

厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

難治がんに対する標的バイオ医薬の探索技術の確立と
開発研究を支援する研究基盤の構築 (H23-政策探索一般-009)

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 青木 一教

平成25(2013)年 5月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告		
難治がんに対する標的バイオ医薬の探索技術の確立と 開発研究を支援する研究基盤の構築	-----	1
青木 一教		
II. 分担研究報告		
1. がんに対する標的ベクターの網羅的探索	-----	11
青木 一教		
2. 転写制御等を利用した腫瘍標的ベクターの構築と それによる抗腫瘍効果の検討	-----	15
田川 雅敏		
3. 標的ベクターに関する細胞表面分子の探索	-----	21
濱田 洋文		
4. アデノウイルスベクターに対する生体反応の解析	-----	24
水口 裕之		
5. 標的ベクターの臨床面からの検討と評価	-----	32
水野 正明		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	別添

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

難治がんに対する標的バイオ医薬の探索技術の確立と
開発研究を支援する研究基盤の構築

研究代表者 青木 一教 国立がん研究センター研究所遺伝子免疫細胞医学研究分野・分野長

研究要旨

本研究では、がんを標的するバイオ医薬（ベクター）の探索技術を、ベクター・腫瘍細胞・生体反応の3つの観点から開発し、これらの技術を順次統合してベクターの基本骨格を構築する。個々の症例に最適ながん標的ベクターや腫瘍溶解ウイルスを開発するシステムを確立することを目的としている。本年度は、以下の研究成果を得た。①多種多様なペプチドをファイバー上に提示するアデノウイルス(Ad)・ライブラリーを構築し、膵がん細胞を *in vitro* 及び *in vivo* でスクリーニングし、病態特異的な標的ベクターを同定した。さらに、survivin promoter により増殖を制御する腫瘍溶解アデノウイルス(AdSur)に、膵がん標的リガンド (SYENFSA) を組み合わせた標的腫瘍溶解ウイルス(AdSur-SYE)が、ヒト膵がん皮下腫瘍モデルにおいて、AdSur に比べて腫瘍溶解効果を明らかに増強できることを示し、腫瘍溶解ウイルスへ標的性を付加することの有用性を明らかにした。②血中抗 Ad 抗体価が Ad ベクター局所投与による遺伝子発現に及ぼす影響について検討し、ある閾値以下の抗体価では腫瘍局所投与部位での遺伝子発現は阻害されず、効率的に遺伝子発現できることが明らかとなった。また、組織障害性の低い Ad ベクターの開発を目指し、E2A、E4、または pIX 遺伝子の 3' 非翻訳領域に miRNA の標的配列を挿入した Ad ベクターを構築した。③ファイバー変異型アデノウイルス (Adv-FZ33) 系ならびに免疫トキシン (iTox) 系を用いた高効率ながん標的化抗体のスクリーニングを続け、CD47, CD276, CD155, CD73, CD98hc, CD71, EpCAM などがん標的化治療への応用が有望な抗原・抗体セットを樹立した。④難治がんに対する標的バイオ医薬の一つとして開発を進めている腫瘍標的型アデノウイルスベクターを、ファースト・イン・マン臨床試験に使用できるように、品質保証や製造法に加えて倫理性について検討した。また、戦略的な研究開発スタイルを実現するために、昨年構築した Design Buildup Team において臨床試験を実施するうえで必要な体制を整備した。

研究分担者

青木 一教	国立がん研究センター研究所 分野長
田川 雅敏	千葉県がんセンター研究所 部長
濱田 洋文	東京薬科大学 教授
水口 裕之	大阪大学大学院 教授
水野 正明	名古屋大学医学部附属病院 教授

んを標的するバイオ医薬（ベクター）の探索技術を、ベクター・生体反応・腫瘍細胞の3つの観点から開発する。これらの技術を順次統合してベクターの基本骨格を構築し、個々の症例に最適な、生体内で高度にがん細胞を標的できるベクターや腫瘍溶解ウイルスを開発するシステムを確立することを目的とする。

1. ベクター側からの検討として、腫瘍細胞に特異的に感染する技術として、腫瘍標的化リガンドの探索を目指し、独自技術である多種多様なペプチドをキャプシド蛋白質上に提示するアデノウイルス(Ad)・ライブラリーを用いて、膵がんなどの難治がん細胞に対する標的ベクターを培養細胞系と腹膜播種動物モデルにおいて探索する。また、腫瘍で外来遺伝子の転写を惹起する特異的転写調節領域を決定し、それを用いた制限増殖型アデノウイルスを構築した。さらに、腫瘍標的リガンドを組み合わせた標的腫瘍溶解ウイルスが、腫瘍溶

A. 研究目的

生体内で腫瘍細胞やがん幹細胞を標的するバイオ医薬の効率的な探索方法は、がん治療・医学に広く応用可能な基盤技術となる。本研究では、が

解効果を増強できることを示す。

2. ベクターの生体反応からの検討では、生体反応の解析として、生体内の抗 Ad 抗体が Ad ベクターの腫瘍内投与による遺伝子発現に及ぼす影響を明らかにする。またウイルス蛋白質発現を抑制することで組織障害性の低い Ad ベクターを開発する。さらに、自然免疫活性化および組織障害誘導メカニズム解明に取り組み、目的に応じて生体反応を増強・軽減できる新規ベクターの開発につなげる。

3. 腫瘍細胞側からの検討としては、抗体の Fc 部分に結合する黄色ブドウ球菌プロテイン A の Z33 モチーフを含むファイバー変異型 Adv-FZ33 アデノウイルスや、抗体にタンパク合成阻害毒素を結合させた免疫毒素 (iTox) の殺細胞効果を指標とした抗体スクリーニング系を用いて、抗体スクリーニングを施行して、各種ヒトがん細胞に対する高性能標的化抗体を選抜し、その抗原同定を進める。すでに樹立した 615 クローンのモノクローナル抗体のうち、昨年度までに 382 クローンの抗原同定を完了した。この中には EGFR や CD20 など腫瘍標的治療の候補分子が高い比率で含まれていた。本年度は、抗原が決定されていない 233 クローンのモノクローナル抗体に対して、免疫沈降・質量分析による抗原同定を進めた。

4. 昨年度から、本研究班内で開発が進められている腫瘍標的型 Ad ベクターについて臨床面から評価する仕組みづくりを行っている。昨年度は安全性及び有効性を評価するための仕組み作りを開始し、腫瘍標的型 Ad ベクターを用いた臨床試験を実施する際に求められる基本的評価項目並びに特殊評価項目の選定を行った。今年度は、さらに、臨床試験を実施するにあたり求められる倫理性について検討を加えた。

B. 研究方法

B-1-1. 腹膜播種モデルでの膵がん標的ベクターの探索 (青木)

膵がん腹膜播種動物モデルにおいて、 2×10^5 以上の多様性を持つ Ad ライブラリーのスクリーニングを行うことにより、標的ベクターを同定することが可能であるか検討した。AsPC-1 ヒト膵がん細胞を、BALB/c ノードマウスの腹腔内に注入し、腹膜播種を作成した。ついで、膵がん細胞移植 14 日後に、Ad ライブラリーを腹腔内投与し、5 日後に腹腔内の腫瘍を摘出し、粗ウイルス液 (clude viral lysate: CVL) を抽出した。この CVL を、再び腹膜播種マウスの腹腔内に投与して、5 日後に腹腔内の腫瘍を摘出し CVL を得た。CVL から抽出した DNA を用いて、HI ループに挿入されている配列を解析した。ついで、最も頻度の高い配列をファイバーの HI ル

ープ部に挿入し、E1 領域に EGFP-luciferase fusion gene をもつ非自己増殖型の Ad ベクターを構築した。ついで、標的細胞や他の各種がん細胞あるいは正常細胞 (膵管上皮細胞、血管内皮細胞など) を用いて、EGFP 発現細胞の FACS 解析やルミノメーターを用いた Luciferase アッセイにより感染効率を比較検討した。

B-1-2. 標的化リガンドによる腫瘍溶解ウイルスの抗腫瘍効果の増強 (田川、青木)

多くの固形がんで特徴的に発現が亢進している survivin の転写調節領域により、ウイルスの増殖を制御する腫瘍溶解ウイルス (AdSur) のファイバーノブに、膵がん標的リガンド (SYENFSA) を提示する標的化腫瘍溶解ウイルス (AdSur-SYE) を構築した。この標的化リガンドは、AsPC-1 や BxPC-3 など多くのヒト膵がん細胞において感染効率を上昇させることが明らかとなっている。BxPC-3 ヒト膵がん細胞の BALB/c ノードマウス皮下腫瘍モデルを作成し、 2×10^8 PFU の AdSur や AdSur-SYE を直接腫瘍内に注入して、腫瘍径を経時的に計測した。

B-1-3. 新規 Ad ライブラリー構築方法の開発 (青木)

従来の Ad ライブラリー作成方法では末端蛋白質 (TPC) を付着した Ad ゲノム DNA (TPC-DNA) を調整し *in vitro* で全長の Ad ゲノムライブラリーを作成する必要があるが、この過程が煩雑であり時間がかかった。また、野生型ファイバーをもつ Ad ベクターが約 30% 程度混入してしまう欠点があった。そこで、Cre を発現する 293 細胞にシャトルプラスミドとファイバーレス Ad ゲノムを同時にトランスフェクションすることによる、簡便な新規 Ad ライブラリー作成方法を検討した。

B-2-1. 腫瘍内遺伝子発現における抗 Ad 抗体の影響の解析 (水口)

Ad 自体に対する免疫応答のみを誘導するために、遺伝子発現カセットを搭載していない Ad ベクター (Ad-null) を使用し、マウス各個体に 1×10^8 、 1×10^9 または 1×10^{10} VP/mouse で尾静脈内投与することにより、抗 Ad 抗体価の異なるマウスを調製することを試みた。Ad-null 投与 19 日後に、Ad ベクターの感染阻害実験にて、血清中の抗 Ad 抗体価を決定した。

つぎに、Ad ベクターの腫瘍内局所投与後の遺伝子発現を検討するために、Ad-null 投与から 10 日後に B16 メラノーマ細胞を 5×10^5 cells/mouse でマウス腹部に皮内投与し、腫瘍径が 5 mm 以上になったところで AdRGD-Luc を 1×10^9 VP/mouse で腫瘍内投与した。AdRGD-Luc を腫瘍内投与した 48 時間後にマウスより腫瘍および肝臓を回収し、Luciferase 活性を測定した。また、そのホモジネート液から Total DNA を抽出し、Ad ゲノムコピー

数を定量的 PCR 法により測定した。

B-2-2. miRNA の標的配列を挿入した Ad ベクターの作製と遺伝子発現効率 (水口)

ウイルス蛋白質発現を抑制することで組織障害性の低い Ad ベクターを開発する目的で、Ad ベクター作用後に有意な発現を示した E2A、E4、または pIX 遺伝子の 3' 非翻訳領域に、肝臓特異的 miR-122a、または脾臓特異的 miR-142-3p の完全相補配列 4 コピーを挿入した Ad ベクターを作製した。作製した Ad ベクターは Luciferase 遺伝子を搭載しており、Luciferase アッセイにより遺伝子発現効率を測定した。

B-3. がん細胞表面抗原の探索と抗体の樹立 (濱田)

Adv-FZ33 系を用いたスクリーニングで得られた抗体の抗原同定に関しては、樹立した抗体 615 クロンのうち抗原がまだ決定されていない 233 クロンに対し、免疫沈降ならびに質量分析により抗原同定を進めた。また、iTox 系を用いた新たな抗原・抗体セットの系統的・網羅的探索としては、膵がん、肺がん、精巣がん、メラノーマ、白血病など各種細胞株でマウスを免疫し、新規の標的化抗体のスクリーニングと抗原同定を進めた。

B-4. 当該ベクターの臨床応用に必要な評価項目の選定と、評価を効率よく進めるための新しい仕組みの構築 (水野)

腫瘍標的型アデノウイルスベクターを用いる臨床試験の実施を前提に、ICH-GCP に基づいた臨床試験の支援体制を提供するための整備を進めた。

B-5. 腫瘍検出技術の開発 (水野)

本研究では、膵がん等を標的化するための標的分子の同定を進めているが、標的化できたかどうかを評価するための技術開発も必要である。そこで、がん細胞で高い発現が確認されている Transferrin (Tf) 受容体に注目し、Tf を結合させた量子ドット (QDs-Tf) を使って、培養膵がん細胞株等で腫瘍検出技術の開発に着手した。

本研究は、各研究者が所属する研究施設の組換え DNA 実験や動物実験に関わる各種委員会の承認を得た上で実施している。自己増殖型 Ad ライブラリーや制限増殖型 Ad ベクターを用いた研究は、拡散防止措置に関して大臣確認を得た上で実施している。

C. 研究結果

C-1-1. 腹膜播種モデルでの膵がん標的ベクターの探索 (青木)

Ad ライブラリーを、AsPC-1 腹膜播種マウスに腹

腔内投与してスクリーニングを行ったところ、PFWSGAV 配列を提示するアデノウイルスが濃縮していた。そこで、自然感染域を抑制したファイバー上に PFWSGAV 配列を提示し、ルシフェラーゼを発現する PFWSGAV ベクター (Ad Δ CAR-PFW) を構築した。この Ad Δ CAR-PFW を AsPC-1 腹膜播種マウスの腹腔内に投与して、腹腔内腫瘍や各種臓器の Luciferase アッセイを行ったところ、AsPC-1 腹腔内腫瘍においては非標的コントロールベクターに比べて 7 倍程度感染効率が上昇していた。一方で、肝・脾・肺・膵・小腸などの正常臓器や、PSN-1、SKOV3、MKN45 などの他のがん細胞の腹腔内腫瘍に対しては、感染効率は非標的ベクターと同様であり、Ad Δ CAR-PFW が AsPC-1 腹膜播種を特異的に標的するベクターであることが示された。この Ad Δ CAR-PFW は、AsPC-1 腹膜播種に対しては、野生型ファイバーを持つ Ad ベクターと同等の感染効率を示した。

さらに、昨年度 *in vitro* で同じ AsPC-1 細胞をスクリーニングすることによって同定した SYENFSA 配列をファイバー上に提示するアデノウイルス (Ad Δ CAR-SYE) と比較すると、AsPC-1 培養細胞系では Ad Δ CAR-SYE の方が感染効率が高かったが、AsPC-1 腹膜播種系では Ad Δ CAR-PFW の感染効率が高く、同じがん細胞でもスクリーニングをする時の病態により、得られる標的リガンドが異なることが明らかとなった。

C-1-2. 標的化リガンドによる腫瘍溶解ウイルスの抗腫瘍効果の増強 (田川、青木)

腫瘍溶解ウイルスに腫瘍標的リガンドを組み合わせるにより抗腫瘍効果を増強できるか検討した。まず、AsPC-1、BxPC-3、Panc-1、MIA PaCa-2 などの膵がん細胞に、survivin、cox-2、midkine promoter による Luciferase 遺伝子を発現するプラスミドを導入し、遺伝子発現を検討したところ、survivin promoter の発現効率が高かった。そこで、survivin promoter によりウイルス増殖を制御する腫瘍溶解ウイルス (AdSur) のファイバーノブ上に、膵がん標的リガンド (SYENFSA) を提示する標的化腫瘍溶解ウイルス (AdSur-SYE) を構築した。

BxPC-3 皮下腫瘍モデルにおいて、AdSur や AdSur-SYE を直接腫瘍内に注入して抗腫瘍効果を比較検討した。腫瘍内投与後 14 日後の腫瘍体積を投与時の体積と比べると、AdSur 投与群では 3.95 倍に増加したのに対し、AdSur-SYE 群は 1.15 倍とほとんど変わりなく、明らかに腫瘍の増殖は抑制された。このように、腫瘍溶解ウイルスに、標的リガンドを組み合わせるにより、腫瘍溶解効果を増強できることを明らかとした。

C-1-3. 新規 Ad ライブラリー構築方法の開発 (青木)

ファイバーレス Ad ベクターから TPC-DNA を抽出し、シャトルプラスミド・ライブラリーとともに、Cre recombinase を発現する 293Cre 細胞に導入し、Ad ライブラリーの作成を試みたところ、遺伝子導入後 10-14 日で Ad の産生が確認できた。ついで、Ad ライブラリーの多様性を検討するために、EGFP を発現するシャトルプラスミド・ライブラリーを、EGFP を発現しないシャトルプラスミド・ライブラリーに $1:10^2$ 、 $1:10^3$ 、 $1:10^4$ 、 $1:10^5$ の割合で希釈し、293Cre 細胞に導入して、EGFP 発現アデノウイルスの産生の有無を検討した。すると、 $1:10^4$ まで希釈しても EGFP 発現アデノウイルスの産生が確認できた。この結果は、6 well ディッシュ 1 well あたり 10^4 以上の多様性を持ったウイルスを産生できることをあらわしており、従来法と同等以上の多様性を確保できることを示した。このように、純度と多様性に優れる Ad ライブラリーを簡便に構築する方法を確立した。

C-2-1. 腫瘍内遺伝子発現における抗 Ad 抗体の影響の解析 (水口)

マウスに様々な力価の Ad-null を投与し、19 日目に抗 Ad 中和抗体価を決定した。その結果、個体差が認められるものの、抗 Ad 抗体価は前投与した Ad ベクターの力価に相関していた。

つぎに、Ad-null を前投与し抗 Ad 免疫を誘導したマウスの腫瘍に AdRGD-Luc を局所投与し、2 日後の腫瘍および肝臓における遺伝子導入効率を Luciferase アッセイにて評価した。腫瘍では、抗 Ad 抗体をもたないマウスと比較し、 1×10^8 VP で免疫したマウスでは約 8 分の 1、 1×10^9 VP では約 15 分の 1、 1×10^{10} VP では約 12000 分の 1 に Luciferase 発現が低下していた。また、腫瘍における遺伝子導入効率は抗 Ad 抗体価の上昇に伴い低下したが、抗体価が 200 以下のマウスでは比較的高い遺伝子導入効率を得られたものの、抗体価が 200 以上になると顕著に導入効率が減少した。これらより、抗体価が 200 以下であれば腫瘍内投与後に、効率的な遺伝子発現が得られることが明らかとなった。

一方、ベクターの腫瘍内投与後の肝臓における Luciferase 発現を検討したところ、Ad ベクター前投与を行っていないマウスでは高い遺伝子発現が認められたが、前投与を行ったマウスでは前投与の投与量に関わらず、ほとんど Luciferase 発現が認められなかった。したがって、投与部位から漏れ出した Ad ベクターは、少しでも抗 Ad 抗体が存在すれば全身循環中に中和され肝臓での遺伝子発現は顕著に阻害されると考察された。

さらに、Ad-null を前投与したマウスの腫瘍に AdRGD-Luc を局所投与し、2 日後の腫瘍および肝臓に残存していた Ad ゲノムコピー数を TaqMan Real

Time PCR によって評価した。その結果、腫瘍においては抗 Ad 抗体価が高くなるとゲノム数は減少するという、遺伝子発現量と同様の傾向が認められた。一方、肝臓においては、どの抗体価においてもほぼ同程度の Ad ゲノムが検出された。

C-2-2. miRNA の標的配列を挿入した Ad ベクターの作製と遺伝子発現効率 (水口)

作製した Ad ベクターにおいて、E2A、E4 または pIX 遺伝子の 3' 非翻訳領域に、miR-122a または miR-142-3p の完全相補配列 4 コピーが挿入されていることを、Rapid amplification of 3' -cDNA ends 解析により確認した。これらの Ad ベクターは、通常の Ad ベクターの調整法を用いて、従来型 Ad ベクターと同程度のタイターで回収可能であった。また、Luciferase アッセイにより、*in vitro* 遺伝子発現効率も従来型 Ad ベクターと同程度であった。

C-3. がん細胞表面抗原の探索と抗体の樹立 (濱田)

Adv-FZ33 系を用いたスクリーニングで得られた抗体に関して、膵がん細胞株を免疫原として樹立した抗体 22 クローン、前立腺がん細胞株に対する抗体 11 クローン、乳がん細胞株に対する抗体 16 クローンの合計 49 クローンに対する抗原を決定した。新たに同定された抗原には、ALPP/ALPPL, PSCA, CD142, LYPD3 などの、昨年度までに同定した抗原リストには含まれていない新たな抗原が存在した。

また、iTox 系を用いた抗体スクリーニングでは、高い iTox 活性を呈するモノクローナル抗体を合計 165 クローン樹立した。このうち 56 クローンに対する抗原決定を完了したところ、CD47, CD276, CD155, CD73, CD98hc, CD71, EpCAM など、がんの標的化治療のターゲットとして有望であると考えられるものが含まれていた。これらはすべて、陽性コントロールとして用いるトランスフェリン受容体 (CD71) に匹敵する高い効率の iTox 活性を示し、治療効果が十分に期待できると考えられた。

C-4. 当該ベクターの臨床応用に必要な評価項目の選定と、評価を効率よく進めるための新しい仕組みの構築 (水野)

本研究が目指す腫瘍標的型アデノウイルスベクターの臨床開発をスムーズに進めるためには、臨床試験計画を可能な限り早期に策定し、開発研究との間で情報交換を頻回に行い、互いにブラッシュアップしていくことが重要である。そこで、昨年度構成した Design Build-up Team (DBT) に、臨床試験を実施する上で必要なプロジェクトマネージャー、企画立案担当、生物統計家、データマネージャー、薬事担当を加え、臨床試験計画の検討を行った。検討した項目は、試験デザイン、選択基準・除外基準、用法・用量、観察期間、評

価項目、統計解析方法、目標症例数である。今後、これらと基礎研究データを対応して最終的な試験計画につなげていく。

C-5. 腫瘍検出技術の開発（水野）

培養膵がん細胞株等で腫瘍検出技術の開発を行った。Tf 受容体の発現には細胞株による違いがあったが、それぞれの細胞株で発現していることを確認した。ついで、対象とした培養がん細胞に QDs-Tf が効率よく取り込まれることを確認した。

D. 考察

D-1-1. 腹膜播種モデルでの膵がん標的ベクターの探索（青木）

膵がん細胞株や腹膜播種モデルにおいて Ad ライブラリーをスクリーニングしたところ、同じ AsPC-1 細胞を用いても、培養細胞の状態と腹膜播種など生体内の場合では、得られる標的ベクターが異なっていた。これらの結果は、本スクリーニング方法が、病態に応じた標的ベクターを開発するシステムとして有用であること示している。今後は、より純度が高く多様性に優れた新規 Ad ライブラリーを用いて、広範囲に各種細胞や様々な病態でのスクリーニングを行う。

D-1-2. 標的化リガンドによる腫瘍溶解ウイルスの抗腫瘍効果の増強（田川、青木）

Survivin 遺伝子の promoter を用いてウイルスの増殖を制御する腫瘍溶解ウイルスに、膵がん細胞標的リガンドを挿入したベクターは、マウス皮下腫瘍モデルにおいて、非標的ウイルスと比較して強力な抗腫瘍効果を発揮した。この結果は、腫瘍溶解 Ad ベクターの腫瘍標的化に基づいて抗腫瘍効果の強化が可能であることを実証したものであり、中間目標を達成することができたものと考えられる。

当該研究の出口戦略の一つは臨床試験の実施である。そこで、まず難治性腫瘍である悪性中皮腫を対象に、第一段階として非増殖型 Ad ベクターの胸腔内投与という系で臨床試験を実施し、ついで悪性中皮腫を標的とするリガンドを提示する Ad ベクターを用いた臨床研究を行う。

D-2. 腫瘍内遺伝子発現における抗 Ad 抗体の影響の解析と miRNA 標的配列を挿入した Ad ベクターの作製（水口）

抗 Ad 抗体存在下での Ad ベクター局所投与による遺伝子導入効率について検討を行ったところ、投与部位局所における遺伝子導入効率はある閾値以下の抗体価では比較的効率よく保たれていたが、閾値以上となると顕著に導入効率が低下することが明らかとなった。本検討の結果は、抗 Ad 抗体価は臨床における治療効果と密接に関係することを

示唆しており、Ad ベクターを用いた遺伝子治療の際に患者の持つ抗 Ad 抗体価を考慮することは重要であることを示している。

また、E2A、E4 または pIX 遺伝子の 3' 非翻訳領域に miRNA の標的配列を挿入した Ad ベクターを構築した。これらの Ad ベクターは従来型 Ad ベクターと比較して同程度の遺伝子発現効率を示した。今後、これら Ad ベクターの遺伝子導入特性の解析を進める予定である。

D-3. がん細胞表面抗原の探索と抗体の樹立（濱田）

すでに Adv-FZ33 系で樹立した抗体の抗原を決定することに加え、新たに iTox 系で抗体を樹立してその抗原の決定を行い、がんの標的化治療への応用につながりうる有望ながん抗原が含まれていることを明らかにした。今後も様々なタイプのがん細胞を免疫原として、独自のスクリーニング系で抗体を選抜・樹立し、新たなターゲット分子の同定を進める。

D-4. 当該ベクターの臨床応用に必要な評価項目の選定と、評価を効率よく進めるための新しい仕組みの構築（水野）

腫瘍標的型アデノウイルスベクターを用いる臨床試験を推進するにあたり、ICH-GCP に基づいた臨床試験を実施・支援する体制は極めて重要である。こういった支援体制の整備は従来、基礎研究と前臨床試験が終了し、ファースト・イン・ヒューマン臨床試験を実施できる可能性がでてきてはじめて検討対象になっていた。しかしながらこの形では時間や研究に無駄の多いため、開発当初より Design Build-up Team (DBT) を構成し、戦略的に研究を進める試みを展開している。

E. 結論

- 1) Ad ライブラリーを用いて、膵がん細胞や膵がん腹膜播種の標的ベクターを同定し、病態に応じた標的ベクターを構築できることを示した。
- 2) Survivin の転写調節領域で増殖を制御する腫瘍溶解ウイルスに、膵がん標的リガンドを組み合わせることで、腫瘍溶解ウイルスの抗腫瘍効果を顕著に強化できることを示した。
- 3) Ad ベクターの腫瘍局所投与の際に既存の抗 Ad 中和抗体が遺伝子導入効率に与える影響について、ある閾値以下の抗体価では腫瘍局所投与部位での遺伝子発現は阻害されず、効率的に遺伝子発現できることが明らかとなった。また、E2A、E4、または pIX 遺伝子の 3' 非翻訳領域に miRNA の標的配列を挿入した Ad ベクターの構築に成功した。

- 4) Adv-FZ33系ならびに iTox系を用いた高効率がん標的化抗体のスクリーニングは順調に稼働しており、がん標的化治療への応用が有望な抗原・抗体セットの樹立を進める。
- 5) 難治がんに対する標的バイオ医薬の一つとして開発を進めている腫瘍標的アデノウイルスベクターをファースト・イン・ヒューマン臨床試験で早期に使用できるように、ICH-GCPに基づいた臨床試験の支援体制の中で、開発研究側と連携を強化していく。今後は、機能拡充した DBT を中心に検証していく。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishimoto T, Yamamoto Y, Yoshida K, Goto N, Ohnami S, Aoki K. Development of peritoneal tumor-targeting vector by in vivo screening with a random peptide-displaying adenovirus library. *PLoS ONE* 7; e45550, 2012.
- 2) Miura Y, Yamazaki S, Julia D, Brown E, Aoki K, Vivkers S, Yamamoto M. Infectivity-selective Oncolytic Adenovirus Developed by High-throughput Screening of Adenovirus-formatted Library. *Mol Ther* 21: 139-148, 2013.
- 3) Kimura J, Ono H, Kosaka T, Makino H, Akiyama H, Ichikawa Y, Nagashima Y, Hirai S, Ohno S, Aoki K, Davydova J, Yamamoto M, Kunisaki C, Endo I. Conditionally replicative adenoviral vectors for imaging the effect of chemotherapy on pancreatic cancer cells. *Cancer Sci.* (in press).
- 4) Iguchi K, Sakurai F, Tomita K, Katayama K, Yamaguchi T, Tagawa M, Kawabata M, Shirakawa T, Mizuguchi H. Efficient antitumor effects of carrier cells loaded with a fiber-substituted conditionally replicating adenovirus on CAR-negative tumor cells. *Cancer Gene Ther.* 19: 118-125, 2012.
- 5) Li Q, Kawamura K, Okamoto S, Yamanaka M, Yang S, Yamauchi S, Fukamachi T, Kobayashi H, Tada Y, Takiguchi Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M. Upregulated p53 expression activates apoptotic pathways in wild-type p53-bearing mesothelioma and enhances cytotoxicity of cisplatin and pemetrexed. *Cancer Gene Ther.* 19: 218-228, 2012.
- 6) Hamada K, Yoshihara C, Ito T, Tani K, Tagawa M, Sakuragawa N, Itoh H, Koyama Y. Antitumor effect of chromatin sulfate-coated ternary granulocyte macrophage-colony-stimulating factor plasmid complex for ovarian cancer. *J. Gene Med.* 14:120-127, 2012.
- 7) Fukamachi T, Saito H, Tagawa M, Kobayashi, H. The impact of extracellular low pH on the anti-tumor efficacy against mesothelioma. In: *Mesotheliomas-synonyms and definition, epidemiology, etiology, pathogenesis, cyto-histopathological features, clinic, diagnosis, treatment, prognosis.* ed by Zubritsky, A. InTech, Rijeka, Croatia. p187-210, 2012.
- 8) Okamoto S, Kawamura K, Li Q, Yamanaka M, Yang S, Fukamachi T, Tada Y, Tatsumi T, Shimada H, Hiroshima K, Kobayashi H, Tagawa M. Zoledronic acid produces antitumor effects on mesothelioma through apoptosis and S-phase arrest in p53-independent and Ras prenylation-independent manners. *J. Thorac. Oncol.* 7; 873-882, 2012.
- 9) Nagakawa H, Shimozato O, Yu L, Wada A, Kawamura K, Li Q, Chada S, Tada Y, Takiguchi Y, Tatsumi K, Tagawa M. Expression of a murine homologue of apoptosis-inducing human IL-24/MDA-7 in murine tumors fails to induce apoptosis or produce anti-tumor effects. *Cell. Immunol.* 275; 90-97, 2012.
- 10) Kitazono-Saito M, Takiguchi Y, Kitazono S, Ashinuma H, Kitamura A, Tada Y, Kurosu K, Sakaida E, Sekine I, Tanabe N, Tagawa M, Tatsumi K. Interaction and cross-resistance of cisplatin and pemetrexed in malignant pleural mesothelioma cell lines. *Oncol. Rep.* 28: 33-40, 2012.
- 11) Shimada H, Yajima S, Oshima Y, Hiwasa T, Tagawa M, Matsushita K, Nomura F. Impact of serum biomarkers on esophageal squamous cell carcinoma. *Esophagus.* 9: 131-140, 2012.
- 12) Tagawa M, Kawamura K, Yu L, Tada Y, Hiroshima K, Shimada H. A gene medicine with the midkine-mediated transcriptional regulation as new cancer therapeutics. In: *Midkine: From embryogenesis to pathogenesis and therapy.* ed by Erguven, M., Muramatsu, T and Bilir A. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg, Germany. p237-246, 2012.
- 13) Nagaya H, Tagawa M, Hiwasa K, Terao S, Kanno T, Nishizaki T, Gotoh A. Fiber-substituted conditionally replicating adenovirus for oncolysis of human renal carcinoma cells. *Anticancer Res.* 32: 2985-2990, 2012.
- 14) Yamanaka M, Tada Y, Kawamura K, Li Q, Okamoto S, Chai K, Yokoi S, Liang M, Fukamachi T, Kobayashi H, Yamaguchi N, Kitamura A, Shimada H, Hiroshima K, Takiguchi Y, Tatsumi K, Tagawa M. E1B-55kD-defective adenoviruses activate p53 in mesothelioma and enhance cytotoxicity of anti-cancer agents. *J. Thorac. Oncol.* 7: 1850-1857, 2012.
- 15) Wu D, Hiroshima K, Matsumoto S, Nabeshima K, Yusa T, Ozaki D, Fujino M, Yamakawa H, Nakatani Y, Tada Y, Shimada H, Tagawa M. Diagnostic usefulness of p16/CDKN2A FISH in

- distinguishing between sarcomatoid mesothelioma and fibrous pleuritis. *Am. J. Clin. Pathol.* 139: 39-46, 2013.
- 16) Tada Y, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M. A potential therapeutic strategy for malignant mesothelioma with gene medicine. *BioMed Res Int* 2013: 572609, 2013.
 - 17) Tagawa M, Tada Y, Shimada H, Hiroshima K. Gene therapy for malignant mesothelioma: Current prospects and challenges. *Cancer Gene Ther.* 20; 150-156, 2013.
 - 18) Fukamachi T, Ikeda S, Wang X, Saito H, Tagawa M, Kobayashi H. Gene expressions for signal transduction under acidic conditions. *Genes* 4: 65-85, 2013.
 - 19) Okamoto S, Jiang Y, Kawamura K, Shingyoji M, Fukamachi T, Tada Y, Takiguchi Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Kobayashi H, Tagawa M. Zoledronic acid produces combinatory anti-tumor effects with cisplatin on mesothelioma by increasing p53 expression levels. *PLoS ONE* 8; e60297, 2013.
 - 20) Hasegawa N, Abei M, Yokoyama KK, Fukuda K, Seo E, Kawashima R, Nakano Y, Yamada T, Nakade K, Hamada H, Obata Y, Hyodo I. Cyclophosphamide enhances antitumor efficacy of oncolytic adenovirus expressing uracil phosphoribosyltransferase (UPRT) in immunocompetent Syrian hamsters. *Int J Cancer.* (in press).
 - 21) Liu B, Ohishi K, Orito Y, Nakamori Y, Nishikawa H, Ino K, Suzuki K, Matsumoto T, Masuya M, Hamada H, Mineno J, Ono R, Nosaka T, Shiku H, Katayama N. Manipulation of human early T lymphopoiesis by coculture on human bone marrow stromal cells: Potential utility for adoptive immunotherapy. *Exp Hematol.* (in press).
 - 22) Hamada S, Masamune A, Takikawa T, Suzuki N, Kikuta K, Hirota M, Hamada H, Kobune M, Satoh K, Shimosegawa T. Pancreatic stellate cells enhance stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 421, 349-54, 2013.
 - 23) Nakamori Y, Liu B, Ohishi K, Suzuki K, Ino K, Matsumoto T, Masuya M, Nishikawa H, Shiku H, Hamada H, Katayama N. Human bone marrow stromal cells simultaneously support B and T/NK lineage development from human haematopoietic progenitors: a principal role for flt3 ligand in lymphopoiesis. *Br J Haematol.* 157, 674-86, 2012.
 - 24) Koyama T, Shimura M, Minemoto Y, Nohara S, Shibata S, Iida Y, Iwashita S, Hasegawa M, Kurabayashi T, Hamada H, Kono K, Honda E, Aoki I, Ishizaka Y. Evaluation of selective tumor detection by clinical magnetic resonance imaging using antibody-conjugated superparamagnetic iron oxide. *J Control Release.* 159, 413-8, 2012.
 - 25) Tomita K, Sakurai F, Tachibana M, Mizuguchi H. Correlation between adenovirus-neutralizing antibody titer and adenovirus vector-mediated transduction efficiency following intratumoral injection. *Anticancer Res.* 32, 1145-1152, 2012.
 - 26) Shimizu K, Sakurai F, Tachibana M, Mizuguchi H. Development of a novel adenovirus vector exhibiting microRNA-mediated suppression of the leaky expression of adenovirus genes. *Yakugaku Zasshi*, 132, 1407-1412, 2012.
 - 27) Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F, Hori M. Plasma-activated medium selectively kills glioblastoma brain tumor cells by down-regulating a survival signaling molecule, AKT kinase. *Plasma Medicine* 1: 265-277, 2013.
 - 28) Takaha N, Nakanishi H, Kimura Y, Hongo F, Kamoi K, Kawauchi A, Mizuno M, Yoshida J, Wakabayashi T, Miki T. Significant induction of apoptosis in renal cell carcinoma cells transfected with cationic multilamellar liposomes containing the human interferon- β gene through activation of the intracellular type 1 interferon signal pathway. *Int J Oncol.* 40:1441-6, 2012.
2. 学会発表
- 29) Narumi K, Udagawa T, Aida K, Suzuki K, Makimoto A, Aoki K. Syngeneic hematopoietic stem cell transplantation enhances the antitumor immunity of intratumoral type I interferon gene transfer for sarcoma. The American Society of Gene Therapy's 15th Annual Meeting. May 16-19, 2012 (Philadelphia).
 - 30) Aoki K, Narumi K, Udagawa T. Combination therapy of hematopoietic stem cell transplantation and intratumoral interferon gene transfer to sarcoma (Symposium). 第 18 回日本遺伝子治療学会学術集会. July 28-30, 2012.
 - 31) Yamamoto Y, Nishimoto T, Yoshida K, Goto N, Ohnami S, Yoshida T, Aoki K. Development of peritoneal tumor-targeting vector by in vivo screening with a random peptide-displaying adenovirus library. 第 18 回日本遺伝子治療学会学術集会. July 28-30, 2012.
 - 32) Aoki K, Udagawa T, Narumi K. Suppression of immune-tolerant microenvironment within tumors by hematopoietic stem cell transplantation. 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
 - 33) Aida K, Suzuki K, Miyakawa R, Narumi K, Goto N, Ikarashi Y, Ohnami S, Yoshida T, Aoki K. Suppression of regulatory T cells enhances antitumor immunity induced by intratumoral IFN- α gene transfer to pancreatic cancer. 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
 - 34) Suzuki K, Miyakawa R, Aida K, Goto N, Narumi K, Yoshida T, Aoki K. Antitumor immunity of hematopoietic stem cell transplantation differs by a priming status of donor cells. 第 71 回日本癌

- 学会総会. Sep 19-21, 2012.
- 35) Miyakawa R, Suzuki K, Aida K, Goto N, Narumi K, Yoshida T, Aoki K. VEGF-D-mediated suppression of immune-tolerant microenvironment within tumors by hematopoietic stem cell transplantation. 第71回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
- 36) Yamamoto Y, Goto N, Ohnami S, Miura Y, Yamamoto M, Yoshida T, Aoki K. New method to produce peptide-displaying adenovirus library. 第71回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
- 37) Ikarashi Y, Aoki K, Kim S-W, Imai T, Hoffman RM, Nakagama H. NKT cell-ligand inhibits donor engraftment after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 第71回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
- 38) 青木一教. 固形がんに対する新たな免疫遺伝子・細胞療法の開発. 第6回日本緩和医療薬学会. Oct 6-7, 2012.
- 39) Narumi K, T Udagawa T, Miyakawa R, Aoki K. VEGF-D-mediated suppression of regulatory T cells within tumors by hematopoietic stem cell transplantation. 第41回日本免疫学会総会. Dec 5-7, 2012.
- 40) Narumi K, Suzuki K, Miyakawa R, Aida K, Yoshida T, Aoki K. Antitumor immunity induced by autologous hematopoietic stem cell transplantation is enhanced by a priming of the donor T lymphocytes to tumor-associated antigens. 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference. February 21-25, 2013 (Maui).
- 41) Tagawa M, Okamoto S, Jiang Y, Kawamura K, Yang S, Yamauchi S, Tada Y, Takiguchi Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Kubo S, Li Q, Kobayashi H. Adenoviruses-mediated up-regulation of p53 expression produces cytotoxic effects on INK4A/ARF-defective mesothelioma and increases the susceptibility to chemotherapeutic agents and small G protein inhibitors. 15th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, May 16-19, 2012, Philadelphia.
- 42) S Kubo, M Takagi-Kimura, A Tamamoto, N Okamura, Y Maeyama, N Terada, M Tagawa, N Kasahara, H Okamura, T Hashimoto-Tamaoki. Midkine promoter-driven oncolytic adenovirus with Ad35 fiber achieves enhanced transfection of human malignant mesothelioma cells in vitro and in vivo. 15th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, May 16-19, 2012, Philadelphia.
- 43) M Tagawa, K Kawamura, S Yang, Y Jiang, K Chai, N Yamaguchi, Y Tada, Y Takiguchi, K Tatsumi, H Shimada, K Hiroshima. Activation of p53 pathways produces combinatory effects with chemotherapeutic agents on p53 wild-type mesothelioma. 18th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, June 28-30, 2012, Kumamoto.
- 44) M Takagi-Kimura, A Tamamoto, N Okamura, Y Maeyama, M Tagawa, N Kasahara, H Okamura, Tomoko Hashimoto-Tamaoki and Shuji Kubo: Enhanced transduction of human mesothelioma cells by midkine promoter-driven oncolytic adenovirus with Ad35 fiber modification. 18th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, June 28-30, 2012, Kumamoto.
- 45) H Nagaya, S Terao, K Hiwasa, M Tagawa, A Gotoh. Oncolytic effects of a fiber knob substituted adenovirus vector to human bladder carcinoma cells. 8th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, June 28-30, 2012, Kumamoto.
- 46) M Tagawa, Q Li, K Kawamura, M Shingyoji, Y Tada, Y Takiguchi, K Tatsumi, H Shimada, K Hiroshima. Reactivation of p53-mediated pathways induces apoptosis in mesothelioma with wild-type p53 gene and produces combinatory synergistic effects with anti-cancer agents. The 11th international conference of the international mesothelioma interested group, September 11-14, 2012, Boston.
- 47) K Hiroshima, D Wu, S Matsumoto, K Nabeshima, T Yusa, D Ozaki, M Fujino, Y Nakatani, Y Tada, H Shimada, M Tagawa. Diagnostic utility of p16 FISH in distinction between sarcomatoid mesothelioma and fibrous pleuritis. The 11th international conference of the international mesothelioma interested group, September 11-14, 2012, Boston.
- 48) Y Tada, Q Li, K Kawamura, H Kobayashi, I Sekine, Y Takiguchi, K Tatsumi, H Shimada, K Hiroshima, M Tagawa. Zoledronic acid, the third generation of bisphosphonates, produces anti-tumor effects on mesothelioma in vitro and in vivo through apoptosis or S phase arrest in p53-independent and Ras prenylation-independent manners. The 11th international conference of the international mesothelioma interested group, September 11-14, 2012, Boston.
- 49) M Tagawa, K Kawamura, S Yang, Y Jiang, K Chai, N Yamaguchi, Y Tada, Y Takiguchi, K Tatsumi, H Shimada, K Hiroshima. Gene therapy for malignant mesothelioma with restored p53 functions. Internatinal Society for Cell and Gene Therapy of Cancer 2012 Singapore Conference, October 4-6, 2012, Singapore.
- 50) M Tagawa, K Kawamura, S Okamoto, J Yuan Yuan, M Shingyoji, Y Tada, Y Takiguchi, K Tatsumi, H Shimada, K Hiroshima. A small G protein inhibitor, bisphosphonates, produces synergistic cytotoxicity on wild-type p53-bearing mesothelioma with adenoviruses up-regulating the p53 expression level. 20th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, October 25-29, 2012, Versailles, France.

- 51) 田川雅敏、川村希代子、楊珊、江媛媛、柴 寛、久保秀司、山口直人、多田裕司、滝口裕一、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三：ビスフォスフォネートは、Rab の機能を阻害して悪性中皮腫に細胞死を誘導し、抗がん剤との併用効果を示す Bisphosphonates induce apoptosis through the suppression of Rab and produce combinatory effects with anti-cancer agents. 第 71 回日本癌学会学術総会 平成 24 年 9 月 19 日-21 日 (札幌市)
- 52) 楊珊、川村希代子、江媛媛、柴 寛、久保秀司、山口直人、多田裕司、滝口裕一、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三、田川雅敏：食道がんに対するファイバー領域改変型増殖性アデノウイルスの抗腫瘍効果は p53 遺伝子発現によって増強する Cytotoxicity of replication-competent adenoviruses in esophageal carcinoma was enhanced by forced p53 expression. 第 71 回日本癌学会学術総会 平成 24 年 9 月 19 日-21 日 (札幌市)
- 53) 久保秀司、山野智基、吉川良恵、森永伴法、玉置知子、田川雅敏、笠原典之：悪性中皮腫に対する二重制御型腫瘍溶解アデノウイルスの開発 Development of doubly regulated oncolytic adenovirus for human malignant mesothelioma. 第 71 回日本癌学会学術総会 平成 24 年 9 月 19 日-21 日 (札幌市)
- 54) 島田英昭、谷島 聡、小池淳一、田川雅敏、日和佐隆樹、松下一之、野村文夫：Stage I/II 消化器癌患者血清抗ガレクチン-1 抗体の解析 Analysis of serum anti-galectin-1 antibody in stage I/II gastroenterological carcinomas. 第 71 回日本癌学会学術総会 平成 24 年 9 月 19 日-21 日 (札幌市)
- 55) 富田恭子、櫻井文教、庄司正樹、立花雅史、水口裕之：アデノウイルスベクター局所投与による遺伝子発現への抗アデノウイルス抗体の影響、日本薬学会第 132 回年会、北海道、2012 年 3 月
- 56) K Tomita, F Sakurai, M Tachibana, H Mizuguchi. Effect of adenovirus-neutralizing antibody on adenovirus vector-mediated transgene expression following intratumoral injection. 第 18 回日本遺伝子治療学会年次学術集会、熊本、2012 年 6 月
- 57) K Shimizu, F Sakurai, M Tachibana, H Mizuguchi. Development of a novel adenovirus vector carrying microRNA-targeted sequences in the 3'-untranslated region of the pIX, E2A, or E4 gene for suppression of the leaky expression of adenovirus genes, American Society of Gene and Cell Therapy 15th Annual Meeting (Philadelphia), 2012 年 5 月
- 58) K Shimizu, F Sakurai, M Tachibana, H Mizuguchi. Development of a novel adenovirus vector by incorporating microRNA-targeted sequences into E2A, E4, or pIX genes for suppression of the leaky expression of adenovirus genes, 第 18 回日本遺伝子治療学会年次学術集会、熊本、2012 年 6 月
- 59) 清水かほり、櫻井文教、立花雅史、水口裕之：マイクロ RNA を利用してウイルス遺伝子の発現を抑制可能なアデノウイルスベクターの遺伝子導入特性に関する検討、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012、仙台、2012 年 9 月
- 60) 清水かほり、櫻井文教、立花雅史、水口裕之：マイクロ RNA を利用してウイルス遺伝子の発現を抑制可能なアデノウイルスベクターの遺伝子導入特性解析、第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会、神戸、2012 年 10 月
- 61) 清水かほり、櫻井文教、立花雅史、水口裕之：microRNA を利用してウイルス遺伝子の非特異的な発現を抑制可能な新規アデノウイルスベクターの開発、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月
- 62) Tanaka H, Nakamura K, Iseki S, Moriyama H, Kajiyama H, Ishikawa K, Kano H, Kikkawa F, Mizuno M, Hori M. Plasma-activated medium effectively killed glioma cancer cells. The 5th International Conference on Plasma-Nanotechnology & Science 2012 Inuyama, Japan, Mar. 9-10, 2012
- 63) Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F, Hori M. Analysis of the intracellular molecular mechanisms of plasma-activated medium mediated cell death in glioma brain tumor cells. APCPST-2012 (Kyoto, Japan), Oct 2-5-2012
- 64) Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F, Hori M. Plasma-activated medium induced apoptosis on glioblastoma brain tumor cells. The 5th PLACIA & PLAM International Symposium. Nagoya, Japan, Oct 24, 2012
- 65) Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F, Hori M. Characterization of anti-tumor effect of glioblastoma brain tumor cells by Plasma-activated medium. The 6th International Conference on Plasma-Nanotechnology & Science 2013 Gero, Japan, Jan. 2-3, 2013
- 66) Tanaka H, Nakamura K, Iseki S, Moriyama H, Kajiyama H, Ishikawa K, Kano M, Kikkawa F, Mizuno M, Hori M. Anti-tumor effects of glioma cancer cells by plasma activated medium 2012 年春季 第 58 回応用物理学会学術講演会(東京) 2012 年 3 月 15-18 日
- 67) Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F, Hori M. Selective killing of glioma brain tumor cells by plasma-activated medium 2012 年秋季 第 59

回応用物理学会学術講演会（松山）2012年9月11-14日

- 68) Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F, Iori M.
Intracellular molecular mechanisms of apoptosis in glioblastoma brain tumor cells by plasma-activated medium 2013年 春季 第60回応用物理学会学術講演会（厚木）2013年3月27-29日
- 69) 権田亮、田中宏昌、竹田圭吾、田島聡美、近藤博基、石川健治、関根誠、加納浩之、水野正明、堀勝 混合ガスプラズマ培養液によるグリオーマ脳腫瘍培養細胞に対する抗腫瘍効果の解析 2013年 春季 第60回応用物理学会学術講演会（厚木）2013年3月27-29日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得状況

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

がんに対する標的ベクターの網羅的探索

研究分担者 青木 一教 国立がん研究センター研究所遺伝子免疫細胞医学研究分野・分野長

研究要旨

腫瘍溶解ウイルス療法は、正常細胞内では増殖できず腫瘍細胞内だけで増殖するように遺伝子工学的に改変したウイルスであり、革新的がん治療薬として大きな期待が寄せられている。しかし、これまでの腫瘍溶解アデノウイルスには腫瘍標的化能が不足していた。そこで、我々は、独自技術である、多種多様なペプチドをファイバー上に提示するアデノウイルス・ライブラリーを用いて、AsPC-1 膵がん細胞を *in vitro* 及び *in vivo* でスクリーニングし、標的リガンドを同定した。ついで、survivin 遺伝子の転写調節領域により増殖を制御する腫瘍溶解アデノウイルス (AdSur) に、この膵がん標的リガンド (SYENFSA) を組み合わせた標的腫瘍溶解ウイルス (AdSur-SYE) を構築した。AdSur-SYE は、ヒト膵がん皮下腫瘍モデルにおいて、AdSur に比べて腫瘍溶解効果を顕著に増強でき、腫瘍溶解ウイルスに腫瘍標的性を付加することが抗腫瘍効果の増強に有用であることを示した。

A. 研究目的

腫瘍溶解ウイルス療法は、革新的がん治療薬として大きな期待が寄せられている。しかし、腫瘍溶解ウイルスの臨床開発は世界的に進められているが、2つの課題が存在することが明らかとなってきた。1 つ目は、腫瘍溶解効果を一層増強する必要があることである。これは、腫瘍細胞への感染効率の低さや、ベクターの腫瘍組織内での拡散が不十分であることによる。2 つ目として、腫瘍内で増殖したウイルスが血中に漏れて臓器への異所性感染をおこすことがわかってきた。ウイルスによる予期しない副作用を防ぐために、がん細胞以外の正常細胞・組織への感染を抑制する必要がある。これらの課題を解決するためには、ウイルスの自然の感染域を抑制することと、一方で、溶解効果は腫瘍への感染力に依存するので腫瘍に対する標的的特異性を高めること、を両立する技術の開発が必要である。

理論的には、アデノウイルスベクターのキャプシド蛋白質を遺伝子工学的に改変して標的リガンドを挿入することにより、細胞・組織特異的に感染する標的アデノウイルスベクターを構築することが可能である。しかし、現実的には、多くのがん細胞において特異的なリガンドとレセプターの組み合わせが明らかでなく、同じがん種でも個人によって感染に利用できる細胞表面の受容体は大きく異なる。そこで、我々は、特異的に感染する腫瘍標的化リガンドの探索を目指し、多種多様なペプチドをキャプシド蛋白質上に提示するアデノウイルス (Ad) ライブラリーを用いて、グリオーマや膵がん等の細胞を用いてスクリーニングし、標的 Ad ベクターを

開発する方法を確立してきた。本年度は、このライブラリーを用いて、膵がん細胞をスクリーニングして同定された標的リガンドを、腫瘍溶解ウイルスと組み合わせることにより、腫瘍溶解効果を増強できるかどうか検討した。

一方、従来の Ad ライブラリーの作成方法は、手技がやや煩雑で手間がかかる上、原理的にファイバーノブにリガンドを提示しないアデノウイルスが混入する。そこで、多くの種類のがん細胞での標的リガンドの広範な探索に移る前に、ペプチドをファイバー上に提示しないウイルスの混入を防ぎ、純度の高いライブラリーを簡便に構築する方法の開発を試みた。

B. 研究方法

B-1. *in vitro* での膵がんに対する標的 Ad ベクターの探索

2×10^5 以上の多様性を持つ Ad ライブラリーを用いて、AsPC-1 膵がん培養細胞のスクリーニングを行った。具体的には、まず AsPC-1 細胞に MOI 1-3 程度となるように Ad ライブラリーを感染した。5-7 日後に細胞を回収し、凍結融解操作を 3 回行って、粗ウイルス液 (crude viral lysate: CVL) を得た。CVL の一部をプロネース処理し、DNA を抽出した。ついで、CVL を再び標的細胞に感染させ、回収・再感染の過程を 3-4 ラウンド繰り返した。CVL から抽出した DNA を用いて、HI ループにおけるリガンド挿入配列をはさむ領域の PCR を行い、得られた PCR 産物を TA クローニングベクターに挿入し、シーケンスにより HI ループに挿入されている配列を解

析した。ラウンド毎に 20-40 クローンほど解析して、出現頻度の多い配列を決定したところ、SYENFSA 配列が 39%に認められた。

B-2. *in vivo*での膵がんに対する標的 Ad ベクターの探索

同じがん細胞でも、培養細胞と生体内での腫瘍の状態とでは、細胞受容体の発現状況が異なっている可能性がある。そこで、がん腹膜播種動物モデルを用いて、*in vivo*での標的ベクターのスクリーニングが可能であるか検討した。まず、AsPC-1 ヒト膵がん細胞を、BALB/c ノードマウスの腹腔内に注入し、腹膜播種を作成した。ついで、膵がん細胞移植 14 日後に、Ad ライブラリーを腹腔内投与し、5 日後に腹腔内の腫瘍を摘出し、凍結融解操作を 3 回行って、CVL を抽出した。この CVL を 293 細胞に感染させて、ウイルスを増幅したのち、再び腹膜播種マウスの腹腔内に投与し、5 日後に腹腔内の腫瘍を摘出し、CVL を得た。CVL から抽出した DNA を用いて、HI ループに挿入されている配列を解析した。

B-3. 選択された Ad ベクターの感染効率の検討

最も頻度の高いリガンド配列をファイバーノブの HI ループ部に挿入し、E1 領域に EGFP-luciferase fusion gene をもった非自己増殖型の Ad ベクターを構築した。ついで、標的細胞や他の各種がん細胞あるいは正常細胞(膵管上皮細胞、血管内皮細胞など)に感染し、EGFP 発現細胞の FACS 解析やルミノメーターを用いた Luciferase アッセイにより感染効率を比較検討した。

B-4. 標的リガンドを提示する腫瘍溶解アデノウイルスベクターの構築

千葉県がんセンター田川雅敏博士との連携のもと、多くの固形がんで特徴的に発現が亢進している survivin の転写調節領域によりウイルスの増殖を制御する腫瘍溶解ウイルス(AdSur)のファイバーノブに、膵がん標的リガンド(SYENFSA)を提示する標的化腫瘍溶解ウイルス(AdSur-SYE)を構築した。この標的化リガンドは、AsPC-1 や BxPC-3 など多くのヒト膵がん細胞において感染効率を上昇させることが明らかとなっている。

B-5. 標的化腫瘍溶解アデノウイルスの抗腫瘍効果の検討

BxPC-3 ヒト膵がん細胞の BALB/c ノードマウス皮下腫瘍モデルを作成し、 2×10^8 PFU の AdSur や AdSur-SYE を直接腫瘍内に注入して、腫瘍径を経時的に計測した。

B-6. 新規 Ad ライブラリー構築方法の開発

従来の Ad ライブラリー作成方法では、末端蛋白

質(TPC)を付着したアデノウイルスゲノム DNA(TPC-DNA)を調整し、*in vitro* で全長のアデノウイルスゲノム・ライブラリーを構築する必要があるが、この過程が煩雑であり時間がかかった。また、野生型ファイバーをもつ Ad ベクターが約 30%程度混入してしまう欠点があった。そこで、Cre を発現する 293 細胞にシヤトルプラスミドとファイバーレス Ad ゲノムを同時にトランスフェクションすることによる、新規 Ad ライブラリー作成方法を開発した。ファイバーレス Ad ベクターは自己増殖できないため、野生型ファイバーを発現している 633 細胞に、ファイバーレス Ad ベクター DNA を導入することにより作成した。

(倫理面への配慮)

本研究は、所属する研究施設の遺伝子組み換え実験や動物実験に関わる各種委員会の審査を受け理事長の承認を得た上で実施した。自己増殖型 Ad ライブラリーを用いた実験は、拡散防止措置に関して大臣確認を得た上で実施した。

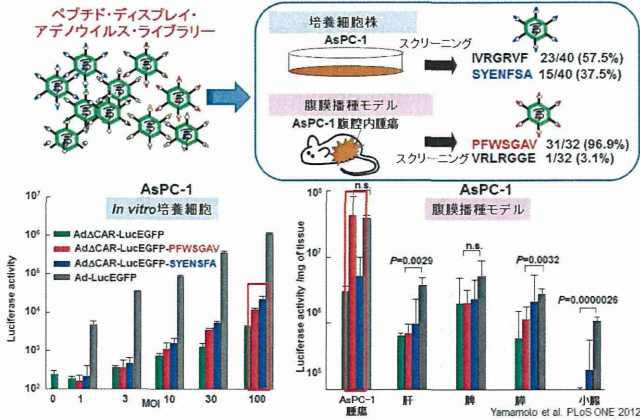
C. 研究結果

C-1. 腹膜播種モデルでの膵がん標的ベクターの探索

AsPC-1 腹膜播種マウスにおいて、Ad ライブラリーをスクリーニングしたところ、PFWSGAV 配列を提示するアデノウイルスが濃縮していた。そこで、自然感染域を抑制したファイバーノブ上に PFWSGAV リガンドを提示し、ルシフェラーゼを発現する PFWSGAV ベクター(Ad Δ CAR-PFW)を構築した。この Ad Δ CAR-PFW を AsPC-1 腹膜播種マウスの腹腔内に投与して、2 日後に腹腔内腫瘍や各種臓器のルシフェラーゼアッセイを行ったところ、AsPC-1 腹腔内腫瘍においては非標的コントロールベクターに比べて 7 倍程度感染効率が上昇していた。一方で、肝・脾・肺・膵・小腸などの正常臓器や、PSN-1、SKOV3、MKN45 などの他のがん細胞の腹腔内腫瘍に対しては、感染効率は非標的ベクターと同様であり、Ad Δ CAR-PFW が AsPC-1 腹膜播種を特異的に標的するベクターであることが示された。また、この Ad Δ CAR-PFW は、AsPC-1 腹膜播種に対しては、野生型ファイバーを持つ Ad ベクターと同等の感染効率を示した。

さらに、昨年度 *in vitro* で同じ AsPC-1 細胞をスクリーニングすることによって同定された SYENFSA 配列を HI ループ上に提示するアデノウイルス(Ad Δ CAR-SYE)と比較した。AsPC-1 培養細胞系では Ad Δ CAR-SYE の方が感染効率が高かったが、AsPC-1 腹膜播種系では Ad Δ CAR-PFW の感染効率が高く、同じがん細胞でもスクリーニングをする時の状態により、得られる標的リガンドが異なっていた(図 1)。

図1 腹膜播種モデルでのスクリーニングによる腹膜播種標的ベクターの開発

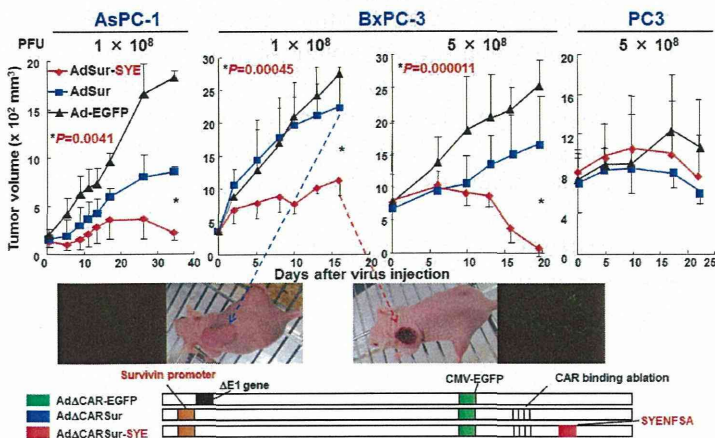


C-2. 標的化による腫瘍溶解ウイルスの抗腫瘍効果の増強

腫瘍溶解ウイルスに腫瘍標的リガンドを組み合わせることにより抗腫瘍効果を増強できるか検討した。まず、AsPC-1、BxPC-3、Panc-1、MIAPaCa-2などの膵がん細胞において、survivin、cox-2、midkine promoterによりルシフェラーゼ遺伝子を発現するプラスミドを導入し、遺伝子発現効率を検討したところ、survivin promoterの発現効率が全体的に高かった。そこで、survivin promoterにより、ウイルスの増殖を制御する腫瘍溶解ウイルス(AdSur)のファイバーノブに、膵がん標的リガンド(SYENFSA)を提示する標的化腫瘍溶解ウイルス(AdSur-SYE)を構築した。

ついで、BxPC-3皮下腫瘍モデルにおいて、 2×10^8 PFUのAdSurやAdSur-SYEを直接腫瘍内に注入して抗腫瘍効果を比較検討した。腫瘍内投与後14日後の腫瘍体積を投与時の体積と比べたところ、AdSur投与群では3.95倍に増加したのに対し、AdSur-SYE群は1.15倍とほとんど増殖しなかった(図2)。このように、腫瘍溶解ウイルスに、標的リガンドを組み合わせることにより、抗腫瘍効果を増強できることを明らかとした。

図2 制限増殖型アデノウイルスの標的化による抗腫瘍効果の増強 - 中間目標 -



C-3. 新規 Ad ライブラリーの作成

ファイバーレス Ad ベクターから TPC-DNA を抽出し、シャトルプラスミド・ライブラリー pBHI-library とともに、Cre recombinase を発現する 293Cre 細胞に導入し、Ad ライブラリーの作成を試みたところ、遺伝子導入後 10-14 日で Ad の産生が認められた。CVL から DNA を抽出し、ファイバーレス Ad ベクター DNA とライブラリー DNA を識別できるプライマーによる PCR 法により、Ad ライブラリーにおけるファイバーレス Ad の混入の程度を検討したところ、ファイバーレス Ad の割合は 10% 以下であり、スクリーニングをする上で障害とならないと考えられた。ついで、Ad ライブラリーの多様性を検討するために、EGFP を発現するシャトルプラスミド・ライブラリー pBHI-library/EGFP を EGFP を発現しないシャトルプラスミド・ライブラリー pBHI-library に $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$ の割合で希釈し、293Cre 細胞に導入して EGFP 発現アデノウイルスの産生の有無を検討した。すると、 $1:10^4$ まで希釈しても EGFP 発現アデノウイルスの産生が確認できた。このことは、6 well ディッシュ 1 well あたり 10^4 以上の多様性を持ったウイルスを産生できることを示しており、従来法と同等以上の多様性を確保できることがわかった。このように、純度と多様性に優れた Ad ライブラリーを簡便に構築する方法を確立した。

D. 考察

膵がん細胞株や腹膜播種モデルにおいて Ad ライブラリーをスクリーニングしたところ、それぞれに対する標的 Ad ベクターを同定することができた。興味深いことに、同じ AsPC-1 細胞をスクリーニングしても、培養細胞の状態と腹膜播種など生体内の場合では得られる標的ベクターが異なっており、これらの結果は、本スクリーニング方法が病態に応じた標的ベクターを開発するシステムとして有用であること示している。今後は、多様性に優れた新規 Ad ライブラリーを用いて、広範囲に各種細胞のスクリーニングを行う予定である。

また、Survivin 遺伝子の転写領域により増殖を制御する腫瘍溶解ウイルスに、がん細胞標的リガンドを挿入した標的化腫瘍溶解ウイルスは、非標的化ウイルスと比べて明らかに抗腫瘍効果は強いことを示した。このことにより、腫瘍溶解 Ad ベクターの腫瘍標的化に基づいて抗腫瘍効果を強化することが可能であることをマウスモデルで実証し、中間目標を達成したものと考えられた。

E. 結論

1) Ad ライブラリーを用いて、膵がん細胞や膵が

ん腹膜播種の標的ベクターを同定し、病態に応じた標的ベクターを構築できることを示した。

- 2) Survivin の転写調節領域で増殖を制御する腫瘍溶解ウイルスに、膵がん標的リガンドを組み合わせるにより、腫瘍溶解 Ad の抗腫瘍効果を著明に増強できることを示した。
- 3) 多様性と純度に優れた Ad ライブラリーを簡便に構築する方法を確立した。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

●論文発表

- 1) Nishimoto T, Yamamoto Y, Yoshida K, Goto N, Ohnami S, Aoki K. Development of peritoneal tumor-targeting vector by in vivo screening with a random peptide-displaying adenovirus library. PLoS ONE 7; e45550, 2012.
- 2) Miura Y, Yamazaki S, Julia D, Brown E, Aoki K, Vivkers S, Yamamoto M. Infectivity-selective Oncolytic Adenovirus Developed by High-throughput Screening of Adenovirus-formatted Library. Mol Ther 21: 139-148, 2013.
- 3) Kimura J, Ono H, Kosaka T, Makino H, Akiyama H, Ichikawa Y, Nagashima Y, Hirai S, Ohno S, Aoki K, Davydova J, Yamamoto M, Kunisaki C, Endo I. Conditionally replicative adenoviral vectors for imaging the effect of chemotherapy on pancreatic cancer cells. Cancer Sci. (in press).

●学会発表

- 4) Narumi K, Udagawa T, Aida K, Suzuki K, Makimoto A, Aoki K. Syngeneic hematopoietic stem cell transplantation enhances the antitumor immunity of intratumoral type I interferon gene transfer for sarcoma. The American Society of Gene Therapy's 15th Annual Meeting. May 16-19, 2012 (Philadelphia).
- 5) Aoki K, Narumi K, Udagawa T. Combination therapy of hematopoietic stem cell transplantation and intratumoral interferon gene transfer to sarcoma (Symposium). 第 18 回日本遺伝子治療学会学術集会. July 28-30, 2012.
- 6) Yamamoto Y, Nishimoto T, Yoshida K, Goto N, Ohnami S, Yoshida T, Aoki K. Development of peritoneal tumor-targeting vector by *in vivo* screening with a random peptide-displaying

adenovirus library. 第 18 回日本遺伝子治療学会学術集会. July 28-30, 2012.

- 7) Aoki K, Udagawa T, Narumi K. Suppression of immune-tolerant microenvironment within tumors by hematopoietic stem cell transplantation. 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
- 8) Aida K, K Suzuki K, R Miyakawa R, K Narumi K, N Goto N, Ikarashi Y, Ohnami S, Yoshida T, Aoki K. Suppression of regulatory T cells enhances antitumor immunity induced by intratumoral IFN- α gene transfer to pancreatic cancer. 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
- 9) Suzuki K, Miyakawa R, Aida K, Goto N, Narumi K, Yoshida T, Aoki K. Antitumor immunity of hematopoietic stem cell transplantation differs by a priming status of donor cells. 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
- 10) Miyakawa R, Suzuki K, Aida K, Goto N, Narumi K, Yoshida T, Aoki K. VEGF-D-mediated suppression of immune-tolerant microenvironment within tumors by hematopoietic stem cell transplantation. 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
- 11) Yamamoto Y, Goto N, Ohnami S, Miura Y, Yamamoto M, Yoshida T, Aoki K. New method to produce peptide-displaying adenovirus library. 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
- 12) Ikarashi Y, Aoki K, Kim S-W, Imai T, Hoffman RM, Nakagama H. NKT cell-ligand inhibits donor engraftment after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
- 13) 青木一教. 固形がんに対する新たな免疫遺伝子・細胞療法の開発. 第 6 回日本緩和医療薬学会. Oct 6-7, 2012.
- 14) Narumi K, T Udagawa T, Miyakawa R, Aoki K. VEGF-D-mediated suppression of regulatory T cells within tumors by hematopoietic stem cell transplantation. 第 41 回日本免疫学会総会. Dec 5-7, 2012.
- 15) Narumi K, Suzuki K, Miyakawa R, Aida K, Yoshida T, Aoki K. Antitumor immunity induced by autologous hematopoietic stem cell transplantation is enhanced by a priming of the donor T lymphocytes to tumor-associated antigens. 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference. February 21-25, 2013 (Maui).

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 特許取得状況
特になし

転写制御等を利用した腫瘍標的ベクターの構築と それによる抗腫瘍効果の検討

研究分担者 田川 雅敏 千葉県がんセンター・部長

研究要旨

腫瘍特異的にターゲットできる腫瘍溶解性ウイルスベクターを構築した。このベクターによって、オフターゲットの組織傷害活性が著しく低下し、ヒトにおける遺伝子治療の安全性を高めることが可能となった。本研究では、標的化ベクター構築のため、2つのシステムを一つのベクター系に導入した。一つは、ウイルス増殖に関わる E1 領域遺伝子を、腫瘍内で転写させるために、膵がんを含むヒト腫瘍において高頻度の高発現を示す、midkine, survivin, cyclooxygenase-2 遺伝子の 5' 側転写調節領域を当該ウイルスに導入したことであり、もう一つは、膵がん細胞への親和性が高いペプチド配列を、受容体結合領域に組み入れ、標的細胞に特異性を有したウイルスの感染を可能にしたものである。この二重のシステムにより膵がん標的化可能な腫瘍溶解性ウイルスを作製し、その抗腫瘍効果を検討した。

A. 研究目的

各腫瘍別に分子標的を設定し、それを標的化することは、現在のがん治療の一つの目的であり、バイオ技術も同じ方向性で展開を見せている。その技術に基づくバイオ医薬品の一つが、遺伝子医薬である。なかでも細胞・臓器に特定の分子を高効率に発現させ、しかもその標的細胞に特異的な細胞死を誘導する遺伝子医薬は、今後のがん治療の一翼を担う可能性があり、現行の治療選択肢の拡大にも貢献しうる。現実には、特定の分子を目的の細胞・組織で発現させるバイオ医薬品は、すでに市販化されたものもあり、がん治療の分野においても、臨床試験が数多く実施されつつある。しかし残念ながら本邦における当該分野の取り組みは、当該医薬品の上市化や臨床試験の進展を見ている諸外国に比較して、遅れが目立ち国際競争力を失いつつある。そこで、本ベクター系の開発によって、当該分野における優位性を発揮しようとするものである。

当該研究による細胞死の誘導機序は、ウイルス増殖に起因するもので、従来の抗がん剤等による細胞死とは異なる機構によると考えられている。したがって、ウイルス自体の感染と増殖を腫瘍特異的に制御できれば、新たな概念による医薬品開発となり、現行の抗がん剤・放射線治療等との併用も可能となるはずである。また、腫瘍特異的な転写調節と、標的細胞への感染を可能にするベクター系の確立によって、特定の

細胞集団の標的化が可能となり、例えばヘテロな細胞集団からがん幹細胞のみを除去することも期待される。

また、本研究の最終エンドポイントの一つが、臨床試験への移行であることから、実際の臨床試験を実施し、腫瘍溶解性ウイルスの先行事例を積み重ねることも有意義である。そこで、非増殖性アデノウイルスを用いた前臨床試験ならびに臨床試験の申請を行っている。

B. 研究方法

B-1. 転写調節領域の同定

多くのヒトの消化器系腫瘍では、midkine (MK)、survivin (Sur) および cyclooxygenase-2 (COX-2) 遺伝子が対照の正常組織に比較して、その発現が高いことが知られている。そこで、各該遺伝子の転写制御に関わる 5' 上流領域のゲノム領域に関して、5' 側より同領域を順次欠損させた遺伝子を作製し、腫瘍特異的な転写調節領域について検討した。このため、pGL2-Basic を用いてルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に、上記各種欠損ゲノム領域を結合させたベクターを作成し、これを 4 種類の膵がん細胞株、9 種類の食道がん細胞株、5 種類の悪性中皮腫細胞株に導入し、その遺伝子導入細胞におけるルシフェラーゼ活性を検討した。また、ヒト正常細胞として、繊維芽細胞、血管内皮細胞を使用して、同細胞におけるルシフェラーゼ活性も対照として測定した。遺伝子導入効率については、herpes simplex

virus-thymidine kinase (HSV-TK) 遺伝子の転写調節領域の下流に、別種のルシフェラーゼ遺伝子を組み入れたものを使用して、各細胞における同効率の補正に利用した。転写調節領域の同定にあたり、SV40 ウイルスの T 抗原の転写活性能と比べ、各転写調節領域間の相対比較を行った。さらに、転写調節領域によって、外来性遺伝子の転写が可能であるかどうかを検討するために、当該領域の下流に、HSV-TK 遺伝子そのものを結合させたベクターを作製し、上記の各種腫瘍細胞に発現させ、プロドラックである ganciclovir を投与して、その細胞傷害活性を WST 法にて検討した。

B-2. アデノウイルスベクター系の確立

任意の外来性の転写調節領域を用いて、アデノウイルス初期転写遺伝子である E1 の発現制御を容易にするため、マルチクロニングサイトを有するベクターを作成することが望ましい。そのため、pShuttle2 ベクター (Clontech 社) から cytomegalovirus (CMV) の転写調節領域を除き、そこに Mun I-Sca I-Bam HI-Eco RV-Sal I を含むマルチクロニング部位を挿入した。その結果、当該ベクターは Mun I-Sca I-Bam HI-Eco RV-Sal I-Nhe I-Dra I-Apa I-Xba I-Not I-Bst XI-Kpn I-Aff II のクロニング部位を有することになった。そこで、アデノウイルスの遺伝子 E1A 及び E1B 領域の固有の転写調節領域 (accession number M73260 で 341-548 に相当) を除き、その箇所に導入された外来性の転写調節領域によって、遺伝子 E1A 及び E1B の発現を制御するベクターを作製した。このベクターは、複数のクロニング部位に、任意の転写調節領域の挿入が可能で、同領域の制御下に、E1A 及び E1B 遺伝子の発現を制御できうるベクターである。このベクターと市販の pAdeno-X (Clontech 社) を結合させれば、容易に腫瘍溶解性アデノウイルスの作製が可能である。

B-3. アデノウイルスの作製

上記 (B-2) のベクターの Eco RV 部位に、MK、Sur および COX-2 の外来性転写調節領域を挿入し、同プラスミドをさらに制限酵素 I-Ceu I 及び PI-SceI で切断し、タイプ 5 型の pAdeno-X ベクターを I-Ceu I 及び PI-SceI で切断したものと結合させたのち、HEK293 細胞に当該 DNA を導入した。細胞傷害が生じた当該細胞より、アデノウイルスを Adeno-X ウイルス精製キット (BD Biosciences 社) を用いて精製した。この方法によりタイプ 5 型の腫瘍溶解性ウイルスが作製された。

一方、膵がん指向性を有するベクターの作製のため、タイプ 5 型ウイルスの基本配列を有

し、なおかつ次の配列を有する pBluescript ベクターを用意した。すなわち、タイプ 5 型の受容体である coxsackie adenovirus receptor (CAR) 結合領域を除去し、その部位に膵がん細胞に特異性を有して結合しうるペプチド配列 (SYENFSA) をコードする塩基配列を挿入したもので、さらに可視化を図るために CMV プロモーターの制御下に enhanced green fluorescent protein の遺伝子を配置したものである。この pBluescript ベクターを制限酵素 Pac I で消化したのち、両端を blunt 化して Eco RI のリンカーを結合させた。その後このベクターより Eco RI 断片を切り出し、pAdeno-X を Eco RI で切断後その Eco RI を除去した箇所に、当該断片を挿入させた。これにより、膵がんの指向性を有するペプチド配列等をコードしうる pAdeno-X が作製された。

なお当該研究においてヒトの倫理に関する事項はなく、また組換え DNA 実験に関しては、遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たり執るべき拡散防止措置が取られていることを、確認の上実施している。

C. 研究結果

C-1. 転写調節機能の解析

pGL2-Basic ベクターのルシフェラーゼ遺伝子上流に、MK、Sur および COX-2 遺伝子の転写調節領域を挿入したベクターを作成し、その腫瘍特異的な転写調節領域について同定を行った。この時、腫瘍細胞として、膵がん細胞、食道がん細胞、悪性中皮腫細胞、対照の正常細胞として、繊維芽細胞、血管内皮細胞を使用した。その結果、MK については開始コドン+1 とした場合に-559 から+50、Sur は転写開始点を+1 とした場合に-478 から+43 まで、COX-2 は転写開始点を+1 とした場合に-327 から+59 のゲノム遺伝子が、腫瘍特異性を有する転写調節領域を有していた。すなわち、当該領域の転写活性化能は上記のヒト腫瘍において高く、一方ヒト正常細胞では、その活性は低いものであった。実際の転写活性については、おおむねどの細胞でも、またどの領域についても、SV40 ウイルス T 抗原の転写活性化能を上回っていたが、少数の例外を除いて CMV の転写調節領域には及ばなかった。また、その各遺伝子配列から、どのような転写因子が、腫瘍特異的な転写活性化に関わるかについては、解析を行っておらず現時点においては不明のままである。一方、実際にこれらの領域の下流に、HSV-TK 遺伝子を結合させたベクターを、各種腫瘍細胞に発現させて、プロドラックである ganciclovir を投与すると、腫瘍特異的に細胞

死が誘導されることを確認している。

C-2. 腫瘍溶解性アデノウイルスの作製とその細胞傷害活性

上記転写調節領域で E1 領域遺伝子の転写を制御し、膵がん指向性を有するペプチド配列を有するタイプ 5 型アデノウイルス作製した。またコントロールとして、大腸菌由来の beta-galactosidase (LacZ) 遺伝子を E1 遺伝子の代わりに組み込んだ非増殖性のウイルス、および CMV の転写調節領域によって E1 領域遺伝子の発現を制御する増殖性ウイルスを作製した。また、上記ペプチド配列を有しないアデノウイルスも、コントロールとして作製した。これらの外来性転写調節領域を有するアデノウイルスを、上記のヒト膵がん、食道がん、悪性中皮腫の細胞に感染させ、その細胞傷害活性を WST 法等にて検討すると、感染させた細胞の種類や、使用したアデノウイルスによってその傷害活性に差があったが、同ウイルスは各種腫瘍細胞に対して、いずれも殺細胞効果を示した。しかし、LacZ 遺伝子を発現するアデノウイルスでは、殺細胞効果を示さなかった。

また、コントロールとして、ヒト正常繊維芽細胞や血管内皮細胞を用いた場合、細胞傷害活性は低いものであったが、ある程度の細胞傷害性は観察された。興味深いことに、細胞がコンフルエントになれば、細胞傷害活性が低下し、このことより、細胞増殖あるいは細胞周期と傷害活性の関連性が示唆された。

C-3. アデノウイルスベクター系の確立

外来性転写調節領域によって E1 領域遺伝子の発現を制御するベクターを確立しえたので、pAdenoX ベクターを用いて、容易に腫瘍溶解性アデノウイルスが作製できるようになった。ディスプレイライブラリーより得られた配列を有する DNA は、比較的容易に pAdenoX に組換えることができるので、今後とも標的化が可能な腫瘍溶解性ウイルス DNA の作製が、比較的短時間で可能となった。

C-4. 臨床試験に向けてのアプローチ

当該研究の一つの出口戦略は臨床試験の実施である。しかし、本邦における遺伝子医薬による臨床試験研究は未だ少数であり、特に腫瘍溶解性ウイルスによる臨床研究は、数種類の事例を見るに過ぎない。そこで、まず難治性腫瘍である悪性中皮腫を対象に、非増殖型アデノウイルスの胸腔内投与という系で臨床試験を実施し、その経験を当該研究に活かそうとしている。悪性中皮腫の患者数は少ないが、今後とも増加す

る傾向にあり、手術適応例は早期症例に限られ、第一選択薬に耐性となった後は、ベスト・サポートティブ・ケアに移行せざるを得ないのが現状である。悪性中皮腫を対象とした遺伝子治療の臨床試験は、米国で 70 数例の実施例があるが、本邦では未だなく、また胸腔内投与という経路についても、本邦ではまだ実施された症例はない。米国の臨床試験研究では特段の有害事象は報告されていないものの、非増殖性のアデノウイルスの胸腔内投与については、その安全性を確認する必要がある。そこで、臨床用量（最大で 1×10^{12} virus particle）の 380 倍に相当するウイルスを、マウスの胸腔内に投与し、その後の経過を観察した。投与直後は肺に多くのウイルスが検出されたが、血中を通じて吸収され、時間経過とともに肝臓に移行した。その結果、長期にわたる肝機能異常を認めたが、これが増悪することはなかった。また、ウイルス投与直後以外は、マウスの体重増加には大きな変化はなかった。胸腔内にアデノウイルスを投与した後のウイルス分布に関しては、これまで報告されていないが、本試験においては肝機能障害以外に生化学的検査、血液学的検査に異常を認めなかった。

D. 考察

ウイルス増殖による細胞死の機構については、まだ明確な結論は出ていないが、autophagy がその主体であるという報告がある。しかし、本研究で作製した腫瘍溶解性ウイルスでは、caspase-3 の cleavage が起こり、典型的な apoptosis と考えられる。この時、アデノウイルスで p53 遺伝子を発現させることによって、腫瘍細胞の p53 遺伝子の変異の有無に関わらず、腫瘍溶解性ウイルスによる細胞傷害活性は増強していた。このことは、DNA 傷害を誘導しうる抗がん剤との併用で、当該腫瘍溶解性ウイルスによる効果が、より高まることを示唆している。一方、抗がん剤は細胞周期を停止させ、がん細胞の代謝を阻害することから、ウイルス増殖に対しては抑制的に作用する可能性が考えられる。事実、MK 遺伝子由来の転写調節は、細胞増殖によって影響を受け、細胞周期が G0-G1 期で停止している細胞の場合、当該転写調節領域を使用した腫瘍溶解性ウイルスの細胞傷害活性が低下している。またウイルス増殖が、ウイルス蛋白の合成に依存していることから、DNA 合成の S 期と傷害活性が関連していることも考えられる。しかし実際に、細胞の代謝拮抗剤である pemetrexede や、細胞周期を G0-G1 期で停止させる cisplatin を、腫瘍溶解性ウイルスと併用

しても、殺細胞効果は減少せず、むしろ併用によって増加していた。ただし、ウイルス増殖そのものは、5-FUのようなDNA合成阻害剤を使用すると、低下していた。しかし、そのような場合でも、細胞傷害活性そのものは併用効果を示した。現時点においては、当該ウイルスと各種抗がん剤の併用について、細胞傷害活性の点からは、相互に阻害効果を生ずることはなく、相乗効果を示す場合の方が多く観察されている。

実際の治療に際して、当該ウイルスの有効性をあらかじめ知ることができれば、臨床的に有用である。目的とする遺伝子の発現によって治療効果を得る場合には、その分子標的系に関しての発現情報が参考になるが、本研究のようにウイルスの増殖と細胞死に関する場合は、どのような指標が適切かは明確ではない。しかし、ウイルスの感染効率、ウイルス増殖に影響を与えるインターフェロンの産生能、apoptosis誘導に関する遺伝子の発現レベルなどが、大きな影響を与えると考えられる。感染効率そのものは、一義的には受容体分子の発現レベルによって影響されるが、タイプ5型ウイルスの場合、CAR分子の発現と必ずしも相関関係にはなかった。これはタイプ35型ウイルスの受容体であるCD46分子発現と、同ウイルスとの感染性に相関性がなかったことによっても裏付けられる。この理由としては、ウイルスには複数の受容体があり、受容体発現レベルによる感染力の規定は単純ではなく、ウイルスが細胞内に侵入する場合にも、多くの分子機構が存在するためであると考えられる。内因性のインターフェロンの産生とウイルスの殺細胞効果は、*in vitro*の系では逆相関を示すことがあり、恒常的にインターフェロンを産生している細胞では、腫瘍溶解性ウイルスの効果が低い。しかし、生体におけるインターフェロンは、主要組織適合抗原のクラスI分子の発現上昇をはじめ、抗ウイルス免疫応答以外に抗腫瘍効果を示すことが考えられ、インターフェロンは*in vivo*においては、必ずしも殺細胞効果にとって負の因子とはならないと想定される。一方、細胞死に関与する分子の発現は、ウイルスによる細胞死の誘導にとって重要である。感染効率がほぼ同様であっても、Bcl-2分子の発現レベルが高い細胞では、抗がん剤のみならず腫瘍溶解性ウイルスに対しても抵抗性を示す。したがって、当該ウイルスの有効性を確認するバイオマーカーを確立するにあたり、臨床検体で抗腫瘍効果を判定できる系が望ましい。しかし、短時間の培養が可能な腫瘍検体を使用しても、一定レベル以上の細胞生存率と蛋白合成力が、必ずしも多くの検体で保証されず、ウイルス増殖に関与するこの重要な点に関してどのように標準化するかが、臨床検体

に基づくバイオマーカー探索の課題である。

一方、転写調節領域に用いた分子の発現を利用する間接的なバイオマーカーも想定できうる。例えば、分泌蛋白であるMK分子はエライザが可能であり、予備的結果ではあるが、悪性中皮腫の患者血清での陽性率（正常検体のバックグラウンドの2.5倍をカットオフ値とした場合）は60%を越えていた。一方悪性中皮腫の代表的なマーカー分子であるメソセリンの陽性率は約50%であり、この点からすれば、MKは比較的良好なマーカーと考えられる。しかし、MK分子については、他の疾患での比較等によるspecificityの検討を行う必要がある。いずれにしても、このように実際にウイルスの転写活性に利用した分子を、バイオマーカーに応用できれば有用であり、この点に関しては今後さらに検討が必要である。

E. 結論

ヒト腫瘍において特異性を有する転写調節領域を用いて、アデノウイルスのE1遺伝子発現制御するベクター系を構築した。さらに、腫瘍細胞に指向性を有するペプチド配列を有し、CAR結合領域を欠損させたウイルスを、上記ベクター系を用いて作製した。また、当該ウイルスの殺細胞効果を検討した。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

●論文発表

- 1) Iguchi K, Sakurai F, Tomita K, Katayama K, Yamaguchi T, Tagawa M, Kawabata M, Shirakawa T, Mizuguchi H. Efficient antitumor effects of carrier cells loaded with a fiber-substituted conditionally replicating adenovirus on CAR-negative tumor cells. *Cancer Gene Ther.* 19: 118-125, 2012.
- 2) Li Q, Kawamura K, Okamoto S, Yamanaka M, Yang S, Yamauchi S, Fukamachi T, Kobayashi H, Tada Y, Takiguchi Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M. Upregulated p53 expression activates apoptotic pathways in wild-type p53-bearing mesothelioma and enhances cytotoxicity of cisplatin and pemetrexed. *Cancer Gene Ther.* 19: 218-228, 2012.
- 3) Hamada K, Yoshihara C, Ito T, Tani K, Tagawa M, Sakuragawa N, Itoh H, Koyama Y. Antitumor effect of chromatin sulfate-coated ternary granulocyte macrophage-colony-stimulating factor plasmid complex for ovarian cancer. *J. Gene*