

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659159

研究課題名(和文) ヒトES/iPS細胞由来の腫瘍を標的治療する増殖型アデノウイルス技術の開発

研究課題名(英文) Development of conditionally replicating adenovirus that treats human ES/iPS-derived tumor

研究代表者

小賤 健一郎 (Kosai, kenichirou)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：90301663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトES細胞、iPS細胞を用いた再生医療技術の臨床応用において、混在した未分化細胞から生じる腫瘍の克服は、重要な課題である。研究者が癌治療用に独自開発したm-CRA(多因子で精密に癌特異化する増殖制御型アデノウイルスベクター)技術を用いて、この問題をある程度解決できることを示唆する科学的成果を得た。科学的にも独創的な研究であり、先端医療実現を進めるという点でも意義ある成果と思われる。

研究成果の概要(英文)：The tumor that is derived from the contaminated undifferentiated-cells is the major obstacle to the clinical application of human ES and/or iPS cell-based regenerative medicine. Here we developed a novel methodology that might conquer this obstacle to some degrees using m-CRA (conditionally replicating adenovirus with multiple tumor-specific factors), which we had initially developed for treating cancer. This methodology is not only a scientifically novel and original but also meaningful in terms of facilitating clinical development of these sorts of innovative therapy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：再生医学

1. 研究開始当初の背景

(1) 学術的背景と国内外の研究動向及び位置づけ

ヒトES細胞/iPS細胞による再生医学の開発は社会的にも大きく期待されている。ヒトES細胞の臨床試験は米国で開始され、ヒトiPS細胞も網膜色素上皮で臨床研究を開始されている。しかし臨床応用における最重要の克服課題は腫瘍化(奇形種ならびに癌化)の阻止であり、特にiPS細胞では科学的には高率な直接の癌化も指摘されている。よって再生医療という観点からは「腫瘍化の阻止・治療技術の開発」は、現在の重要課題であるが、これまでの取り組みは、c-mycを除いたりプログラミング法、染色体組み込みのない遺伝子導入法など、「iPS作製時の発癌リスクの軽減」に主点がある。我々は別の観点から「全能性幹細胞の腫瘍化細胞を『直接』標的治療する技術を開発」という、新しい方向からこの問題の解決を試みるものであり、国内外の研究と比較しても独創性が極めて高い。

(2) これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

研究代表者は、遺伝子治療黎明期に米国でベクター開発に取り組んだ後(PNAS 1995, 1996)、本邦の自身の研究室で、画期的な癌遺伝子治療のためのm-CRAベクター(多因子で同時に精密に癌特異標的治療できる増殖制御型アデノウイルスベクター)の効率的作製法に世界で初めて成功した(*Gene Ther* 2005; 国内特許成立、欧米指定国移行中)。この技術で開発したSurvivin反応性m-CRA(Surv.m-CRA)は革新的な癌治療薬として(*Cancer Res* 2005; 特許は米日出願)、医師主導治験を予定して、非臨床試験中である。

ES/iPS細胞での再生医学研究には①分化誘導法の研究(*J Circ* 2004; 同誌表紙)だけでなく、「遺伝子治療のベクター・発現調節技術をES細胞の再生医学研究に初めて本格的に導入」し、②「ES細胞由来の目的細胞を確実に単離できる」Adenoviral conditional targeting in ES法の開発に成功した(*Mol Ther* 2006, 同誌表紙・ニュース)。本研究で研究代表者の両分野の研究を統合することで、③「m-CRAベクターを用いてES/iPS細胞由来の腫瘍化細胞を治療できる」と着想するに至った。

2. 研究の目的

全能性幹細胞のヒトES細胞、iPS細胞の応用において、腫瘍化は最重要の克服課題であるが、これまではプログラミング法の改良による腫瘍化抑制しか報告がない。本研究は、革新的な癌遺伝子治療技術として研究者が独自開発したm-CRAベクター作製技術を異分野の幹細胞再生医学に応用することで、腫瘍化ES/iPS細胞を標的治療するm-CRAベクターを開発して本問題を克服する新技術を開発する。

3. 研究の方法

「癌治療用に開発したm-CRAベクター技術にて、ヒトES/iPS細胞由来の腫瘍細胞を直接標的化(将来の診断技術の基盤の可能性もあり)でき、さらに治療できる技術の開発」に関し、以下の研究方法で行った。成果は、その後の臨床への応用(診断、治療)の研究発展とその活用のため、基盤技術として論文発表前に特許出願することとした。

- (1) m-CRAでの未分化/腫瘍化細胞の同定・治療技術の基本能力の*in vitro*検証
- (2) *in vivo*動物実験にてES/iPS由来の細胞移植におけるm-CRAの腫瘍発生阻止効果を検証

詳細は次項の「研究成果」に併せて記載する。

4. 研究成果

- (1) m-CRAでの未分化/腫瘍化細胞の同定・治療技術の基本能力の*in vitro*検証
腫瘍特異的プロモーター(Ap, Bp)の各分化状態での活性相関

ヒトES細胞、ヒトiPS細胞を、1)未分化コロニー(MEFフィーダー+ヒト多能性幹細胞用培地)、2)非特異的な分化細胞、3)心筋分化細胞にて、Ap, Bp下にLacZを発現する非増殖型アデノウイルスを感染させプロモーターアッセイを行った。Es、iPS細胞の未分化状態で、Ap, Bpは予想を上回る高活性を示し、分化状態では未～低活性を示した。

