

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

研究総括

研究代表者 小賤 健一郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究要旨

独自開発のm-CRA（多因子で癌特異化する増殖制御型アデノウイルスベクター）作製技術を基盤に、独創的な癌幹細胞の同定・標的治療技術の開発を目的としている。分担研究者の癌幹細胞と癌悪性化に関するオリジナルの研究成果を主任研究者らのm-CRAベクターに応用し、また糖鎖技術からのベクター技術の改良開発という連携した研究体制で以下の基礎研究成果をあげ、また治験への準備も進めて来た。概要は以下である。

- 1) 第一弾医薬候補の Survivin 反応性 m-CRA (Surv.m-CRA) の、医師主導治験の準備を進めた。
- 2) Surv.m-CRA は癌の全分画に治療効果があるだけでなく、「癌幹細胞(つまり悪性化が増せば)むしろ治療効果が増加する」という結果を得、従来の治療法への優位性を実証した。
- 3) 癌幹細胞で高発現する X 分子に反応性の m-CRA を作製・解析し、本年は特に in vivo 動物モデルでの治療効果の実験を進めた。
- 4) 癌幹細胞を標的する候補となる遺伝子プロモーターモリコンピネーションで簡単に交換可能で網羅的解析を可能とし、標的する蛍光蛋白、殺傷遺伝子も搭載したベクターシステムを開発して特許出願した。
- 5) 白血病治療薬の三酸化ヒ素(ATO)による、骨肉腫増殖抑制能を見出した。
- 6) マウス人工グリオーマ幹細胞株、ヒト各種グリオーマから樹立した浮遊細胞塊と正常神経幹細胞に発現亢進・消失しているmiRNA群を同定し、miR-340がプラスミノーゲンアクチベーターを含む様々な機能因子の発現抑制を介して腫瘍形成を阻害することを明らかにした。
- 7) 癌と正常の幹細胞の分子機構解明という観点から、iPS 細胞の研究も進め、低酸素で培養することで DPSC からの iPS 細胞誘導効率が 5 倍程度上昇することを明らかにした。
- 8) ウイルスベクターへ結合する糖鎖の研究を進めた。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

三井 薫	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・講師
入江 理恵	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・助教
伊地知暢広	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・助教
王 宇清	鹿児島大学産学連携推進センター・プロジェクト研究員
小宮 節郎	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授
瀬戸口啓夫	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・助教
坂本 泰二	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授
夏越 祥次	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授

隅田 泰生	鹿児島大学大学院理工学研究科・教授
國貞 隆弘	岐阜大学医学系研究科・教授
近藤 亨	北海道大学遺伝子病制御研究所・教授

A. 研究目的

独自開発の「多因子での癌特異的増殖制御型アデノウイルス」(m-CRA)技術を基盤に、厚労科研（三次がん一期）で「既存技術を治療効果と安全性で大きく凌ぐ Survivin 依存性 m-CRA (Surv.m-CRA)の開発」等、同（二期）で「癌幹細胞治療への Surv.m-CRA の応用」等の成果を上げてきた。これを踏まえて本研究の主な目的は以下である。

