

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659655

研究課題名（和文）人工ウイルスによる画像診断に基づく個別化治療選択の確立

研究課題名（英文）Establishment of therapy for individual based on diagnostic imaging by artificial virus

研究代表者

田中 雅夫（TANAKA MASAO）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：30163570

研究成果の概要（和文）：

HGF/c-MET の経路が腫瘍と間質の相互作用においてウイルス治療の効率を減少させることを明らかにした。また、特定の高悪性度癌細胞集団を選択的に検出するための標的分子として CXCR4, c-MET を選択し、これに選択的な MRI 造影剤を作成し、実際に in vivo でマウスに投与した。その結果、標的臓器の分子イメージングの足がかりとなる結果を認めた。

研究成果の概要（英文）：

We revealed HGF/c-MET pathway reduced the efficacy of virus therapy through cancer-stroma interaction. To selectively detect the specific high-grade cancer cell population, we selected CXCR4 and c-MET and created selective MRI imaging agent.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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・消化器外科学

キーワード：腫瘍、drug delivery system、人工ウイルス

1. 研究開始当初の背景

各種癌に対するウイルス遺伝子治療の有効性が報告されているが(Shi, Radiother Oncol 2003, Kuhlmann, Dig Surg, 2008)、薬剤の内包が不可能、免疫応答といった問題点も多い(Sangro. J Clin Oncol, 2004)。これまでの DDS 開発は、リポソーム・ミセルなどを用いたものが中心でその標的細胞特異性に問題がある。本研究のようにナノカプセルを改変し、ウイルスの細胞内侵入・脱核を模倣した機能を備え、癌選択性の付加、抗癌剤の内包といった多機能型人工ウイルスを用いた DDS の報告は未だない。一方、解析技術の進歩により特定の表面抗原を対象とした数%以下の細胞集団の分離が可能となり、白血病(Nature Med, 2006, Jin; Nature,

2008, Ito)、乳癌(PNAS, 2008, Bloushtain-Qimron; Cell, 2008, Yu)、脳腫瘍(Nature, 2004, Singh)、腫瘍(Cell Stem Cell, 2007, Hermann)といった癌において癌幹細胞研究が進んだ。これらの報告は個別の腫瘍内における癌細胞の多様性を示すもので、細胞レベルの分子生物学的手法に基づく標的細胞の同定とその特定の細胞集団を標的とした治療法の開発の必要性を示すものであるが、現在までこれを実現する診断治療システムは報告されていない。

2. 研究の目的

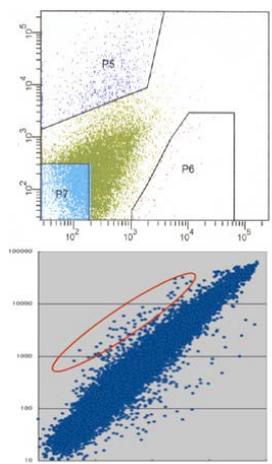
腫瘍など早期診断が困難な癌や進行消化管癌の予後は不良である。最近の解析技術の進歩により、腫瘍内の特定の微小細胞集団が

がん患者の予後を規定することが明らかとなった。今後は細胞レベルの個別性を評価してその中でも特に悪性度が高い細胞集団を標的とした真の癌個別治療の開発が必要である。本研究ではウイルス治療と従来のドラッグデリバリーシステム (DDS) を融合した新規人工ウイルスを診断、治療選択に用いて、細胞レベルの個別診断の画像化とそれに基づく真の癌個別治療を実現することを目的とする。

3. 研究の方法

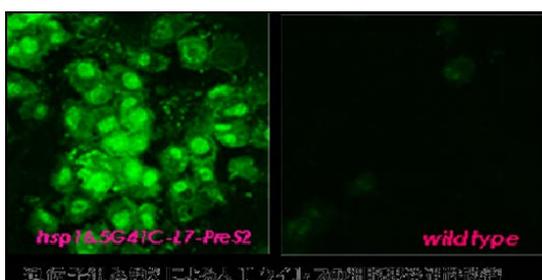
(1) 標的細胞・分子の同定/機能解析

大腸癌に関しては、基盤となる解析は終了しており(右図)、本研究では胃癌、膵癌などの分子標的マーカーとその機能解析を行う。すべての手技、手法は、これまでの若手研究 A にて確立している。



(2) 人工ウイルス 改変 MRI 造影剤の 作成

既に NEDO および厚労科研の支援により人工ウイルスの基盤は確立しており、また改変手法も遺伝子組み換え等、複数の方法を確立している(下図)。これまでの成果に基づき、特定の高悪性度癌細胞集団を選択的に検出する MRI 造影剤を作成し、その機能解析を in vitro レベルで検証する。



