

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293234

研究課題名(和文) 正常と癌の幹細胞の分子機構解明による小児癌への革新的m-CRA治療薬の開発

研究課題名(英文) Molecular elucidation of normal and cancer stem cells towards development of innovative m-CRA therapy for pediatric cancer

研究代表者

小賤 健一郎 (Ken-ichiro, Kosai)

鹿児島大学・医学部・教授

研究者番号：90258418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：革新的癌治療の腫瘍溶解性ウイルスで、研究代表者は従来技術を凌ぐm-CRA医薬を開発してきた。本研究では小児癌へのm-CRAの臨床応用に繋がる、幹細胞での研究成果を得た。癌で高活性のサバイピンプロモーターは、多能性幹細胞でも未分化状態では高活性だが、分化により活性が激減し、サバイピン反応性m-CRA (Surv.m-CRA) は分化した正常細胞には低傷害であった。局所投与でSurv.m-CRAが正常幹細胞を傷害する可能性は低く、小児にもSurv.m-CRAは安全性が高いということがわかり、進行中のSurv.m-CRAの医師主導試験での小児への適応拡大にも貢献した。

研究成果の概要(英文)：We have developed m-CRA-based technology and medicine that is superior to current oncolytic viruses. This study using stem cells produced the meaningful results, leading to clinical application of m-CRA for pediatric cancer. Survivin promoter was strongly activated in the undifferentiated pluripotent stem cells (PSCs) as well as cancer cells, but its activity was decreased in the differentiated PSCs, to which survivin-responsive m-CRA (Surv.m-CRA) exerted less cytotoxicity. A local injection of Surv.m-CRA may not damage normal stem cells, and Surv.m-CRA therapy should be safe for pediatric patients with cancer. These results contributed to the expansion of clinical application of Surv.m-CRA therapy to pediatric patients.

研究分野：遺伝子治療・再生医学

キーワード：小児腫瘍学 腫瘍溶解性ウイルス 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

癌遺伝子治療では、癌特異的増殖型アデノウイルス (CRA) の開発が期待されており、研究代表者は「多因子で精密に目的細胞 (癌) を特異化、治療できる」m-CRA という次世代ベクターの開発に成功した。特に研究代表者が開発した Survivin 反応性 m-CRA (Surv.m-CRA) は、ほぼ全癌種で高発現している Survivin 遺伝子をプロモーターに用いており、癌細胞特異的にウイルス増殖とウイルス蛋白による癌細胞死が誘導される。

一方、小児の癌は成人の癌と比べ生物学的特性も異なり難治であり、小児癌を主標的とした革新的治療法の開発研究はほとんどなされていない。治療効果が高く、成人癌よりも高い安全性 (癌特異性) が要求される「小児癌への革新的治療薬」を開発するには、正常と癌の幹細胞の分子機構の違いを明らかにして癌特異性を完全に近づけること、そしてその高いハードルは全く新たな治療技術で行うことが有用である。しかし研究開始当初、そのような発想での詳細な研究の報告はなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでの申請者達の「多能性幹細胞での再生医学」と「癌幹細胞」の研究成果を基盤として、将来の臨床応用を目指して「小児の癌への m-CRA 治療技術を開発」することである。

特に期間中に、以下の3つに主に取り組むことを目的とした。

- (1) 小児の正常と癌の幹細胞の違いの生物学的メカニズムを解明する。
- (2) 小児の癌幹細胞を標的治療する候補 m-CRA を開発する。
- (3) 小児癌の動物モデルで、この候補 m-CRA の治療の薬としての有用性を検証する。

3. 研究の方法

- (1) 小児の正常と癌の幹細胞の違いの生物学的メカニズムを解明する。

小児に好発する癌の幹細胞分画を分離濃縮し、他の癌細胞分画や正常細胞などとの発現パターンの違いを調べ、小児癌幹細胞を同定できる候補分子を探索する。

- (2) 小児の癌幹細胞を標的治療する候補 m-CRA を開発する。

小児癌幹細胞を同定する候補分子のプロモーターの癌幹細胞、癌の他の分画、正常細胞での活性や特異性を調べ、最適なプロモーターを決定する。

その最適なプロモーターの制御により、アデノウイルスの増殖が誘導される、m-CRA を作製、調整する。

小児癌の幹細胞、他の分画の癌細胞、正

常な幹細胞、あるいは正常な分化細胞における、この m-CRA のウイルス増殖、その結果としての細胞傷害性を調べ、その効果と特異性を明らかにする。

さらに小児への安全性という点から、この m-CRA を正常の幹細胞と分化した細胞へ作用させ、その殺傷効果と特異性を調べる。

- (3) 小児癌の動物モデルで、この候補 m-CRA の治療の薬としての有用性を検証する。

癌幹細胞株を免疫不全マウスに移植し、in vivo 癌モデルを作製する。これに候補の m-CRA を腫瘍内注入し、癌幹細胞ならびに癌の治療効果を検証する。

m-CRA はヒトアデノウイルスをベースにしているため、ヒト以外ではハムスターでウイルス増殖が可能である。よってハムスター癌細胞株をハムスターに移植して、免疫を保持する Syngenic model を作製できれば同様の治療実験を行う。

4. 研究成果

- (1) 前項記載の方法で、小児で好発する横紋筋肉腫の癌 (肉腫) 幹細胞モデルで検討した結果、Survivin promoter は全ての癌において高活性で、癌幹細胞ではさらに活性が上昇する一方、正常細胞では未分化状態ではある程度の活性がみられるが、分化細胞ではほとんど活性はみられないことがわかった。

これによって研究者が別プロジェクトで臨床化に向けて研究開発を進めていた Surv.m-CRA が、小児で好発する癌 (肉腫) にも有効である可能性が出た。よってまず in vitro で、横紋筋肉腫の癌幹細胞株を用い、未分化 (幹細胞状態) と分化した状態で調べたところ、Surv.m-CRA は全分画の癌を殺傷し、さらに癌幹細胞分画には、より有効な殺傷効果を示すことがわかった。

つぎにこの癌幹細胞分画を濃縮して免疫不全マウスに移植し、in vivo 癌モデルを作製して、Surv.m-CRA の治療実験を行った。Surv.m-CRA の腫瘍内投与により、著明な治療効果がみられた。

- (2) 小児への治療の安全性という観点から、正常の幹細胞と分化細胞のモデルとして、ヒト多能性幹細胞 (ES 細胞、iPS 細胞) の未分化状態と分化状態で検証した。つまり、特異化分子 (Survivin ならびに、もう一つの候補のテロメラゼの主要構成要素の Tert) の内因性、遺伝子、プロモーター活性を調べたところ、両遺伝子とも未分化状態特異性が高く、特に Survivin promoter は正常の多能性幹細胞

胞でも未分化状態では高活性であることを見出した。次に Survivin promoter と Tert promoter で増殖制御される Surv.m-CRA と Tert.m-CRA での殺傷効果を調べたところ、両方とも多能生幹細胞の未分化状態には高度な殺傷効果を示すが、分化とともに殺傷効果はなくなった。このため in vivo で精巣にも Surv.m-CRA が導入される多量の投与という条件でも検証したが、Surv.m-CRA は傷害を示さなかった。よって多能性幹細胞の完全な未分化状態というのは特殊であり、小児を含む一般の正常細胞はある程度分化しているため、さらに生体内の構造から通常の治療では組織幹細胞に到達しないことも考えると、実際には Surv.m-CRA の治療は小児癌に対しても、安全性は高いということがわかった。

- (3) 別プロジェクトではあるが、平成 28 年度に、Surv.m-CRA の First in human の医師主導治験をヒト骨軟部腫瘍患者へ開始した。途中経過ではあるが、安全性は高く、治療効果も見られつつある。10 歳以上の症例（小児例）も対象とした臨床プロトコルの変更を正式に行い、小児へも治験を行うことができるようにした。このように治験の別プロジェクトと、基礎的な本研究は、その研究内容は異なりながらも、一体とした相乗的な成果が得られたものである。このように本課題の基礎研究の成果を、小児癌まで臨床応用（それも実用化にも繋がる治験）にまでもっていくことができたということに科学的な面で本研究も貢献したことは、大きな成果である。

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）

* は研究代表者が corresponding author

〔雑誌論文〕（計 8 件）

1. Mitsui K, Ide K, Takahashi T, Kosai K.; Viral Vector-Based Innovative Approaches to Directly Abolishing Tumorigenic Pluripotent Stem Cells for Safer Regenerative Medicine. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 5: 51-58, 2017、査読有
2. Miyazaki Y, Matsubara S, Qiang Ding, Tsukasa K, Yoshimitsu M, Kosai K, Takao S.: Efficient elimination of pancreatic cancer stem cells by Hedgehog/GLI inhibitor GANT61 in combination with mTOR inhibition. *Molecular Cancer.* 2016、査読有
3. Sakamoto K, Khai NC, Wang Y, Irie R, Takamatsu H, Matsufuji H, Kosai K.: Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor and Hepatocyte Growth Factor Inhibit Cholestatic Liver Injury in Mice via Different Actions. *Int J Mol Med.* 2016、査読有
4. Goto K, Takemura G, Takahashi T, Okada H, Kanamori H, Kawamura I, Watanabe T, Morishita K, Tsujimoto A, Miyazaki N, Ushikoshi H, Kawasaki M, Mikami A, Kosai K, Minatoguchi S. Intravenous administration of endothelial colony-forming cells overexpressing integrin b1 augments angiogenesis in ischemic legs. *Stem Cells Transl Med.* 5(2):218-26.doi:10.5966/sctm.2015-0096.2016 (cover) 査読有
- * 5. Mitsui K, Ide K, Takayama A, Wada T, Irie R, Kosai K.: Conditionally replicating adenovirus prevents pluripotent stem cell-derived teratoma by specifically eliminating undifferentiated cells. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2, 15026; doi:10.1038/mtm.2015.26, 2015 (Featured article & Editorial) 査読有
6. Hara M, Takahashi T, Mitsumasu C, Igata S, Takano M, Minami T, Yasukawa H, Okayama S, Nakamura K, Okabe Y, Tanaka E, Takemura G, Kosai K, Yamashita Y, Matsuishi T.: Disturbance of cardiac gene expression and cardiomyocyte structure predisposes *Mecp2*-null mice to arrhythmias. *Sci Rep.* 5:11204. doi: 10.1038/srep11204., 2015、査読有
- * 7. 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.* 33(5): 1064-1074, 2014、査読有
- * 8. 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.* 12:27.doi: 10.1186 /

1479-5876-12-27, 2014(JSGT Meeting Award) 査読有

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計6件)

1. 伊地知 暢広、小賤 健一郎：
独自開発の多因子増殖制御型アデノウイルス(m-CRA)技術による遺伝子・ウイルス治療薬の臨床開発と実用化の展望：次世代癌治療最前線、エヌ・ティー・エス、2017 (in press)
2. 三井 薫、小賤健一郎：
iPS細胞作製・培養時における細胞のがん化メカニズムと検出・評価(8節 ウイルスを用いたがん化細胞(腫瘍化原因細胞)の除去技術の開発)「**iPS細胞の最新技術開発**」(技術情報協会編)2016.
3. 三井 薫、小賤健一郎：
「iPS細胞培養からがん化の恐れのある細胞を死滅させる方法」PHARMSTAGE. 15(12),10-15,2016.
4. 三井 薫、小賤健一郎：
「多能性幹細胞の腫瘍化原因細胞をがん特異的制限増殖型アデノウイルスにより特異的に除去する新技術」BIOINDUSTRY. 33(2),11-18,2016
5. 小賤健一郎：
「多因子増殖制御型アデノウイルスの開発と実用化の展望：独自開発の技術を本邦発の革新医薬へ」**実験医学**. 34(1), 19-25, 2016
6. 永野 聡、小賤健一郎、小宮節郎：
「増殖制御型アデノウイルスの独自開発から医師主導治験へ-革新的がん治療薬を目指して-」**関節外科 基礎と臨床**. メジカルビュー社. 34: 10-16, 2015.

〔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7件)

1. 名称：癌幹細胞を標的とするウイルスベクター
発明者：小賤健一郎、王宇清
権利者：鹿児島大学
種類：医薬(物質)
番号：第5975352号
取得年月日：2016年7月29日
国内外の別：国内

2. 名称：Aurora キナーゼプロモーターを含む増殖制御型ウイルスベクター

発明者：小賤 健一郎
権利者：鹿児島大学
種類：医薬(物質)
番号：第5963363号
取得年月日：2016年7月8日
国内外の別：国内

3. 名称：幹細胞における腫瘍化原因細胞の除去方法

発明者：小賤健一郎、三井薫
権利者：鹿児島大学
種類：バイオ技術(用途)
番号：第6037393号
取得年月日2016年11月11日
国内外の別：国内

4. 名称：血管新生抑制剤

発明者：小賤健一郎、坂本泰二、上笹貴太郎
権利者：鹿児島大学
種類：医薬(物質)
番号：第5594695号
取得年月日：2014年8月15日
国内外の別：国内

5. 名称：ヘパリン結合性上皮増殖因子様増殖因子の新規医薬用途

発明者：小賤健一郎、ニン・チン・カイ、高橋知之
権利者：鹿児島大学
種類：医薬(物質)
番号：EP 1949907
取得年月日：2014年7月2日
国内外の別：国外

6. 名称：サービピン(Survivin)プロモーターを含む増殖型ベクターを有効成分とする癌治療薬

発明者：小賤健一郎、神園純一、永野聡
権利者：小賤健一郎
種類：医薬(物質)
番号：第5574284号
取得年月日：2014年7月11日
国内外の別：国内

7. 名称：Drug Comprising As The Active Ingredient Proliferative Vector Containing Survivin Promoter

発明者：小賤健一郎、神園純一、永野聡
権利者：小賤健一郎
種類：医薬(物質)
番号：US 8,709,812
取得年月日：2014年4月29日
国内外の別：国外

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小賤 健一郎 (KOSAI, Kenichiro)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号：90301663

(2) 研究分担者

三井 薫 (MITSUI, Kaoru)
鹿児島大学・医歯学域医学系・講師
研究者番号：40324975

伊地知 暢広 (IJICHI, Nobuhiro)
鹿児島大学・医歯学域医学系・助教
研究者番号：80380624

入江理恵 (IRIE, Rie)
鹿児島大学・医歯学域医学系・助教
研究者番号：90381178

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし ()