

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249071

研究課題名(和文) 難治性悪性中皮腫へ臨床応用可能な分子メス：「バイオナイフ」の研究開発

研究課題名(英文) Pre-clinical application of an innovative therapy, "BioKnife", to malignant pleural mesothelioma

研究代表者

前原 喜彦 (Maehara, Yoshihiko)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80165662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 28,400,000円

研究成果の概要(和文)：アスベスト関連悪性腫瘍である悪性胸膜中皮腫(MPM)は早期に胸腔内に広く進展し、化学療法に抵抗性であるため、極めて予後不良である。MPMは、細胞外マトリックス分解酵素ウロキナーゼ受容体(uPAR)を発現するが、我々はこのuPA/uPAR依存性に「膜融合」活性を示すことにより、腫瘍を選択的に殺傷する全く新しい製剤(バイオナイフ)を開発した。本研究では、MPMモデルマウスを作成し、臨床での治療効果を高めるための研究を行った。また、確実な臨床効果を得るための分子メカニズムを検討し、MPMの臨床検体を用いた解析を行い臨床応用の実現可能性を検討した。さらに、腹膜播種の分子機構をマウスモデルにて検討した。

研究成果の概要(英文)：Since malignant pleural mesothelioma (MPM) easily spreads throughout the intrathoracic pleural cavity, and mostly shows resistance to the ordinary chemotherapy, it still one of the most aggressive disease among neoplastic diseases. Almost all MPM cells have been shown to express urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR). Recently, we demonstrated the potential of our new and powerful recombinant Sendai virus (rSeV), which shows uPAR-specific cell-to-cell fusion activity (named "BioKnife"). In the present study, we examined the tumor cell-killing mechanism via BioKnife more precisely to obtain the most sufficient effect on treating MPM that is characterized by frequent uPAR expression in a clinical setting.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：悪性胸膜中皮腫 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫はアスベストの吸入から約30-40年の潜伏期間の後に発症すると言われている。2006年にアスベストの使用が全面的に禁止されたものの、その長い潜伏期間を考慮すると、今後中皮腫発症の患者数は増加することが予想されている。

悪性胸膜中皮腫は胸腔を広く覆う胸膜から発生し進行性に胸腔に播種をきたす。その解剖学的特徴から、発見された時には胸腔内をびまん性に進行していることが多い。さらに、悪性中皮腫が「難治性」である理由は、(1)手術、放射線療法が困難、かつ化学療法に対する反応性が不良であること、(2)遠隔転移が局所に留まっている場合においてさえ、腫瘍細胞を全て取り切れず早期の再発を来し死に至ることが多いことが挙げられる。

したがって、治療成績向上のためには、以下の条件を満たす技術を開発する必要がある。

- (1) 正常細胞には影響を与えず、従来の治療法とは異なる全く新しいメカニズムで腫瘍細胞を「選択的」かつ「確実」に殺傷することが可能な技術であること、
- (2) 正常組織との境界部での腫瘍殺傷の精度がミリ単位ではなくマイクロ単位(細胞レベル)での殺傷が可能であること、
- (3) 既存治療(手術、放射線、化学療法)の効果を阻害せず、「相加的」効果、もしくは「相乗的」効果が期待できること、が重要である。

この目的を達成するため、我々は基盤特許群を有する「センダイウイルスの組換え技術」を応用したM遺伝子欠失rSeVをベースに、腫瘍を選択的に殺傷することを目的として、F蛋白活性化のための野生型(トリプシン)開裂部位をマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)認識部位に改変したプロトタイプ作成に7年前に成功した(Kinoh H, et al. Gene Ther 2004)。さらに、その後本技術の改良を進め、より多くの悪性腫瘍が発現するウロキナーゼ(uPA)を標的化することで汎用性を高め、また膜融合に重要なF遺伝子の細胞質内ドメインを遺伝子操作することにより、膜融合活性(=腫瘍殺傷能力)を6倍以上に高めた製剤を開発し(Kinoh H, et al. Gene Ther 2009)、これを「バイオナイフ(BioKnife)」と命名した。

我々はこのバイオナイフの良い適応疾患として悪性胸膜中皮腫を設定し、orthotopicモデル構築を実施すると共に治療効能を示すレジメの最適化研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究では、「バイオナイフ」による画期的分子治療技術を難治性悪性中皮腫へ臨床応用するための前臨床的研究を発展させることを目的とした。まず、悪性胸膜中皮腫モ

