

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790315

研究課題名(和文) ヒト膵癌に対する抗癌剤感受性制御腫瘍溶解性組換えワクシニアウイルスの開発

研究課題名(英文) Oncolytic vaccinia virus as an adjuvant treatment to enhancement of chemosensitivity in human pancreatic cancer cells through overexpression of Gemcitabine transporter proteins

研究代表者

橋本 泰司 (Hashimoto, Yasushi)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：50423380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、難治癌の膵癌に対して、抗癌剤の効果増強を目的に human Equilibrative Nucleoside Transporter 1(hENT1) 遺伝子を組み込んだ腫瘍溶解性組換えワクシニアウイルスによる新規遺伝子治療の開発研究を行った。導入遺伝子 hENT 発現の検定では恒常的な発現を確認、正常細胞への細胞毒性は軽微であった。マウスモデルへの腫瘍縮小効果を検証したところ、Vaccine + Gemcitabine 投与群において著明な抗腫瘍効果を認めた。本研究から組換えワクシニアウイルスにより抗癌剤感受性が増強可能で膵臓癌患者に安全で苦痛のない新たな治療の選択肢を提供できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This experimental study aimed to examine the potential of modified vaccinia virus in enhancement of chemosensitivity in human pancreatic cancer cells through overexpression of Gemcitabine transporter proteins to investigate the relevant underlying mechanisms. hENT expression affected tumor cell chemosensitivity to gemcitabine and tumor cell invasive capacity in different pancreatic cancer cell lines. The cytotoxic effects was significantly increased compared with the control non-cancer cell line. In mouse models, virus vaccine induced tumor regression, prolonging median and long-term survival. Higher efficacy of the virus vaccine in the pancreatic cancer suggests the use of the virus as an adjuvant treatment to complete surgical resection. These promising results justify further studies of vaccinia virus in human as a novel treatment for pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 病態医化学

キーワード：膵癌 抗癌剤耐性 ワクシニアウイルス hENT

1. 研究開始当初の背景

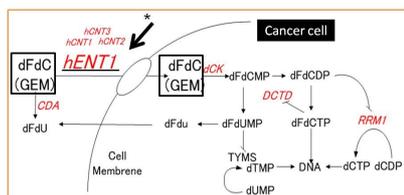
腫瘍溶解性ウイルス (Oncolytic virus) による難治性癌の治療は、世界的に注目されている治療法で、特に Oncolytic provirus は静脈投与などの全身投与でもがん細胞選択的に増殖するように改変でき、人為的に導入された遺伝子を腫瘍で発現させる platform として非常に注目のウイルスである。大部分の膀胱癌では、上皮増殖因子受容体 (EGFR) が過剰発現しているため、EGFR/Ras 経路を認識、複製・導入遺伝子発現、増幅し細胞溶解をもたらす本ウイルスは、膀胱癌に対する効果的な治療アプローチとなる可能性がある。

1.1 難治癌 膀胱癌に対する外科治療の限界と抗癌剤耐性

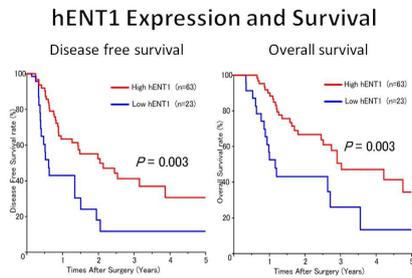
膀胱癌は、ヒト固形癌の中でも最も浸潤・転移傾向が強く、膀胱癌診断時には既に 80% の症例は外科的切除の適応外である。生存期間 (中央値; MST) は切除不能で 4.5 カ月、抗癌剤投与でも 10 カ月程度と難治である。切除可能な 20% の症例について、完全切除できた場合でも MST 14~15 カ月程度と不良で、化学療法を含めた集学的が必須である。Gemcitabine は、進行膀胱癌に対する化学療法の第一選択の抗癌剤として唯一コンセンサスが得られ、2001 年 4 月より膀胱癌に対する保険適応が承認された。我々は、2002 年、Gemcitabine 併用術後補助化学療法を開始、Gemcitabine 登場以降、化学療法の恩恵を受ける膀胱癌患者は明らかに増加しているが、抗癌剤耐性を示す症例が多く、現在の成績は満足できるものではない。