Surv.m-CRA の臨床化実現

m-CRA と癌幹細胞のオリジナルの基盤技術の開発

「癌幹細胞への分化誘導による悪性化除去」の新規遺伝子治療法戦略の開発
癌幹細胞を真に同定し標的治療できる完全オリジナルの m-CRA ベクターの開発

B . 研究方法

*** 基本的には前年度と同様の研究の発展である。下記に主な方法を記載し、各研究者の報告に詳細を記す**

Surv.m-CRAの臨床応用（小賤研究室）
三次がん（一～二期）で開発したSurv.m-CRAの臨床試験（医師主導治験）の実現を目指す。

m-CRAと癌幹細胞のオリジナルの基盤技術の開発

- (i) X分子依存性m-CRA(X.m-CRA)の開発（小賤研究室）：癌で高発現するX分子に注目して開発して基本性能まで確認したX.m-CRAを、臨床応用化の有用性を検証していく。
- (ii) CD9 shRNA m-CRA癌治療（小賤研究室）：不妊的作用以外には機能未知だったY分子が、血管新生作用に必須の分子であることを見出した。Y shRNA搭載のSurv.m-CRA等で新規治療法を開発する。
- (iii) 癌幹細胞分離技術の開発：グリオーマ（近藤、國貞）と横紋筋肉腫（瀬戸口）の幹細胞分離法を確立している。さらに新規マーカーや、その分子メカニズムを解明し、治療法開発に繋げる。またこれらの成果を新規のm-CRA癌治療にも応用開発していく。
- (iv) 糖鎖ナノテクノロジーによる新技術（隅田）：分離濃縮した癌幹細胞の糖鎖チップ解析で癌幹細胞特異化の表面分子を見だし、ウイルス濃縮法を確立する。最終的にはm-CRAのターゲット技術に応用する。

「癌幹細胞への分化誘導により悪性化除去」という新たな遺伝子治療法戦略の開発（近藤、小賤）

ある分子の強発現で癌幹細胞の腫瘍形成能を阻止できることを見いだした。これを新たな遺伝子治療に応用する。

癌幹細胞を真に同定し標的治療できる完全オリジナルのm-CRAベクターの開発

癌幹細胞を標的する候補プロモーターでウイルス増殖制御されるm-CRAを開発し、癌幹細胞へのターゲット治療効果を検証する。

癌と正常幹細胞からの新規標的機構と分子の解明

癌幹細胞だけでなく、正常幹細胞であるES/iPS細胞から、癌幹細胞の生物学的メカニズムを解明していく。その成果を最終的に治療法開発に応用する。

C . 研究結果

独自開発の m-CRA（多因子で癌特異化する増殖制御型アデノウイルスベクター）作製技術を基盤に、独創的な癌幹細胞の同定・標的治療技術の開発を目的としている。分担研究者の癌幹細胞と癌悪性化に関するオリジナルの研究成果を主任研究者らの m-CRA ベクターに応用し、また糖鎖技術からのベクター技術の改良開発という連携した研究体制で、以下の成果を上げてきた。昨年度から継続内容であるが、本年度発展した部分を中心に書く。

- 1) 第三次対がん厚生労働科研等にて開発した基盤 m-CRA 技術（日米欧にて特許取得）による第一弾医薬候補の Survivin 反応性 m-CRA（Surv.m-CRA）（米国特許取得）に関し、この技術分野での本邦初の医師主導治験の準備（GMP 製造、GLP 基準の非臨床試験、PMDA 事前相談等）を進めた。平成 27 年度の医師主導治験開始のスケジュールに沿って、バイオディストリビューションスタディ、単回投与毒性試験、GMP 製造と品質試験など順調に進めることができた。昨年から進めていたものが、計画通り今年もさらに進捗しており、平成 27 年度に医師主導治験が開始できる見込みである。

また合わせて実施大学となる本学の革新医薬の治験実施への体制整備も進めた。

- 2) 難治の原因の癌幹細胞の治療に対する m-CRA 戦略の有効性を調べる研究は、さらに詳細に解析し進めている。まず上記のように治験を計画している Surv.m-CRA では、癌幹細胞分画では Survivin の内因性発現のさらなる増加、Survivin promoter 活性の上昇が有意に認められ、Surv.m-CRA の治療効果のさらなる増強という事実を、詳細な in vitro と in vivo の実験で実証できた。従来の治療法（抗癌剤、放射線など）は悪性化の高い癌細胞（癌幹細胞）では治療効果が無効になるのとは逆のベクトルで、Surv.m-CRA は全分画に治療効果があるだけでなく、「悪性化が増せばむしろ治療効

果が増加する」という結果は従来の治療法に対する優位性として、この臨床開発を推進できる成果である。

さらに、「m-CRA は、癌一般で、癌全分画を殺傷できる上に、癌幹細胞はさらに強力に殺傷できるか」ということを検証するため、この Surv.m-CRA、あるいは新型の m-CRA で、他のマーカーで他の組織形の癌幹細胞に対する治療効果を同様の方法で検証した。この結果、やはり m-CRA は癌の全分画を効率よく殺傷できるだけでなく、癌幹細胞では治療効果が増強する、という、好ましい結果が得られた。

3) Surv.m-CRA の全癌分画への治療面での有用性とは別の観点で、癌幹細胞を標的治療する試みとして、癌幹細胞で高発現するある分子 X に反応して増殖制御する m-CRA の開発を行って来た。初年度、2年目まで、X 遺伝子プロモーターの活性と癌幹細胞特異性を明らかにし、実際に X 反応性 m-CRA を作製し、解析を行い、癌幹細胞分画を特異的に治療できる *in vitro* データを一部得た。昨年度は特に、癌幹細胞特異性の点でさらに実験を重ねて詳細に検証し、また *in vivo* 動物モデルでの治療効果の実験も進めた。本年度は、この *in vitro*, *in vivo* の両実験系で、確認実験を精力的に行った。特に癌幹細胞の特異的標的性に関しては慎重かつ、繰り返しの実験で、検証してあるところである。但し最終的な結果としては、この X.m-CRA は他の m-CRA と比較しても、*In vitro*, *in vivo* の両方で強力な治療効果を示した。

4) 遺伝子導入・発現ウイルスベクターを使った革新的な癌幹細胞の単離技術を開発している。現在の癌幹細胞の分離濃縮法はマーカー膜蛋白や Sphere 法が中心だが、癌幹細胞同定の特異性が低いこと、単離レベルではない限界がある。候補となる遺伝子プロモーターもリコンビネーションで簡単に交換可能で網羅的解析を可能とし、標的する蛍光蛋白、殺傷遺伝子(異なる3種類を用意)も搭載したベクターシステムを作製し、基盤の作製技術は完成して特許出願した。よって本年度は、ベクターに搭載する殺傷遺伝子の機能解析に進み、つまりどの治療遺伝子が癌幹細胞、あるいは正常の幹細胞(未分化)を効率よく殺傷できるか、ということの詳細な実験を進めて来た。また合わせて、癌ならび正常の幹細胞の単離に適切なプロモーターの解析も行ってきた。

また本年度は合わせて、癌用を開発したこの m-CRA 技術を、正常の幹細胞の未分化細胞に殺傷効果を示すか、詳細に調べた。

5) Hedgehog シグナルは正常な幹細胞やがん幹細胞の維持・増殖に関与していることが報告されているので骨軟部肉腫における Hedgehog シグナルの機能解析を行ってきた。近年になって、かねてより使用されていた抗がん剤である arsenic trioxide (ATO) に Hedgehog シグナル阻害作用があることが報告された。早期の臨床応用のために ATO の骨肉腫細胞に対する効果を検討した。また、欧米で基底細胞がん承認されている Hedgehog シグナル阻害薬 Vismodegib の効果を検討した。

その結果として、1)ヒト骨肉腫臨床検体・細胞株における GLI2 の発現が亢進、2)GLI2 の knock down で移動能と浸潤能は低下、3)GLI2 knock down 骨肉腫細胞株をヌードマウスに移植すると肺転移抑制、4)ATO の *in vitro* で骨肉腫細胞に投与で GLI の転写活性低下、腫瘍抑制、5)同 *in vivo* 動物モデルで ATO 投与で腫瘍増殖抑制、6) ATO, GANT61, Vismodegib を投与で骨肉腫細胞株の移動能・増殖能が低下、7)ATO, GANT61, Vismodegib の濃度を減らして併用で相乗的に骨肉腫細胞の浸潤能が低下、が得られた。

6) 試験管内で、神経幹細胞(NSC)とオリゴデンドロサイト前駆細胞を起源とするグリオブラストーマ幹細胞(mGIC)の作製に成功した。この mGIC は、10個をヌードマウス脳内に移植することによりヒト GBM と同じ病理所見を示す悪性脳腫瘍を形成する。(Hide et al, Cancer Res. 2009; Nishide et al, PLoS One 2009; Hide et al, Stem Cells 2011)。よって本年度は、新規 GIC マーカー・治療標的の同定を目的として、GIC 腫瘍形成能を関与する新規 miRNA 群の同定を試みた。

その結果として、2種類の mGIC、3種類の hGIC、2種類のヒト GBM 細胞株、ヒトとマウス NSC に発現している miRNA の網羅的な解析を行い、候補 miRNA 群を同定した。GBM における機能が報告されていない GIC-miRNA1 について検討を進めた結果、それが腫瘍抑制因子として機能することを発見した。更に、GIC-miRNA1 の標的因子が細胞外

マトリックスのリモデリング制御因子であることも明らかにした。これらの結果から、GIC-miRNA の強制発現やその誘導が新規 GBM 治療法となることを示した。

- 7) 癌と正常の幹細胞の共通点と相違点からの分子機構解明という観点から、iPS 細胞の研究も進めている。本年度は特に、DLX4 を OCT3/4, SOX2 とともに歯髄細胞に導入したところ (OSD)、c-MYC、KLF4 無しでも iPS 細胞が誘導できるという結果を得た。また、KLF4 を加えることによって、さらなる誘導効率の上昇が観察された。また、遺伝子以外に、リプログラミング処理中の酸素濃度が iPS 細胞の誘導効率に大きく影響することを DPSC を用いて明らかにし、国際誌に発表した。

さらに市販の無血清培地をスクリーニングして、LONZA 者の MSCGM-CD が、歯髄細胞培養に利用できることを明らかにした。そこで、無血清で樹立した歯髄細胞から、ゲノムへの組み込みとそれに伴う発がんリスクの少ないセンダイウイルスベクターを利用した。CytoTune-iPS(DNAVEC)を用いて、iPS 細胞を誘導したところ、十分な数の iPS 細胞クローンを得られ、さらにこれらの iPS 細胞は従来の方法と遜色ない分化能力を示した。

- 8) ウイルスベクターへ結合する糖鎖を同定し、糖鎖固定化ナノ粒子にて、アデノウイルスベクターの高効率かつ簡便な濃縮法を開発している。本年度は関連して、糖鎖または、特異糖鎖へ結合する一本鎖抗体を固定化した蛍光性ナノ粒子の開発を行っている。本年度は、中性糖を固定化した蛍光性ナノ粒子を 10 種類、また成人 T 細胞白血病患者から樹立した S 1 T 細胞に特異的に結合する一本鎖抗体 S1TSCFr3-1 を固定化した蛍光性ナノ粒子を調整し、各種培養細胞への結合性を検討した。

結果として、半導体金属に直接 His タグの親和性で固定化した scFv-FNP **4b** の S1T 細胞に対する結合性は、細胞への結合性において再現性が得られなかった。scFv-FNP **4a** も同様であった。この結果から、FNP 上の scFv は非特異的に脱着していると考えられる。一方、NTA、ニッケル、

His タグを介して固定化した scFv-FNP **5a**、**5b** では、FACS 解析と共焦点顕微鏡による蛍光観察により、再現性よく、S1T 細胞に結合性を示し、非 ATL 細胞である CEM 細胞には結合性を示さなかった。このことから、NTA-ニッケル-His タグ結合を介することによって、強固に FNP 上に固定化されており、また、scFv の方向性も規定されて抗原を認識できていると考えられる。

D . 考察

各研究項目に関する意義と発展性は各研究者の項に記載した。

本プロジェクトは、癌幹細胞を標的治療する m-CRAを開発するという最終的な目標に向かって、連携して研究を進めてきた。

最終年度となる本年度は、m-CRAの医師主導治験実現を強力に進めることができ(平成27年度開始予定)さらにm-CRA技術での革新的な癌幹細胞治療法開発に繋がる各成果を上げることができた。今後は第一弾のSurv.m-CRAの治験で安全性と治療効果を確認するのに加え、癌幹細胞への効果もヒトで検証していきたい。またさらに各技術については、今後も継続発展して研究を進め、実用化に向かいたい。