(3) アデノウイルス治療が膵癌に及ぼす影響の検討

人工ウイルスを用いる前の予備実験としてアデノウイルスを用いた治療を検討する。具体的には、膵癌に特徴的な豊富な間質に着目し、その癌間質相互作用がアデノウイルス治療にどのような影響を及ぼすか、HGF/MET 経路に着目して検討する。

(4) アデノウイルス治療と抗癌剤耐性の関連についての検討

(3)と同様の予備実験として、アデノウイルス治療が gemcitabine 治療抵抗性とのように関与するかを in vitro で検討する。当研究室では、既に gemcitabine 治療抵抗膵癌細胞株(SUIT-2)を作成している。この治療抵抗株と親株を、green fluorescent protein(GFP)あるいはhepatocyte growth factor antagonist であるNK4 を発現しているアデノウイルスに感染させる。導入効率を確認するために、GFP の発現量およびNK4 の濃度を測定する。また、アデノウイルス治療の効率を検討するために、マトリゲルを用いた invasion assay を行う。

(5) 人工ウイルス改変 DDS の確立

CXCR-4, c-MET などをターゲットにした治療用人工ウイルスを作製し、多様な分子生物マーカーに応じた治療用人工ウイルスの作製を行う。一部は九大工学部との共同研究により進める。人工ウイルスの作成や改変のノウハウはすでにこれまでの研究成果として確立しており、特に問題なく研究を遂行できる。

(6) 人工ウイルス改変 MRI 造影剤の機能評価

9.4T の MRI を用いて、新規に作成した人工ウイルス改変 MRI 造影剤の評価をおこなう。用いるマウスは、初期は細胞株由来の同所マウスモデルを用いる。In vitro, in vivo の機能解析により、分子イメージングの精度と特異性を検証していく。

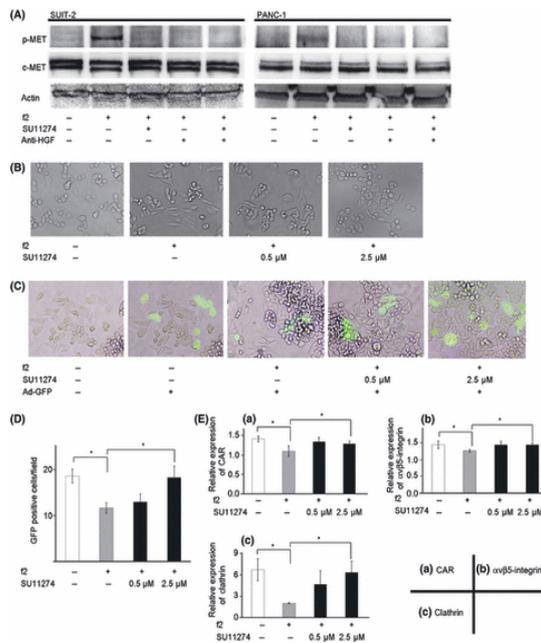
4. 研究成果

(1) 標的細胞・分子の同定/機能解析

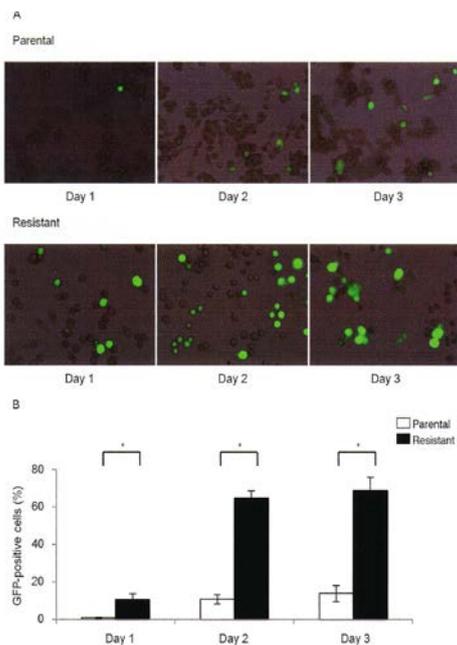
胃癌において p600 遺伝子を抑制すると癌細胞の浸潤能を抑制し、播種において重要な癌の性質である足場非依存性の癌の生存能を抑えることを明らかにし、また膵癌においては新たに claudin4 遺伝子が膵癌の悪性度に関与し、高発現であると予後良好であることが判明した。

(2) アデノウイルス治療が膵癌に及ぼす影響の検討

アデノウイルス治療が膵癌細胞株に対してどのように作用するか検討するため in vitro の実験を行ったところ、HGF/MET 経路を介した癌間質相互作用が膵癌細胞へのウイルス取り込みを抑制する事が分かり、ウイルス治療と並行して間質を制御する必要性が確認された。