Gemcitabine は ara-C に類似したデオキシシチジンの誘導体であり、細胞内でリン酸化された後、デオキシシチジンのリン酸化と競合して DNA に取り込まれ細胞死を引き起こす (右図)。我々の検討で、Gemcitabine の主要な細胞内 transporter である human Equilibrative Nucleoside Transporter (hENT) gene の発現は膀胱道癌の抗癌剤耐性に深く関与していることが明らかとなった (J Surg Oncol 2011, Ann Surg 2011 in press)。hENT 低発現群は gemcitabine 高度耐性で予後不良であり、その発現解析は Gemcitabine 併用化学療法の効果予測の重要な指標である。

Metabolism of Gemcitabine

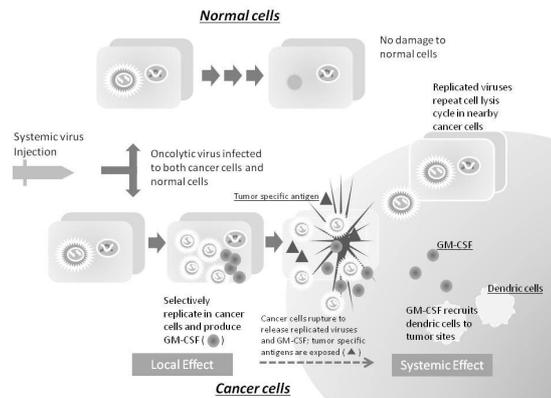


*hENT1(→) is the major transporter responsible for gemcitabine uptake into cancer cells.



1.2 腫瘍溶解性ウイルス (Oncolytic virus) による切除不能な難治性癌の治療

近年、ウイルスベクターによる遺伝子治療として、腫瘍溶解性ウイルスベクターを利用した研究が注目されている (Nature 447:99-104;2011)。これは、ウイルス増殖に必要なタンパク質をコードした遺伝子の一部を自然欠損した変異株が、正常細胞では増殖しにくくがん細胞内で特異的に増殖可能な制限増殖型ウイルスで、腫瘍細胞を死滅させる新規治療として有望である。また、興味深い点として、Oncolytic virus が癌特異的に作用する性質を利用し、ある治療効果のある遺伝子を癌細胞内のみで発現させるということが可能ということである。この基盤技術は、ヒトの固形がんにおいて複数個の治療効果のある分子やイメージング用の分子を高濃度で腫瘍細胞特異的に発現させる (レポーター遺伝子の導入・発現) ことができる多機能医薬品開発の可能性を秘めている。

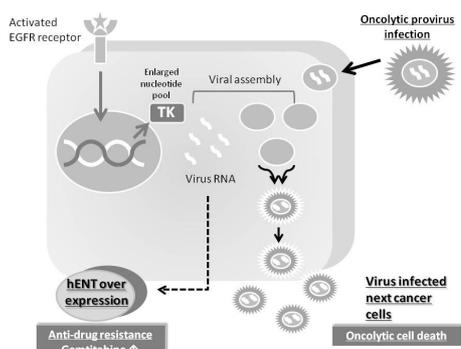


1.3 腫瘍溶解性ウイルスベクターの現状と展望

がんの治療薬としてヒト単純ヘルペスウイルス (HSV)、レオウイルス、ワクシニアウイルス (poxvirus) を含む様々な腫瘍溶解性ウイルスを利用したプラットフォームの有効性を評価する臨床試験が現在進行している。がん治療に用いられるペプチドや siRNA などの生体分子を、静脈内投与後、腫瘍組織において選択的に増幅し高濃度に達するようにできれば、有効性や安全性を飛躍的に高めることができる。我々はプロモーターの多因子制御および癌治療遺伝子導入による膀胱癌