- (2) m-CRAによる*in vitro*での未分化・腫瘍化細胞の同定と標的殺傷作用の検証

既にAp, Bpでアデノウイルス増殖制御部E1Aを発現制御し、マーカー遺伝子EGFPを発現するA反応性m-CRA(A.m-CRA)、B反応性m-CRA(B.m-CRA)を未分化と分化状態の

細胞系に感染させた。

プロモーターの未分化特異的活性に想関して、ES、iPS 細胞の未分化細胞を優位に殺傷した。

(3) *in vivo* 動物実験にて ES/iPS 由来の細胞移植における m-CRA の腫瘍発生阻止効果を検証

A. m-CRA と B. m-CRA を未分化 ES、iPS 細胞に感染後、免疫不全マウスに細胞移植して、腫瘍形成抑制能をみた。コントロールに比べ、A. m-CRA と B. m-CRA で著明な腫瘍抑制ができる結果が示された。

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. Yuge K, Takahashi T, Khai NC, Goto K, Fujiwara T, Fujiwara H, Kosai K. : Intramuscular injection of adenoviral hepatocyte growth factor at a distal site ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Int J Mol Med*. 査読有, 33(5):1064-1074, doi:10.3892/ijmm.2014.1686, 2014
2. Tanoue K, Wang Y, Ikeda M, Mitsui K, Irie R, Setoguchi T, Komiya S, Natsugoe S, Kosai K. : Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus kills rhabdomyosarcoma stem cells more efficiently than their progeny. *J Trans Med*. 査読有, 12:27. doi:10.1186/1479-5876-12-27, 2014
3. Irie-Maezono R. and Tsuyama S. : Immunohistochemical analysis of the acid secretion potency in gastric parietal cells., *Open journal of Cell biology*. 査読有, 2:179-185, doi.org/10.4236/cellbio.2013.24020, 2013
4. Okabe Y, Takahashi T, Mitsumasu C, Kosai K, 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, doi:10.1371/journal.pone.0035354, 2012
5. 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, 3:758. doi:10.1038/ncomms1755, 2012
6. Kamisasanuki T, 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, 413(1):128-35, 2011

7. 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
8. 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(6):594-596, 2011
9. 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

[学会発表] (計 19 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, Maezono 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

3. 小戩健一郎. 新しい遺伝子治療ウイルスベクターの開発と基礎・臨床への応用. (国内・ランチョンセミナー) 第 91 回 日本生理学会大会、2014 年 3 月 16 日 (鹿

- 児島)
4. 三井薫、高橋知之、井手佳菜子、小賤健一郎。アデノウイルスベクターでのヒト多能性幹細胞への効率的遺伝子導入技術の開発。(国内・ポスター) 第13回日本再生医療学会総会、2014年3月4-6日(京都)
 5. 井手佳菜子、三井薫、小賤健一郎：多能性幹細胞の再生医療応用における新規腫瘍化阻止技術の開発(1)ヒトES細胞での検証(国内・口頭発表) 第7回桜ヶ丘地区基礎系研究発表会。2014年1月16日(鹿児島)
 6. 松下洋平、井手佳菜子、三井薫、小賤健一郎：多能性幹細胞の再生医療応用における新規腫瘍化阻止技術の開発(2)マウスES細胞での検証(国内・口頭発表) 第7回桜ヶ丘地区基礎系研究発表会。2014年1月16日(鹿児島)
 7. 小賤健一郎：癌を標的治療する増殖型アデノウイルスの独自技術開発と臨床応用への展望。鹿児島がんフォーラム2013年11月30日(鹿児島)
 8. 宮崎 優美、王 宇清、三井 薫、丁 強、政 幸一郎、松原 修一郎、小賤 健一郎、高尾 尊身：Immunohistochemical comparative analysis of the sphere cells of CD133-positive pancreatic cancer cells with iPS cells. CD133+膵がん Sphere 形成細胞と iPS 細胞の免疫組織学的比較解析。第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3-5日(横浜)
 9. 小賤健一郎：革新的ながん治療薬(癌だけを殺すウイルス)の開発と臨床応用に向けて。鹿児島大学公開講座 2013年7月27日(鹿児島)
 10. 井手佳菜子、三井薫、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・口頭発表) 第6回桜ヶ丘地区基礎系研究発表会。2013年1月24日(鹿児島)
 11. 小賤健一郎：再生医療と癌の遺伝子治療-技術と臨床応用の現状と展望-。(国内・特別講演)平成24年度鹿児島大学医学部産科学婦人科学教室碩門会。2012年12月1日(鹿児島)
 12. 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)
 13. Kiyonori Tanoue, Yuqing Wang, Takao Setoguchi, Setsuro Komiya, Shoji Natusgoe, 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)
 14. 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)
 15. 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)
 16. 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)
 17. 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)
 18. Sakamoto K, Khai NC, Wang Y, Maezono 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)
 19. 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)
- [図書] (計0件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計9件)
- 取得状況 (計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

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