(3) アデノウイルス治療と抗癌剤耐性の関連についての検討



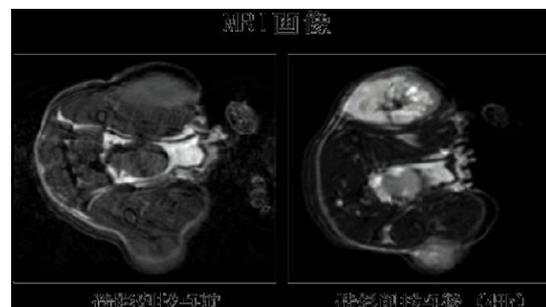
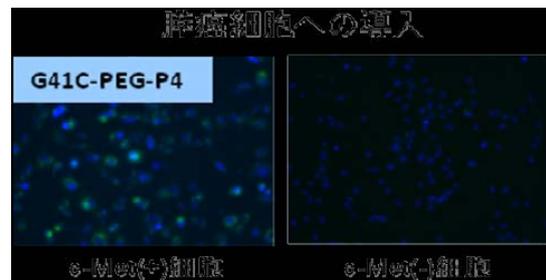
SUIT-2 の膵癌細胞株の親株と、それから作成した gemcitabine 耐性株を Propidium iodide (PI) assay 法を用いて、それぞれ gemcitabine の IC50 値を測定した。親株では、10nM より小さな濃度で 50%に抑制され、gemcitabine 耐性株では 1μM より大きな濃度で 50%に抑制された。多くの gemcitabine 耐性株では GFP を発現していたものの、親株の方ではほとんど発現していなかった (P<0.05)。また、NK4 の発現レベルも同様に、gemcitabine 耐性株の方が親株より有意に増

加していた (P<0.05)。NK4 を発現しているアデノウイルス (Ad-NK4) に感染させた SUIT-2 の gemcitabine 耐性株の上清は、Ad-NK4 に感染させた SUIT-2 の親株の上清よりも、有意に癌細胞の浸潤能を抑制させた。

これらの結果より、アデノウイルスの導入効率および治療効率は gemcitabine 治療抵抗株の方が親株より高く、アデノウイルス治療が gemcitabine 治療抵抗を示す膵癌患者に有効である可能性が示唆された。

(4) 人工ウイルス改変 DDS の確立

膵癌特異的な表面糖タンパクである MUC-1 の抗体を用いた人工ウイルスの作成をすすめ、その特異性の in vitro での確認を行った。また、特定の高度悪性度癌細胞集団を選択的に検出するための標的分子として c-MET, CXCR4 を選択し、これに選択的な MRI 造影剤を作成し、実際に in vivo でマウスに投与した。その結果、標的臓器の分子イメージングの足がかりとなる結果を認めた。



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 4 件)

(1) Yasui T, Ohuchida K, Zhao M, Cui L, Onimaru M, Egami T, Fujita H, Ohtsuka T, Mizumoto M, Matsumoto K, Tanaka M Adenoviral therapy is more effective in gemcitabine-resistant pancreatic cancer than in gemcitabine-sensitive cells. Anticancer Research, 31(4), 2011, 1279-1288

(2) Yasui T, Ohuchida K, Zhao M, Onimaru M, Egami T, Fujita H, Ohtsuka T, Mizumoto K, Tanaka M Tumor-stroma interactions reduce the efficacy of adenoviral therapy through the HGF-MET pathway. Cancer science, 102(2), 2011, 484-491

(3) Tsutsumi K, Sato N, Tanabe R, Mizumoto K, Morimatsu K, Kayashima T, Fujita H, Ohuchida K, Otsuka T, Takahata S, Nakamura M, Tanaka M Claudin-4 Expression Predicts Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Annals of Surgical oncology, 19(3), 2012, 491-499

(4) Sakai H, Ouchida K, Mizumoto K, Cui L, Nakata K, Toma H, Nagai E, Tanaka M Inhibition of p60 expression suppresses both invasiveness and anoikis resistance of gastric cancer. Annals of Surgical oncology, 18(7), 2011, 2057-2065

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) 堤宏介、佐藤典宏、大内田研宙、大塚隆生、高畑俊一、中村雅史、水元一博、田中雅夫 claudin-4 発現は膵癌の予後予測因子として有用である 第 49 回日本癌治療学会学術総会 2011

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 雅夫 (TANAKA MASAO)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：30163570

(2) 研究分担者

江上 拓哉 (EGAMI TAKUYA)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：40507787

高畑 俊一 (TAKAHATA SHUNICHI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：50437779
(2011 年)

鬼丸 学 (ONIMARU MANABU)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：80529876
(2011 年)

(3) 連携研究者
なし