を標的とした多因子制御プロモータータイプの制限増殖型腫瘍溶解性ウイルスベクターOncolytic HSV (HPC-HSV1)の開発を行ってきた。パイロット実験として膵癌標的プロモーターによる HSV コンストラクト(HSV-HPC)をいくつか作製した。しかし、元来神経節で潜伏感染状態にある HSV1 は人体に安全である代わりに、ベクターを腫瘍細胞に接種しても免疫誘導能が低い傾向にあり、さらに、ウイルス増殖の初期に発現する遺伝子をプロモーターで制御することでは、野生型と比較して腫瘍細胞中でも増殖力を欠くという問題が改めて浮き彫りとなり臨床応用へむけた組換えウイルス開発の課題となった。

HSV に対して、ワクシニアウイルス(poxvirus)は、血液を介して全身に広がるように進化したウイルスで静脈投与などの全身投与の方法でがん細胞で選択的に増殖し腫瘍溶解をもたらすよう改変できる点で優れている。Poxvirus はベクターとして以下のようなメリットを持つ。静脈内で安定、遠位の組織に拡散可能、血中での抗体補体中和反応に抵抗性、運動性に富み、組織内で迅速に拡散し複製が速い、上皮癌で活性化されている EGFR/Ras シグナル伝達経路を利用している。膵癌は、診断時には 80%が切除不能で全身病の様相を呈すること、そのほとんどが EGFR/Ras 系が高発現している点を考慮すると、全身投与でがん細胞選択的に増殖・殺腫瘍効果を示し、また人為的に導入遺伝子を腫瘍特異的に発現させるための輸送媒体(platform)として非常に優れている。



2. 研究の目的

本研究は、難治癌の膵癌に対して、抗癌剤の効果増強を目的に human Equilibrative Nucleoside Transporter 1(hENT1)遺伝子を組み込んだ腫瘍溶解性組換えワクシニアウイルス (Oncolytic poxvirus) による新規遺伝子治療の開発研究である。

3. 研究の方法

3.1 膵癌標的抗癌剤感受性制御腫瘍溶解性組換え Oncolytic poxvirus(poxvirus-hENT コンストラクト)の構築

Cre/LoxP、FLP/FRT テクノロジーをベースとした Flip-Flop BAC システムで組換えウイ

ルス作製を行う。得られたクローンを HindIII フィンガープリントと DNA シーケンスでチェックしたのち、Vero-E5-FLP 細胞にトランスフェクションして組換えウイルス poxvirus-hENT コンストラクトを産生、組換えウイルス増殖の効率化を図る。

3.2 プラークアッセイによる組換えウイルス力の評価とベクターによる導入遺伝子 hENT の発現解析

3.3 膵癌細胞株における組換えウイルスの増殖と腫瘍細胞に対する細胞毒性を invitro で定量的、定性的に解析する。

3.4 in vivo 治療モデルでの組換えウイルス殺腫瘍効果の評価 (in vitro imaging) と Gemcitabine に対する抗癌剤感受性増強の検定

4. 研究成果

膵癌標的抗癌剤感受性制御腫瘍溶解性組換え Oncolytic poxvirus(poxvirus-hENT コンストラクト)構築のため、Flip-Flop BAC システムで組換えウイルス作製を作成、得られたクローンの増殖効率を確認。

プラークアッセイによる、組換えウイルスの力価が十分にはること確認した。

導入遺伝子 hENT 発現の検定を行い、ワクチンの作用による恒常的な発現を確認した。組換えウイルスは、正常膵細胞株への感染実験では、正常細胞への細胞毒性を認めなかった。

GFP 強制発現させた膵臓癌細胞株を利用し腫瘍動物モデルを作成。in vivo イメージング下に腫瘍生着状態を観察。本ウイルスの抗腫瘍効果を観察。Gemcitabine 併用投与時、腫瘍内に直接インジェクションすると、腫瘍量の経時的な減少を認め、腫瘍縮小効果を確認した。

ウイルス治療中 (Gem+/Gem-) の腫瘍マウスモデルにおいて、hENT タンパクの発現解析を行った。hENT タンパク発現陽性、RRM1 タンパク発現陽性例で最もウイルスの抗腫瘍効果が高かった。腫瘍内でのウイルス拡散動態は、インジェクション部位に限定的で、均一な広がりではなくこの点は今後の検討課題であると考えられる。

ワクシニアウイルスは、人為的に導入された遺伝子を腫瘍で発現させる platform として非常に有用なウイルスとされ、静脈投与での抗腫瘍効果を検定したが、想定されるほどの抗腫瘍効果はなく、静脈投与では、ウイルス治療中 (Gem+/Gem-) いずれにおいても腫瘍量は減少しなかった。

大部分の膵癌では、EGFR が強発現している
ので、EGFR/Ras 経路を認識、複製・導入遺伝
子発現、増幅し細胞溶解をもたらす本ウイル
スは、膵癌に対し特異的な治療アプローチと
なる。全身投与での抗腫瘍効果を高めるため、
今後 poxvirus-hENT コンストラクトの改築を
行う予定である。

本研究を踏まえ 今後の展望

腫瘍溶解性ウイルス (Oncolytic virus)
による難治性癌の治療は、世界的に注目され
ている治療法で、特に Oncolytic provirus
は静脈投与などの全身投与でもがん細胞選
択的に増殖するように改変でき、人為的に導
入された遺伝子を腫瘍で発現させる
platform として非常に注目のウイルスであ
る。大部分の膵癌では、上皮増殖因子受容体
(EGFR) が過剰発現しているため、EGFR/Ras
経路を認識、複製・導入遺伝子発現、増幅し
細胞溶解をもたらす本ウイルスは、膵癌に対
する効果的な治療アプローチとなる可能性
がある。さらに、Gemcitabine transporter
protein である hENT 遺伝子の増幅により抗
癌剤感受性を増強する点は独創的であり、前
例がない。本研究では、Gemcitabine の
transporter protein である hENT protein の
増幅操作により、抗癌剤感受性が安全に増
強できる可能性が示され、本研究の成果が
膵臓癌患者に安全で苦痛のない新たな治療
の選択肢を提供できるものとする。本研究の
延長には、切除不能膵臓癌患者に、安全で、
苦痛のない新たな治療の選択肢を提供でき
るものとする。

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 1 件)

査読有

1. Nakagawa N, Murakami Y, Uemura K, Sudo
T, Hashimoto Y, Kondo N, Sueda T.
Combined analysis of intratumoral human
equilibrative nucleoside transporter 1
(hENT1) and ribonucleotide reductase
regulatory subunit M1 (RRM1) expression is
a powerful predictor of survival in
patients with pancreatic carcinoma
treated with adjuvant gemcitabine-based
chemotherapy after operative resection.
Surgery. 2013 Apr;153(4):565-75. doi:
10.1016/j.surg.2012.10.010. Epub 2012 Dec
17.

[学会発表](計 2 件)

1. Hashimoto Y, Murakami Y, Uemura K, Sudo
T, Kondo N, Sueda T.
Impact of margin clearance on survival

after pancreaticoduodenectomy for
pancreatic ductal adenocarcinoma; What is
a "true" negative margin?
Digestive Disease Week 2013, May 18-21,
2013, Florida, USA

2. Hashimoto Y, Murakami Y, Uemura K, Sudo
T, Kondo N, Sueda T.

Pancreaticogastrostomy after distal
pancreatectomy: a clue to preventing
postoperative pancreatic fistula
11th World Congress of the International
Hepato-Pancreato-Biliary Association
March 22-27, 2014, Seoul, Korea

[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

橋本 泰司 (HASHIMOTO YASUSHI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号: 50423380

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: