

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462000

研究課題名(和文) 遺伝子医薬と分子標的薬剤による p53 経路活性化に基づく消化器癌に対する治療法開発

研究課題名(英文) A novel cancer therapeutics with gene medicine and molecular targeted agents directing the p53 pathways in esophageal carcinoma

研究代表者

田川 雅敏 (Tagawa, Masatoshi)

千葉県がんセンター(研究所)・がん治療開発グループ・部長

研究者番号：20171572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000 円

研究成果の概要(和文)：食道がんは日本人での頻度が高く、進行症例や化学療法無効症例では緩和ケア等に移行することになり、多くの場合予後不良である。東アジア人の当該患者における全ゲノム配列決定の結果によると、p53遺伝子とその下流の異常が約半数以上の症例で見られ、これは同経路の正常化が主たる治療目標であることを示唆している。そこで本研究では、従来の治療法とは全く異なり、組換え型で増殖性アデノウイルスによる遺伝子医薬、およびp53経路の活性化に関与する分子標的薬の有用性について検討し、p53経路の活性化が同遺伝子医薬の殺細胞効果を増強することを見出した。しかし、当該分子標的薬で有用性を示したものはなかった。

研究成果の概要(英文)：Esophageal carcinoma remains intractable despite therapeutic multi-modality when it develops into an advanced case or became chemotherapy-resistant. A next-generation sequencing technique revealed that a majority of the patients in East Asia had aberration of p53 gene and the down-stream pathways, which consequently indicated that the p53 pathways was the major therapeutic target. We then investigated a novel therapeutic approach to augment the p53 pathways with gene medicine and a molecular targeted agent. Recombinant replicative adenoviruses (Ad) induced up-regulated p53 expression and produced cytotoxic effects on esophageal carcinoma cells. Transduction of the cells with the wild-type p53 gene increased the cytotoxicity but the replicative Ad numbers decreased. In contrast, molecular targeted agents which stabilize the wild-type p53 in the terms of ubiquitination or functionally convert mutated p53 into the wild-type were not effectively cytotoxic to esophageal carcinoma.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：食道がん p53経路 細胞障害活性 アデノウイルス 遺伝子医薬 分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

進行食道がんや化学療法耐性となった食道がんは予後不良であり、その治療法の進展は予後の改善にとって重要である。従来からの研究から食道がんは p53 遺伝子型によらず、p53 分子の強制発現に対して感受性を有していることが判明している。そこで同経路を標的として、(1) 従来からの抗がん剤とは作用機序が全く異なる遺伝子組換えアデノウイルスを用いて、p53 経路を活性化する遺伝子医薬の有用性、(2) p53 蛋白分解過程を阻害する、あるいは同経路を増強する分子標的薬剤を用いて、それ殺細胞効果を検討する。また、(3) 遺伝子医薬と分子標的薬剤の併用効果における細胞死の機序を検討し、p53 経路あるいは非 p53 経路に影響を与えるシグナル経路を解析し、in vivo 実験を通じて当該治療戦略の有用性を解析する。

2. 研究の目的

(1) 細胞融解性を有するウイルスのなかで、野生型のアデノウイルス (Ad) は強力な融解能を保持している。そこで、このウイルスの増殖に必須で、ウイルスや宿主細胞の遺伝子発現を制御する E1 領域遺伝子を、腫瘍で特異的に発現させれば、腫瘍に特異性を有した細胞融解を引き起こすことが可能である。この理論的基盤に基づいて、制限増殖型のアデノウイルスが作成されその抗腫瘍効果が検討されてきている。本研究では消化器がんを高頻度に発現上昇が見られる遺伝子ミッドカイン (MK) およびのサバイピン (Sur) の転写調節領域を用いて、E1 領域遺伝子の発現を制御させたウイルス (Ad-MK, Ad-Sur) を作成し、その抗腫瘍効果を検討する。

(2) p53 分子は主にユビキチン化 ubiquitination によって分解されることは知られている。また、そのユビキチン化には MDM2 分子と MDM4 分子とが深く関与している。MDM2 は p53 分子と結合して、p53 分子のユビキチン化を引き起こし、MDM2 分子と構造が類似している MDM4 分子は、MDM2 分子と結合して同分子のユビキチン化に関与している。そこで、MDM2-p53 分子の結合阻害薬、あるいは MDM4 分子の阻害薬を使用すれば、p53 の分解を阻止でき細胞内の p53 分子が安定化によって p53 経路の活性化が期待できる。そこで MDM2-p53 分子の結合阻害薬である nutlin-3a、MDM4 分子の阻害薬である heat shock protein (HSP)

90 阻害剤 (17-AAG ; 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin, 17-DMAG;

17-(Dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin) の抗腫瘍効果について解析する。一方高 Ca 血症の治療薬で第三世代のビスフォスフォネート製剤であるゾレドロン酸 (ZOL ; zoledronate) は、ヒトの腫瘍に直接作用しアポトーシスを誘導する。このとき、

低分子 G 蛋白質のプレニル化阻害によって当該分子機能を阻害する ZOL が、p53 蛋白の発現をも上昇させて細胞傷害活性を誘導する。したがって、ZOL も食道がんに対して検討すべき薬剤である。

(3) 上記アデノウイルスによる細胞傷害活性に、p53 発現を上昇させる薬剤を併用することによって、どのような効果が生じるかを検討する。アデノウイルスの感染による E1A 発現とウイルス増殖に伴う DNA 傷害のセンサー機構は、内因性の p53 分子の発現を上昇させる一方で、p53 経路の活性化は細胞死を誘導する。したがって、アデノウイルス増殖の際に p53 経路の活性化は抗腫瘍効果にどのような影響を与えるかは正確には不明といわざるを得ない。

3. 研究の方法

(1) 制限増殖型でファイバー変換型アデノウイルスの作成 :

食道がんが高い転写活性の有するミッドカインおよびサバイピン遺伝子の転写調節領域 (5'上流側 604、521bp のゲノム DNA) を pShuttle2-PL/E1A-E1B ベクターの E1 領域遺伝子部位に組み込んだ。さらに上記の DNA を制限酵素で切断後、外来性の転写調節領域 + E1 領域を有する DNA 断片を単離し、タイプ 5 型あるいはファイバー構造領域のみを 5 型から 35 型に置換したシャトルベクターと結合させた (Ad-MK, Ad-Sur)。これにより、E3 領域一部を除いて、ウイルス産生に必要な全てのアデノウイルスの構造遺伝子を、単一のプラスミド DNA にクローニングできた。この DNA をパッケージング細胞 HEK293 細胞に導入し、細胞融解を繰り返し、当該アデノウイルスを精製した。このファイバー構造領域の置換は、ウイルスの標的細胞への感染効率を向上させるためである。従来タイプ 5 型ウイルスの感染効率は、ウイルスの外殻蛋白の一種であるファイバー構造と細胞側の受容体である CAR 分子との結合に主に依存している。しかし、多くの消化器がんにおいては、この CAR 発現がしばしば低下しており、そのため腫瘍へのウイルス感染力が低下している。そこで、CAR 非依存性の感染を示すアデノウイルス 35 型のファイバー構造を 5 型のものと同置換したウイルスを作成した。35 型ウイルスの細胞受容体は、CD46 分子であり、しかも CD46 分子の腫瘍における発現は、むしろ亢進している。すなわち、受容体との結合領域の遺伝子をタイプ 5 型から 35 型へ置換することにより、腫瘍への感染効率の向上を図ることができる。

(2) 抗腫瘍効果の検討 :

アデノウイルスを、一定のウイルス量でヒト食道がん細胞に感染させ、その後の細胞生存率に関して WST 法を用いて検討した。分子標的薬についても、同様に WST 法によって

その抗腫瘍効果を検討した。また、制限増殖型アデノウイルスと p53 分子を発現するアデノウイルス (Ad-p53) を同一の細胞に感染させるときは、受容体が競合することを避けるため、Ad-p53 はタイプ 5 型のウイルスを使用した。

(3) 制限増殖型ウイルスと p53 に作用する分子標的薬の作用機序についての検討：
アポトーシス関連蛋白、オートファジー関連蛋白等の発現をウエスタンブロット法等によって検討し、ウイルス増殖と細胞周期の関連性を解析し、どのような機構・経路によって細胞死が誘導されるのかを検討した。ウイルス量は tissue culture infectious dose (TCID₅₀) 法を使用して測定した。

