置換したプラスミドベクター (pAd5F35) を作製した。マルチクローニング部位とその 3' 下流に E1A、E1B 遺伝子を有するプラスミドベクター (pS-PL/E1A-E1B) を作製し、腫瘍特異性プロモーターとして MK プロモーターをマルチクローニング部位に挿入した。上述の両プラスミドベクターを制限酵素 I-CeuI と PI-SceI で切断した。得られた断片をライゲーションして、1本のプラスミドベクターとした。得られたプラスミドベクターに PacI 処理を加えて、293 細胞に

トランスフェクションすることで、キメラ型細胞融解性アデノウイルスベクターである Ad5F35/MK ベクターを作製した。作製した Ad5F35/MK ベクターを、293 細胞へ感染させることで増殖させた後、Ad5F35/MK ベクターを精製し、精製されたウイルスの生物学的および物理的タイターを測定した。

(2) ヒト膀胱癌細胞株における抗腫瘍効果の検討

用いたヒト膀胱癌細胞株 (253J、5637、KK-47、T24、TCCSUP、UMUC-3) のうち、T24、TCCSUP において、CAR の発現が低下していることを確認した。また、CD46 は全てのヒト膀胱癌細胞株において 293 細胞と同等のレベルで発現していることを確認した。一方、MK の発現は、5637 において 293 細胞と同等のレベルで発現しており、253J、KK-47、T24、TCCSUP においては 293 細胞よりも発現レベルが低く、UMUC-3 において 293 細胞よりも非常に低いことを確認した。そこで、ヒト膀胱癌細胞株に対する Ad5F35/MK ベクターの抗腫瘍効果を調べたところ、MK 発現が低かった UMUC-3 以外の全ての細胞株において Ad5F35/MK ベクターによる抗腫瘍効果を確認することができた。また、KK-47、UMUC-3 細胞株以外ではファイバー・ノブ領域の置換による抗腫瘍効果の増強を確認することができた。

(3) マウスを用いた抗腫瘍効果の検討

(1)、(2)の結果から、CAR 低発現膀胱癌細胞株を用いて作製した膀胱癌皮下移植マウスにおいても抗腫瘍効果があることが期待された。そこで、CAR 発現が低レベルであるヒト膀胱癌細胞株 T24 を用いて膀胱癌皮下移植マウスを作製し、Ad5F35/MK ベクターの抗腫瘍効果を検討した。腫瘍が形成された局所にアデノウイルスベクター 1×10^{10} virus particles/マウスの条件で皮下投与し、その抗腫瘍効果を調べるために腫瘍径を経時的

に測定した。Ad5F35/MK 投与群では PBS 投与群と比較して、腫瘍体積の増加が抑制されることが観察された。一方、Ad5F35/MK 投与による体重減少は観察されなかったことから、強い副作用はないと考えられた。

これらの結果は、Ad5F35/MK は遺伝子治療薬として臨床への応用が可能であると示唆している。

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4件)

Niba ET, Nagaya H, Kanno T, Tsuchiya A, Gotoh A, Tabata C, Kuribayashi K, Nakano T, Nishizaki T. Crosstalk between PI3 Kinase/PDK1/Akt/Rac1 and Ras/Raf/MEK/ERK Pathways Downstream PDGF Receptor. Cell Physiol Biochem 2013;31:905-13 査読有

Masachika E, Kanno T, Nakano T, Gotoh A, Nishizaki T. Naftopidil induces apoptosis in malignant mesothelioma cell lines independently of 1-adrenoceptor blocking. Anticancer Res 2013;33:887-94 査読有

Gotoh A, Nagaya H, Kanno T, Tagawa M, Nishizaki T. Fiber-substituted conditionally replicating adenovirus Ad5F35 induces oncolysis of human bladder cancer cells in in vitro analysis. Urology 2013;81:920.e7-11 査読有

Nagaya H, Gotoh A, Kanno T, Nishizaki T. A₃ Adenosine receptor mediates apoptosis in in vitro RCC4-VHL human renal cancer cells by up-regulating AMID expression. J Urol 2013;189:321-8 査読有

[学会発表](計4件)

長屋寿雄, 中川佑介, 宮田剛彰, 下村欣也,

小山倫浩,後藤章暢. 生薬成分と分子標的薬を用いた併用療法によるがん治療のための基礎研究. 第 23 回泌尿器科分子・細胞研究会 2014.3.14~15 山形

長屋寿雄, 中川佑介, 宮田剛彰, 下村欣也, 日和佐一弘, 中野孝司, 西崎知之, 後藤章暢. Crosstalk between ERK and Akt pathways in malignant mesothelioma cells(中皮腫細胞株における ERK シグナルと Akt シグナルのクロストークの検討). 第 72 回日本癌学会学術集会 2013.10.3~5 横浜

中川佑介, 長屋寿雄, 宮田剛彰, 下村欣也, 日和佐一弘, 西崎知之, 後藤章暢. Antitumor Effect of Alpha1-Adrenoceptor Blockers on Human Urological Cancer Cells(泌尿器系癌に対する α 1 ブロッカーの抗腫瘍効果の検討). 第 72 回日本癌学会学術集会 2013.10.3~5 横浜

Nagaya H, Kanno T, Hiwasa K, Nakagawa Y, Shimomura K, Nakano T, Nishizaki T, Tagawa M, Gotoh A. Oncolytic effects of a fiber knob substituted adenovirus vector to human lung cancer cells. 第 19 回日本遺伝子治療学会年次学術集会 2013.7.4~6 岡山

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :

取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 章暢 (GOTOH, Akinobu)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 70283885

(2) 研究分担者

長屋 寿雄 (NAGAYA, Hisao)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 60464343

(3) 連携研究者

田川 雅敏 (TAGAWA, Masatoshi)
千葉県がんセンター・病理研究部・部長
研究者番号 : 20171572