E . 結論

各成果の結論は、各分担研究者の報告に記載した。

総合的な結論として、m-CRA の医師主導治験実現を強力に進めることができ、さらに m-CRA 技術での革新的な癌幹細胞治療法開発に繋がる各成果を上げることができた。

F . 健康危険情報

特になし。

G . 研究発表 (主任研究者のみ)

1.論文発表

1. 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
2. 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

2.学会発表

1. 小賤健一郎：新しい遺伝子治療ウイルスベクターの開発と基礎・臨床への応用。(国内・ランチョンセミナー)第91回日本生理学会大会、2014年3月16日(鹿児島)
 2. 三井薫、高橋知之、井手佳菜子、小賤健一郎：アデノウイルスベクターでのヒト多能性幹細胞への効率的遺伝子導入技術の開発。(国内・ポスター)第13回日本再生医療学会総会、2014年3月4-6日(京都)
 3. 井手佳菜子、三井薫、小賤健一郎：多能性幹細胞の再生医療応用における新規腫瘍化阻止技術の開発(1)ヒトES細胞での検証。(国内・口頭発表)第7回桜ヶ丘地区基礎系研究発表会、2014年1月16日(鹿児島)
 4. 松下洋平、井手佳菜子、三井薫、小賤健一郎：多能性幹細胞の再生医療応用における新規腫瘍化阻止技術の開発(2)マウスES細胞での検証。(国内・口頭発表)第7回桜ヶ丘地区基礎系研究発表会、2014年1月16日(鹿児島)
 5. 小賤健一郎：癌を標的治療する増殖型アデノウイルスの独自技術開発と臨床応用への展望。鹿児島がんフォーラム 2013年11月30日(鹿児島)
 6. 宮崎 優美、王 宇清、三井 薫、丁 強、政 幸一郎、松原 修一郎、小賤 健一郎、高尾 尊身：Immunohistochemical comparative analysis of the sphere cells of CD133-positive pancreatic cancer cells with iPS cells. CD133+膵がん Sphere 形成細胞とiPS細胞の免疫組織学的比較解析。第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3-5日(横浜)
 7. 小賤健一郎：革新的ながん治療薬(癌だけを殺すウイルス)の開発と臨床応用に向けて。鹿児島大学公開講座 2013年7月27日(鹿児島)
- 出願人：鹿児島大学
国内出願：2014年1月14日
(特願 2014-004262)
2. 増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法及びその作製用キット
発明者：小賤健一郎、永野聡
出願人：小賤健一郎(国内)；財団法人 名古屋産業科学研究所(中部 TLO)(米、欧)
国内出願：2003年7月31日
(特願 2003-283427)
【国内特許取得】 2010年3月26日
(特許第 4478775号)
国際出願：2004年7月26日
(PCT/JP2004/010998)
【米国特許取得】2011年10月11日
(特許番号：US 8,034,589 B2)
【欧州特許取得】2013年11月20日
(特許番号：EP 1662004)
JST 特許支援事業(採択)により欧州に指定
国移行中
 3. 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
出願人：鹿児島大学
国内出願：2011年3月25日
(特願 2011-068530)
国際出願：2012年3月23日
(PCT/JP2012/002031)
米国出願：2013年9月24日(US 14/007,227)
 4. 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
出願人：鹿児島大学
国内出願：2010年9月30日
(特願 2010-223150)
国際出願：2011年9月29日
(PCT/JP2011/72357)
米国出願：2013年7月5日(US 13/876,916)

H . 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許出願・取得
 1. 幹細胞における腫瘍化原因細胞の新たな標識法と治療法
発明者：小賤健一郎、三井薫、井手佳菜子

2. 実用新案登録
3. その他