4. 研究成果

(1) 制限増殖型アデノウイルスの抗腫瘍効果とその解析：

9 種類の食道癌細胞株を用いて、ファイバー領域置換型の制限増殖型ウイルスを用いて、細胞傷害活性を検討した。その結果、CAR 分子発現の低い細胞においても、ファイバー領域置換型ウイルスが細胞傷害活性を有していた。但し、CD46 分子の発現レベルと細胞傷害活性の間に相関性はなく、また転写調節領域がミッドカインであれサイピンであれ、当該遺伝子発現と細胞傷害活性の間にも相関性がなかった。この時ウイルス感染細胞の細胞周期を検討すると、G2/M 期が上昇し、またウイルス増殖を示す hyperploidy 分画が増加し、時間経過とともに sub-G1 分画が上昇していた。この細胞傷害活性の経路を検討すると、初期遺伝子産物の E1A が発現し、その後後期遺伝子産物であるヘキソン蛋白が増加した。一方リン酸化 pRB 蛋白が減少した細胞と増加した細胞があり、これらは細胞周期の回転によるウイルスの増殖、増殖ウイルスによる細胞周期の停止の局面の相違、ウイルス増殖のフェーズによる違いを反映していると考えられた。

細胞死に関してウエスタンブロット法により解析すると、PARP 分子、caspase-3 分子の切断がみられ、一方で caspase-8 および caspase-9 の切断も生じていた。すなわち、外因性および内因性のアポトーシスが誘導されていた。また Bcl-xl 分子の発現が低下し、DR5 分子発現が上昇する一方で、Bid 分子の truncation はほとんど検出されなかった。また Atg5、Beclin-1 分子の発現は変化せず、LC3A/B I から II への移行もごく僅かであり、当該ウイルスによる細胞傷害活性に関してオートファジーの関与は少ないと考えられた。

(2) 分子標的薬の抗腫瘍効果：

MDM2 と p53 の結合を阻害する nutlin-3a は内因性 p53 分子の増加を誘導する。一方使用した 9 種類の食道がんの p53 遺伝子型は野生型

(TE-2, TE-11, YES-4, YES-6) と変異型 (TE-1, TE-10, YES-2, YES-5, T.Tn) が混在しており、p53 分子の発現増加による同経路の活性化が見られれば、p53 遺伝子型にはほぼ一致して細胞傷害活性が観察されるはずである。しかし、WST 法による nutlin-3a に対する感受性は、すべての食道がん細胞で同一であり、この結果は使用した食道がんでは p53 経路が失活している可能性を示唆している。HSP90 分子の機能は多彩であり、多くの蛋白質のシャペロン分子として作用する。そのなかの一つが MDM4 であり、同分子の阻害剤は結果的に MDM4 機能を阻害することになる。また MDM4 分子は p53 のユビキチン化には直接関与しないが、間接的に MDM2 と複合体を形成することにより、同ユビキチン化を阻害する。事実、HSP90 阻害剤を使用すると、内因性 p53 発現が増大する一方で、変異型 p53 分子の一部ではあるが、その機能を修正し野生型の p53 機能を回復することも可能である。そこで、HSP90 阻害剤である 17-AAG と 17-DMAG に対する上記 9 種類の食道がん細胞の感受性を検討すると、p53 遺伝子型によらず感受性に差はなかった。また ZOL を使用した食道がんの感受性を検討したが、これについても p53 遺伝子型によらず、ほぼ同様な細胞傷害活性が誘導されていた。このことは、上記食道がんにおける p53 経路は失活している可能性を示唆している。一方で、Ad-p53 を食道がんに感染させると、すべての細胞で類似したウイルス量で細胞死を誘導できることは、当該細胞では p53 遺伝子型によらず、p53 経路が活性化していることを意味している。したがって、細胞処理後の p53 分子の発現量の差が、分子標的薬と Ad-p53 の結果の違いを反映していると想定された。