デルマウスの作成し、臨床での治療効果を高めるための研究を行った。また、臨床腫瘍におけるバイオナイフの腫瘍殺傷能力を飛躍的に向上させ、確実な臨床効果を得るための分子メカニズムを明らかにすること、さらに、悪性胸膜中皮腫の臨床標本を用いた解析を行い、臨床応用の実現可能性を検討した。

3. 研究の方法

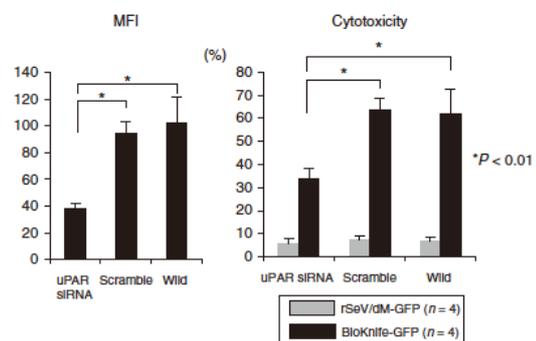
(1) 同所性ヒト中皮腫モデルの治療・評価

対数増殖期にあるヒト中皮腫細胞株(H226: epithelioid type)をbalb/c nu/nuの胸腔内へ投与することにより、悪性胸膜中皮腫のモデルマウスを作成した。マウスモデルに対して、腫瘍形成後、バイオナイフを胸腔内投与し、2日後に胸腔内を蛍光実態顕微鏡で観察した。

(2)悪性胸膜中皮腫の切除例において、バイオナイフの機能促進の標的分子であるウロキナーゼとその関連分子、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子(uPA)、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体(uPAR)、ウロキナーゼ活性化阻害因子(PAI-1)の悪性胸膜中皮腫症例における発現を免疫組織化学染色にて検討し、臨床腫瘍におけるバイオナイフ治療環境の検討を行った。

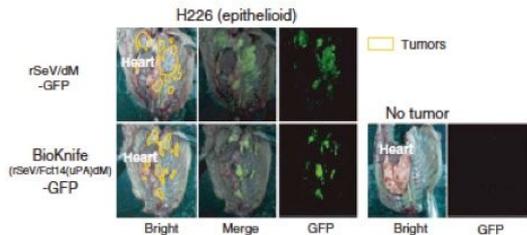
4. 研究成果

(1)臨床試験を前提として、「臨床的に実施可能なバイオナイフ投与方法とそのレジメの確立」を行うために必要な情報を、小動物で得るための実験を行った。まず、細胞株H226を使用した検討にて、コントロールウイルスの感染のみでuPAは転写量・蛋白双方の発現が増強するが、バイオナイフの膜融合により、この作用は増強されることを確認した。この効果はNF-κB阻害剤PDTc、および細胞質内RNAセンサーヘリカーゼRIG-Iのdominant negative inhibitorであるRIG-ICを発現するバイオナイフでは消失することから、RIG-I/NF-κB系に依存していることが証明された。このuPA発現増強作用により、中皮腫ではバイオナイフの効果がさらに高まっていると考えられた(図1)。



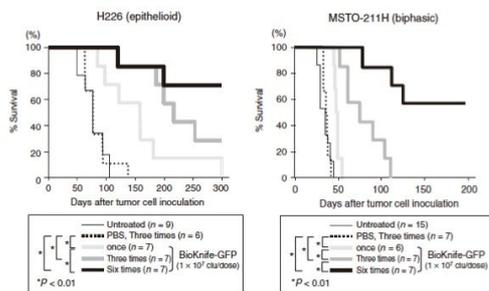
(図1)

ヌードマウス胸腔内にルシフェラーゼ遺伝子を安定的に導入した H226 を注入。播種性腫瘍塊を形成した後、GFP を発現するバイオナイフを胸腔内投与した。以後経時的に発光ライブ・イメージングを実施した。胸腔内の腫瘍塊に一致して、GFP の蛍光が観察された (図 2)。コントロールウイルス投与の場合は次第に発光強度が増加するが、バイオナイフ投与群では、次第に発光強度が減弱した。



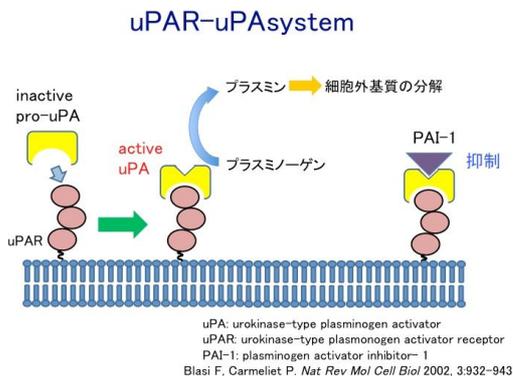
(図 2)

ヌードマウス胸腔内に H226 を注入し播種性腫瘍塊を形成した後、単回、3回、6回 (/ 週) と、GFP を発現するバイオナイフを投与した。投与回数が増えるごとに、有意に生存期間が延長することが明らかになった (図 3)



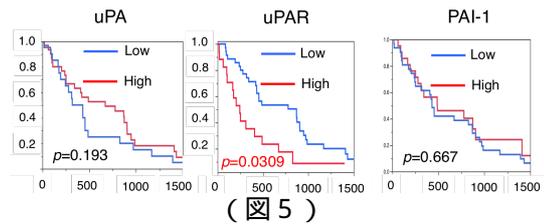
(図 3)

(2) 今回、バイオナイフの機能促進の標的分子であるウロキナーゼとその関連分子、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子 (uPA)、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体 (uPAR)、ウロキナーゼ活性化阻害因子 (PAI-1) の悪性胸膜中皮腫症例における発現を免疫組織化学染色にて検討した (図 4)



(図 4)

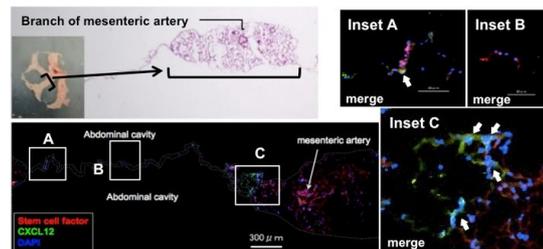
uPAR 高発現群は生存期間の中央値が 318 日、uPAR 低発現群が 906 日であり、uPAR 高発現群は全生存期間が有意に短かった ($p=0.0309$) (図 5)。悪性胸膜中皮腫の腫瘍進展にウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子が関与していると考えられ、臨床においてバイオナイフによる治療効果が期待できる結果であった。



(図 5)

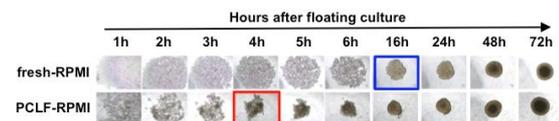
(3) 新しい腹膜播種治療法の開発

マウス腹腔内における免疫系細胞の解析を行っている過程で、偶然低頻度ながら active な造血が行われていることを発見した。そしてその niche 構成細胞について膜結合型 SCF 発現を指標に検索したところ、reticular/ vascular niche を構成する細網状細胞 (CAR: CXCL12- abundant reticular cells、Immunity 2006) が散在性に分布し、その一部に接する細胞クラスターで「異所性造血」が行われていることを突き止めた (図 6)。

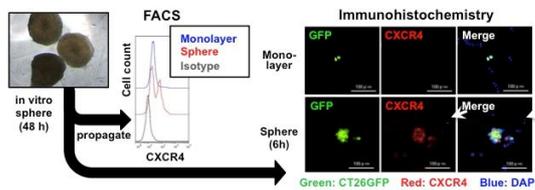


(図 6)

さらに高頻度に腹膜播種を形成するマウス大腸がん細胞株 CT26 は CXCL12 の受容体 CXCR4 を発現しており、腹腔内投与後翌日 (1 日後) には、既に腹膜 CAR 細胞周辺に ~0.5 mm に達する細胞集積による微小結節を形成すること (図 7)、そしてこの腹膜播種は CXCR4 antagonist (AMD3100) ならびに活性中和抗体にて強く阻害されることから、腹膜における reticular niche が播種性悪性腫瘍の足場となり、がん幹細胞として振る舞わせる原因であることが明らかになった (図 8)



(図 7)



(図 8)

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 15 件)

- (1) Morodomi Y, Yano T, Kinoh H, Harada Y, Saito S, Kyuragi R, Yoshida K, Onimaru M, Shoji F, Yoshida T, Ito K, Shikada Y, Maruyama R, Hasegawa M, Maehara Y, Yonemitsu Y: BioKnife, a uPA activity-dependent oncolytic Sendai virus, eliminates pleural spread of malignant mesothelioma via simultaneous stimulation of uPA expression. *Mol Ther.* 査読有, 20 (2012) 769-777.
- (2) Takahashi H, Okamoto M, Shimodaira S, Tsujitani S, Nagaya M, Ishidao T, Kishimoto J, Yonemitsu Y; DC-vaccine study group at the Japan Society of Innovative Cell Therapy (J-SICT). Impact of dendritic cell vaccines pulsed with Wilms' tumour-1 peptide antigen on the survival of patients with advanced non-small cell lung cancers. *Eur J Cancer* 査読有, 49 (2013) 852-859.
- (3) Oki E, Emi Y, Akagi Y, Tokunaga S, Sadanaga N, Tanaka T, Ogata Y, Saeki H, Kakeji Y, Baba H, Nishimaki T, Natsugoe S, Shirouzu K, Maehara Y; Kyushu Study Group of Clinical Cancer. Phase II Trial of Alternating mFOLFOX6 and FOLFIRI Regimens in the First-Line Treatment for Unresectable or Metastatic Colorectal Cancer (KSCC0701). *Oncology* 査読有, 84 (2013) 233-239.
- (4) Yonemitsu Y, Matsumoto T, Itoh H, Okazaki J, Uchiyama M, Yoshida K, Onimaru M, Onohara T, Inoguchi H, Kyuragi R, Shimokawa M, Ban H, Tanaka M, Inoue M, Shu T, Hasegawa M, Nakanishi Y, Maehara Y. DVC1-0101 to treat peripheral arterial disease: a Phase I/IIa open-label dose-escalation clinical trial. *Mol Ther* 査読有, 2 (2013) 707-14. doi: 10.1038/mt.2012.279.
- (5) Saito S, Harada Y, Morodomi Y, Onimaru M, Yoshida K, Kyuragi R, Matsubara H, Yonemitsu Y. Ex vivo generation of highly purified and activated natural killer cells from human peripheral blood. *Hum Gene Ther Methods*, 査読有, 24 (2013) 241-52. doi: 10.1089/hgtb.2012.183.

(6) Morita M, Kawano H, Otsu H, Kimura Y, Saeki H, Ando K, Ida S, Oki E, Ikeda T, Kusumoto T, Fukushima J, Nakashima T, Maehara Y. Surgical resection for esophageal cancer synchronously or metachronously associated with head and neck cancer. *Ann Surg Oncol* 査読有, 20 (2013) 2434-9.

(7) Ikeda T, Kawano H, Hisamatsu Y, Ando K, Saeki H, Oki E, Ohga T, Kakeji Y, Tsujitani S, Kohnoe S, Maehara Y. Progression from laparoscopic-assisted to totally laparoscopic distal gastrectomy: comparison of circular stapler (i-DST) and linear stapler (BBT) for intracorporeal anastomosis. *Surg Endosc* 査読有, 27 (2013) 325-32.

(8) Saeki H, Morita M, Tsuda Y, Hidaka G, Kasagi Y, Kawano H, Otsu H, Ando K, Kimura Y, Oki E, Kusumoto T, Maehara Y: Multimodal treatment strategy for clinical T3 thoracic esophageal cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 査読有, 20 (2013) 4267-73

(9) Saeki H, Morita M, Harada N, Egashira A, Oki E, Uchiyama H, Ohga T, Kakeji Y, Sakaguchi Y, Maehara Y. Esophageal replacement by colon interposition with microvascular surgery for patients with thoracic esophageal cancer: the utility of superdrainage. *Dis Esophagus*, 査読有, 26 (2013) 50-6.

(10) Hiyoshi Y, Morita M, Kawano H, Otsu H, Ando K, Ito S, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Saeki H, Oki E, Ikeda T, Baba H, Maehara Y. Clinical Significance of Surgical Resection for the Recurrence of Esophageal Cancer After Radical Esophagectomy. *Ann Surg Oncol*, 査読有, (2014).

(11) Ikeda T, Kumashiro R, Taketani K, Ando K, Kimura Y, Saeki H, Oki E, Morita M, Akahoshi T, Hashizume M, Maehara Y. Endoscopic evaluation of clinical colorectal anastomotic leakage. *J Surg Res*, 査読有, (2014)

(12) Kasagi Y, Morita M, Otsu H, Kawano H, Ando K, Hiyoshi Y, Ito S, Miyamoto Y, Saeki H, Oki E, Maehara Y. Clinicopathological Characteristics of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in Patients Younger Than 50 years. *Ann Surg Oncol*, 査読有, (2014)

(13) Oki E, Emi Y, Kusumoto T, Sakaguchi Y, Yamamoto M, Sadanaga N, Shimokawa M, Yamanaka T, Saeki H, Morita M, Takahashi I, Hirabayashi N, Sakai K, Orita H, Aishima S, Kakeji Y, Yamaguchi K, Yoshida K, Baba H, Maehara Y: Phase II Study of Docetaxel and S-1 (DS) as Neoadjuvant Chemotherapy for Clinical Stage III Resectable Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol*, 査読有, 21 (2014)

2340-2346

(14) Morodomi Y, Okamoto T, Kohno M, Katsura M, Takada K, Suzuki Y, Fujishita T, Kitahara H, Shimamatsu S, Yoshida T, Tagawa T, Okano S, Maehara Y. Associations between driver gene mutations and cytotoxic chemosensitivity in patients with non-small cell lung cancer. Anticancer Res. 査読有,35 (2015) 1791-6.
(15) Okamoto T, Suzuki Y, Fujishita T, Kitahara H, Shimamatsu S, Kohno M, Morodomi Y, Kawano D, Maehara Y. The prognostic impact of the amount of tobacco smoking in non-small cell lung cancer-differences between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. Lung Cancer 査読有, 85 (2014) 125-30.

〔学会発表〕(計4件)

(1) Yonemitsu Y: "BioKnife, a uPA activity-dependent fusogenic Sendai virus, as a new class of oncolytic bio-device to treat malignancies" BioKnife, a uPA activity-dependent fusogenic Sendai virus, as a new class of oncolytic bio-device to treat malignancies' (招待講演). (2012/10/25-10/29). Versailles, France
(2) Yonemitsu Y: "Perspectives in disease models of the Heart and the Brain: of Mice and Men" SIRIC International Symposium 2012(招待講演). (2012/7/6). Seoul, Korea
(3) 米満吉和: "遺伝子治療ベクターの進歩「センダイウイルスベクター」" 第18回日本遺伝子治療学会年次学術集会. (2012/6/28-2012/6/30). 熊本
(4) 諸富洋介、岡本龍郎、高田和樹、桂正和、鈴木雄三、藤下卓才、北原大和、島松晋一郎、前原喜彦: 悪性胸膜中皮腫における線溶系分子の発現と病理学的因子に関する検討。第55回日本肺癌学会総会。(2014/11/14-16) 京都市

〔図書〕(計3件)

(1) Yonemitsu Y, Inoue M, Ueda Y. Chapter 6: BioKnife, a Modified Sendai Virus, to Resect Malignant Tumors. Ed. by Nagai Y: Sendai Virus Vector. The Basics and Applications. Springer Press pp151-169, 2013.
(2) Yonemitsu Y, Matsumoto T, Maehara Y. Chapter 8: Gene Therapy for Peripheral Arterial Disease Using Sendai Virus Vector: From Preclinical Studies to the Phase I/IIa Clinical Trial. Ed. by Nagai Y: Sendai Virus Vector. The Basics and Applications. Springer Press pp185-199, 2013.
(3) Morodomi Y, Okamoto T, Maehara Y, Yonemitsu Y, et al. Chapter 9, Sendai

virus: Sendai Virus-Based Oncolytic Gene Therapy. Ed. by Wei M and Good D: Novel Gene Therapy Approaches. InTech pp183-194, 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前原 喜彦 (MAEHARA YOSHIHIKO)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号: 80165662

(2) 研究分担者

米満 吉和 (YONEMITSU YOSHIKAZU)
九州大学・薬学研究院・教授
研究者番号: 40315065

池田 哲夫 (TETSUO IKEDA)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号: 60585701

沖 英次 (EIJI OKI)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号: 70380392

佐伯 浩司 (HIROSHI SAEKI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号: 80325448

岡本 龍郎 (TATSURO OKAMOTO)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号: 80568626