(3) p53 経路の活性化による制限増殖型ウイルスの抗腫瘍効果への影響

制限増殖型ウイルスは E1A 発現や DNA 損傷シグナルによって、内因性で野生型 p53 分子の発現が増加するが、変異型 p53 の場合も p53 分子のリン酸化が生じるため、その応答性は複雑になる。そこで、Ad-MK あるいは Ad-Sur を、変異型 p53 を有する T.Tn あるいは YES-2 細胞に感染させ、さらに受容体結合部位が異なる Ad-p53 を感染させた。当該実験系においては、増殖性ウイルス感染細胞において p53 分子が発現し、内因性の変異型 p53 分子に打ち勝って p53 経路が活性化する。なおこの場合、制限増殖型ウイルスと Ad-p53 は相互に感染効率を低下させないことが判明している。この実験系において、細胞傷害活性をそれぞれ単独のアデノウイルスによるものと比較して、CalcuSyn ソフトを使用した Combination Index で解析すると、相乗的な効果を誘導したことが判明した。

そこでこの併用効果を検討するために、産生ウイルス量について TICD₅₀ 値を算出して測定した。その結果、Ad-p53 を感染させると

最終的な合成ウイルス量は非感染群に比較して低下していたが、対照として用いた Ad-LacZ (beta-galactosidase 発現型) 感染群では非感染群と同様なウイルス量を産生していた。さらに、増殖性ウイルスと Ad-p53 との併用では、感染細胞で p53 分子の発現、およびリン酸化 p53 (セリン残基 15 および 46) が、Ad-p53 単独感染群に比較して上昇しており、これに対応するように Bax, Puma, Fas, p21 14-3-3s 発現が、Ad-p53 単独群に比較して著しく増加していた。すなわちこのことは、Ad-p53 の感染によって、細胞死誘導がおり産生ウイルス量が減少するものの、増殖性ウイルスによって外因性 p53 分子の安定化が起こり、細胞傷害活性が生じてものと想定される。活性化 p53 経路が、ウイルス増殖に伴う過程で一層強化された結果と解釈された。

またこの Ad-MK あるいは Ad-Sur に Ad-p53 を併用した場合の、相乗的な細胞傷害活性はヌードマウスに食道がんを接種した動物実験モデルにおいても実証された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Hoshino, I., Nagata, M., Takiguchi, N., Nabeya, Y., Ikeda, A., Yokoi, S., Kuwajima, A., Tagawa, M., Matsushita, K., Yajima, S., Shimada, H.: A panel of autoantibodies against multiple tumor-associated antigens for detecting gastric cancer. *Cancer Sci.* 108: 308-315, 2017. doi: 10.1111/cas.13158、査読あり

Jiang, Y., Zhong, B., Kawamura, K., Morinaga, T., Shingyoji, M., Sekine, I., Tada, Y., Tatsumi, K., Shimada, H., Hiroshima, K. and Tagawa, M.: Combination of a third generation bisphosphonate and replication-competent adenoviruses augments the cytotoxicity on mesothelioma. *BMC Cancer* 16: 455, 2016. DOI 10.1186/s12885-016-2483-y、査読あり

Nanami, T., Shimada, H., Yajima, S., Oshima, Y., Matsushita, K., Nomura, F., Nagata, M., Tagawa, M., Otsuka, S., Kuwajima, A. and Kaneko, H.: Clinical significance of serum autoantibodies against Ras-like GTPases, RalA, in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Esophagus* 2015. DOI 10.1007/s10388-015-0510-8、査読あり

Yang, S., Kawamura, K., Okamoto, S., Yamauchi, S., Shingyoji, M., Sekine, I., Kobayashi, H., Tada, Y., Tatsumi, K., Hiroshima, K., Shimada, H. and Tagawa, M.: Cytotoxic effects of replication-competent adenoviruses on

human esophageal carcinoma are enhanced by forced p53 expression. *BMC Cancer* 15: 464, 2015. DOI 10.1186/s12885-015-1482-8、査読あり

Oshima, Y., Shimada, H., Yajima, S., Nanami, T., Matsushita, K., Nomura, F., Kainuma, O., Takiguchi, N., Soda, H., Ueda, K., Iizasa, T., Yamamoto, N., Yamamoto, H., Nagata, M., Yokoi, S., Tagawa, M., Ohtsuka, S., Kuwajima, A., Kaneko, H.; NY-ESO-1 autoantibody as a tumor-specific biomarker for esophageal cancer: screening in 1969 patients with various cancers. *J. Gastroenterol.* 2015. DOI: 10.1007/s00535-015-1078-8、査読あり

Ma, G., Kawamura, K., Yang, S., Okamoto, S., Li, Q., Namba, M., Shingyoji, M., Tada, Y., Tatsumi, K., Hiroshima, K., Shimada, H. and Tagawa, M.: Combination of adenoviruses expressing melanoma differentiation-associated gene-7 and chemotherapeutic agents produces enhanced cytotoxicity on esophageal carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 21: 31-37, 2014. doi:10.1038/cgt.2013.79、査読あり

Suzuki, T., Kawamura, K., Li, Q., Okamoto, S., Tada, Y., Tatsumi, K., Shimada, H., Hiroshima, K., Yamaguchi, N. and Tagawa, M.: Mesenchymal stem cells are efficiently transduced with adenoviruses bearing type 35-derived fibers and the transduced cells with the IL-28A gene produces cytotoxicity to lung carcinoma cells co-cultured. *BMC Cancer* 14: 713, 2014. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/14/713>、査読あり

〔学会発表〕(計 7 件)

Masatoshi Tagawa, Taka-aki Kozono, Yiyang Qin, Xue Rao Ning, Takao Morinaga, Shuji Kubo, Masato Shingyoji, Ikuo Sekine, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima: MDM2 and MDM4 inhibitors in combination with adenoviruses up-regulating p53 produce synergistic anti-tumor effects on mesothelioma through augmenting apoptotic processes. 22th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, July 28-30, 2016, 東京

盛永敬郎, グエンタオ, チョンボウヤア, 久保秀司, 関根郁夫, 多田裕司, 巽浩一郎, 島田英昭, 廣島健三, 田川雅敏: 細胞周期促進は増殖性アデノウイルスによるアポトーシスを増強する Cell cycle

promotion enhances apoptosis induced by replication-competent adenoviruses.第 75 回日本癌学会学術総会 平成 28 年 10 月 8 日、横浜市

Masatoshi Tagawa, Kiyoko Kawamura, Shinya Okamoto, Yuanyuan Jiang, Zhihan Li, Takao Morinaga, Shuji Kubo, Masato Shingyoji, Ikuo Sekine, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima: Cytotoxicity by adenovirus replications is associated with DNA damages and the activated P53 pathways and is dependent on reactive oxygen species. 18th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, May 13-16, 2015, New Orleans, Louisiana, USA

Masatoshi Tagawa, Shinya Okamoto, Takao Morinaga, Taka-Aki Kozono, Shuji Kubo, Masato Shingyoji, Ikuo Sekine, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima: Heat shock protein 90 inhibitors augment endogenous p53 in p53 wild-type tumors but suppress Ad-mediated over-expressed exogenous p53 levels. 21th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, July 24-26, 2015、大阪市

Masatoshi Tagawa, Kiyoko Kawamura, Shinya Okamoto, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Kenzo Hiroshima, Hideaki Shimada.: A new therapeutic strategy for cancer with replication-competent adenoviruses powered by the midkine promoter. Third Midkine Symposium, April 21, 2014, 京都

江媛媛、岡本慎也、李知瀚、久保秀司、関根郁夫、滝口裕一、多田祐司、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三、田川雅敏：制限増殖型ウイルスによる膵がんに対する細胞傷害活性は、p53 発現型アデノウイルスによって増強する Transduced p53 enhances cytotoxic effects achieved with oncolytic adenoviruses on pancreatic carcinoma cells.第 73 回日本癌学会学術総会 平成 26 年 9 月 27 日、横浜市

島田英昭、谷島聡、小池淳一、松下一之、野村文夫、日和佐隆樹、田川雅敏：消化管癌患者における Ra1A 抗原に対する免疫反応 Immune response to tumor antigen, Ra1A, in patients with gastrointestinal cancers. 第 73 回日本癌学会学術総会 平成 26 年 9 月 25 日、横浜市

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田川 雅敏 (TAGAWA、masatoshi)

千葉県がんセンター・研究所・がん治療開発グループ・部長

研究者番号：20171572

(2) 研究分担者

島田 英昭 (SHIMADA、hideaki)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：20292691

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし