

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

腫瘍溶解アデノウイルスの効果と安全性を強化するためには、腫瘍標的化能を強化する必要がある。我々は、膵がん標的リガンド（SYENFSA）を、サバイビンプロモーターにより増殖を制御する腫瘍溶解アデノウイルス（AdSur）に組み合わせた膵がん標的腫瘍溶解ウイルス（AdSur-SYE）を開発し、その腫瘍溶解効果をヒト膵がん切除標本を用いて検討した。ヒト外科切除標本を細切しシングルセル化した膵がん細胞とマウス胎児繊維芽細胞を共培養して AdSur-SYE を感染すると、腫瘍溶解効果は AdSur と比較して著明に増強しており、臨床応用に資するベクターであることを示した。また、特定の腫瘍細胞表面に発現する分子特異的に感染するベクターを開発するモデルケースとして、“Trop2(Tumor-associated calcium signal transducer2)”を標的とする Ad ベクターの開発を行った。Trop2 発現細胞で多種多様なリガンドをファイバー上に提示する Ad ライブラリーをスクリーニングすることにより、Trop2 発現細胞に対して 3 倍程度感染効率を上げる配列を同定することに成功した。

A. 研究目的

革新的がん治療薬として大きな期待が寄せられている腫瘍溶解ウイルス療法には、効果と安全性を高めるために、ウイルスの自然の感染域を抑制し、一方で、溶解効果は腫瘍への感染力に依存するので、腫瘍に対する標的特異性を高める技術の開発が必要である。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、膵がん細胞をスクリーニングし、膵がん標的リガンド（SYENFSA）を同定することに成功した。ついで、サバイビンプロモーターにより増殖を制御する腫瘍溶解アデノウイルス（AdSur）に、この膵がん標的配列を組み合わせた膵がん標的腫瘍溶解ウイルス（AdSur-SYE）を構築した。これまで検討では、動物モデルにおいて、この AdSur-SYE を腫瘍内に注入した場合に腫瘍溶解効果が増強することと、各種臓器へのウイルスの異所性感染が抑制されることを明らかとした。また、ヒト膵がん外科切除標本を用いて、AdSur-SYE がヒト膵がん組織においても感染効率を 6 倍程度向上させることを示した。本年度は、さらに、このヒト膵がん検体を用いて AdSur-SYE が実際に腫瘍溶解効果を増強できるのかどうか検討した。

膵がん標的リガンド（SYENFSA）は、ヒト膵がん細胞株 AsPC-1 に対して Ad ライブラリーをスクリーニングして同定した配列であり、その感染

受容体は明らかとなっていない。一方、標的する細胞表面分子あらかじめを決めておき、その標的ベクターを探索・同定するスクリーニング系の開発は重要である。そこで、特定の腫瘍細胞表面に発現する分子特異的に感染するベクターを開発するモデルケースとして、分担研究者の内田宏昭博士らに提示された、膵がんなど消化器がんでは特異的に発現が増強している分子 Trop2 に対する標的 Ad ベクターの開発を試みた。

B. 研究方法

B-1. 膵がん標的腫瘍溶解 Ad ベクターの構築

分担研究者である田川雅敏博士との連携のもと、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、膵がん標的化リガンド（SYENFSA）を提示する標的化腫瘍溶解ウイルス（AdSur-SYE）を構築した。これらのウイルスは、欠失した E3 領域に EGFP 発現カセットが挿入されており、感染した細胞は EGFP 陽性となる。また、AdSur と AdSur-SYE では、ファイバーノブにおいて自然の感染受容体であるコクサッキーウイルス・アデノウイルス受容体（CAR）との結合部に 4 か所の点突然変異が挿入され、CAR との結合は野生型と比べて抑制は 100 分の 1 以下に抑制されている。

B-2. ヒト膵がん外科切除標本での膵がん標的化腫瘍溶解アデノウイルスの腫瘍溶解効果の検討

ヒト膵がん(4例)の外科切除標本を細切してシングルセル化した後、96well dishで、 1×10^4 の膵がん細胞を 1×10^4 のマウス胎児性繊維芽細胞(MEF:mouse embryonic fibroblasts)と共培養し、AdSur、AdSur-SYE、非自己増殖型AdベクターAd Δ E1-AP及び野生型のファイバーと野生型のE1領域をもつAd-EGFPを、それぞれ 1×10^3 、 3×10^3 、 1×10^4 、 3×10^4 vp/cellで感染させた。6日後に、ArrayScan VTI HCS ReaderによりEGFP陽性細胞やMUC-1陽性細胞を観察するとともに、MTTアッセイにより細胞数を計測した。

B-3. Trop2 標的化アデノウイルスの探索

多種多様なリガンドをファイバーノブ上に提示するAdライブラリーを用いて、膵がんなどの消化器がんでは特異的に発現する細胞表面分子Trop2(Tumor-associated calcium signal transducer 2)を標的するAdベクターの探索を試みた。Trop2は、膵がんなどが特異的に発現する膜一回貫通型の糖タンパク質で、腫瘍細胞の増殖を促進する機能があり、過剰発現症例は予後が不良であることが報告されている。まず、Trop2を発現していないヒト膵がん細胞株AsPC-1に、レトロウイルスベクターを用いてヒトTrop2 cDNAを遺伝子導入したトランスフェクタントAT-5細胞を作成した。AT-5とAsPC-1細胞に、それぞれAdライブラリーを感染させ、数日後にcell lysateを回収して、同じ細胞に感染するといった過程を3回行った。最終的に粗ウイルス液からDNAを抽出して、Adのファイバー上に提示されている配列をシーケンス解析した。

(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。ヒト外科切除標本の利用にあたっては、「疫学研究に関する倫理指針」を遵守し試料等提供者の人権とプライバシーを保障しつつ研究を進めた。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. 標的化腫瘍溶解ウイルスの腫瘍溶解効果の増強

ヒト膵がん外科切除標本4例をシングルセル化しMEFと共培養して、各種ウイルス(AdSur-SYE, AdSur, Ad Δ E1-AP, Ad-EGFP)を感染させて6日後に細胞数を検討した。まず、ウイルス非感染細胞の免疫染色により、MEFの周囲

にMUC-1陽性細胞が集簇して増殖しており、MEFとの共培養でヒト膵がん細胞が6日以上生存することが分かった(図1A)。また、ウイルス感染細胞では、EGFP陽性細胞数は、AdSur-SYEのほうがAdSurよりも明らかに多く、Ad-Sur-SYEの感染効率が高いことが明らかとなった(図1B)。また多くのEGFP陽性細胞はMUC-1陽性であり、膵がん細胞に感染していることが明らかとなった(図1C)。細胞数に関しては、4例ともAdSur-SYEのほうがAdSurよりも明らかに細胞数が少なく、腫瘍溶解効果が著明に増強されていることが明らかとなった。AdSur-SYEの腫瘍溶解効果は、野生型のファイバーと野生型のE1領域をもつAd-EGFPと比べても同等以上であった(図1D)。

C-2. Trop2 標的アデノウイルスの同定

AT-5細胞と親株のAsPC-1細胞を用いて、Adライブラリーをスクリーニングし、アデノウイルスのファイバーノブ上に提示されている配列を解析した。AsPC-1細胞に感染する配列は両細胞に共通に出現し、Trop2細胞を認識する配列はAT-5細胞にのみ検出されると考えられた。得られた配列についてAT-5とAsPC-1細胞を比較したところ、AT-5細胞にのみ認められる1種類の配列が同定できた。ついで、この配列をファイバー上に提示するAdベクターを構築して、AT-5とAsPC-1細胞に同量ずつ感染させて、ルシフェラーゼアッセイを行うと、AT-5細胞のほうが、約3倍程度感染効率が上がっており、Trop2を標的していると考えられた。

D. 考察

本研究により、ヒト膵がんサンプルにおいても、膵がん標的化腫瘍溶解ウイルスAdSur-SYEが、非標的化ウイルスと比較して、腫瘍溶解効果が強く増強されること、が確認でき、腫瘍溶解ウイルスに標的性を付加する有用性を明らかにすることができた。本AdSur-SYEの臨床応用を図る上での根拠を得ることができたものと考えられる。

また、分子標的ベクターを開発するために、Trop2標的Adベクターの探索を行ったところ、Trop2発現トランスフェクタント特異的な配列が認められ、親株と比較して感染効率も上昇していたことより、Trop2標的ベクターが同定できたものと考えられた。感染効率や標的性の検討をさらに進め、臨床応用が可能であるかヒト臨床検体での検証も行う予定である。

今後は、他のがん腫、特に悪性中皮腫などに対する腫瘍標的ベクターを探索・開発し、分担

研究者田川雅敏博士が臨床試験を開始しようとしている悪性中皮腫に対する Ad-NK4 による遺伝子治療に組み合わせて、標的ベクターによる中皮腫に対する新たな治療戦略の開発に発展させる。

E. 結論

- 1) 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 ベクターの腫瘍溶解効果の強化が可能であることを、ヒト膵がん切除標本で示した。
- 2) Ad ライブラリーのスクリーニングにより、膵がん等の消化器がん特異的に発現する Trop2 を標的するベクターを同定した。今後、種々のがん特異的抗原を標的するベクターの開発に役立てることができる。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Terracina KP, Aoyagi T, Huang W, Nagahashi M, Yamada A, Aoki K, Takabe K. Development of a metastatic murine colon cancer model. **J Surg Res** (in press)
- 2) Narumi K, Miyakawa R, Ueda R, Hashimoto H, Yamamoto Y, Yoshida T, Aoki K. Pro-inflammatory proteins S100A8/S100A9 activate natural killer cells via interaction with a receptor of advanced glycation endproduct. **J Immunol** (in press)
- 3) Hashimoto H, Ueda R, Narumi K, Heike Y, Yoshida T, Aoki K. Type I IFN gene delivery suppresses regulatory T cells within tumors. **Cancer Gene Ther** 21:532-41, 2014.
- 4) Yamamoto Y, Hiraoka N, Goto N, Rin Y, Miura K, Narumi K, Uchida H, Tagawa M, Aoki K. A targeting ligand enhances infectivity and cytotoxicity of an oncolytic adenovirus in human pancreatic cancer tissues. **J Control Release** 192, 284-93, 2014.
- 5) Inagawa Y, Yamada K, Yugawa Y, Ohno S, Hiraoka N, Esaki M, Shibata T, Aoki K, Saya Y, Kiyono T. A human cancer xenograft model utilizing normal pancreatic duct epithelial cells conditionally transformed with defined oncogenes. **Carcinogenesis** 35; 1840-1846, 2014.
- 6) Yamamoto Y, Goto N, Miura K, Narumi K, Ohnami S, Ushida H, Miura Y, Yamamoto M, Aoki K. Development of a novel efficient method to construct an adenovirus library

displaying random peptides on the fiber knob. **Mol Pharmaceutics** 11; 1069-1074, 2014.

- 7) Aida K, Miyakawa R, Suzuki K, Narumi K, Udagawa T, Yamamoto Y, Chikaraishi T, Yoshida T, Aoki K. Suppression of Tregs by anti-GITR antibody enhances the antitumor immunity of IFN- α gene therapy for pancreatic cancer. **Cancer Sci** 105; 159-167, 2014.

学会発表

- 1) Yamamoto Y, Hiraoka N, Rin Y, Miura K, Narumi K, Tagawa M, Aoki K. A targeting ligand enhances infectivity and cytotoxicity of an oncolytic adenovirus in human pancreatic cancer specimens. 第 19 回日本遺伝子治療学会学術集会. August 6-8, 2014.
- 2) Yamamoto Y, Rin Y, Goto N, Miura K, Hiraoka N, Tagawa M, Aoki K. A cancer-targeting ligand strongly enhances cytotoxic activity of oncolytic adenovirus in human pancreatic cancer tissues. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、9 月 25-27 日、2014 年.
- 3) Rin Y, Yamamoto Y, Goto N, Hiraoka N, Aoki K. Pancreatic cancer-targeting ligands isolated by a peptide-displaying library enhance adenoviral infectivity in human pancreatic cancer tissues. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、9 月 25-27 日、2014 年.
- 4) Narumi K, Ueda R, Hashimoto H, Yoshida T, Aoki K. Pro-inflammatory proteins S100A8/A9 activate NK cells via interaction with RAGE. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、9 月 25-27 日、2014 年.
- 5) Hashimoto H, Ueda R, Rin Y, Narumi K, Yoshida T, Aoki K. Intratumoral type I IFN gene transfer decreases regulatory T cells. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、9 月 25-27 日、2014 年.
- 6) Miyakawa R, Narumi K, Ueda R, Hashimoto H, Aoki K. Intratumoral delivery of GITR antibody induces a stronger antitumor immunity than systemic injection. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、9 月 25-27 日、2014 年.
- 7) Ikegami D, Tasaki Y, Suzuki M, Uezono Y, Aoki K, Narita M. Changes in the anti-tumor immune response by controlling the hypothalamic POMC neuron activity using optogenetic techniques. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、9 月 25-27 日、2014 年.
- 8) Ueda R, Narumi K, Miyakawa R, Hashimoto H, Aoki K. Natural killer cell-mediated antitumor effect of syngeneic hematopoietic stem cell transplantation. American Society of Hematology Annual Meeting. December 5-9,

2014 (San Francisco).

H. 知的財産権の出願・登録状況
特許取得状況
特になし

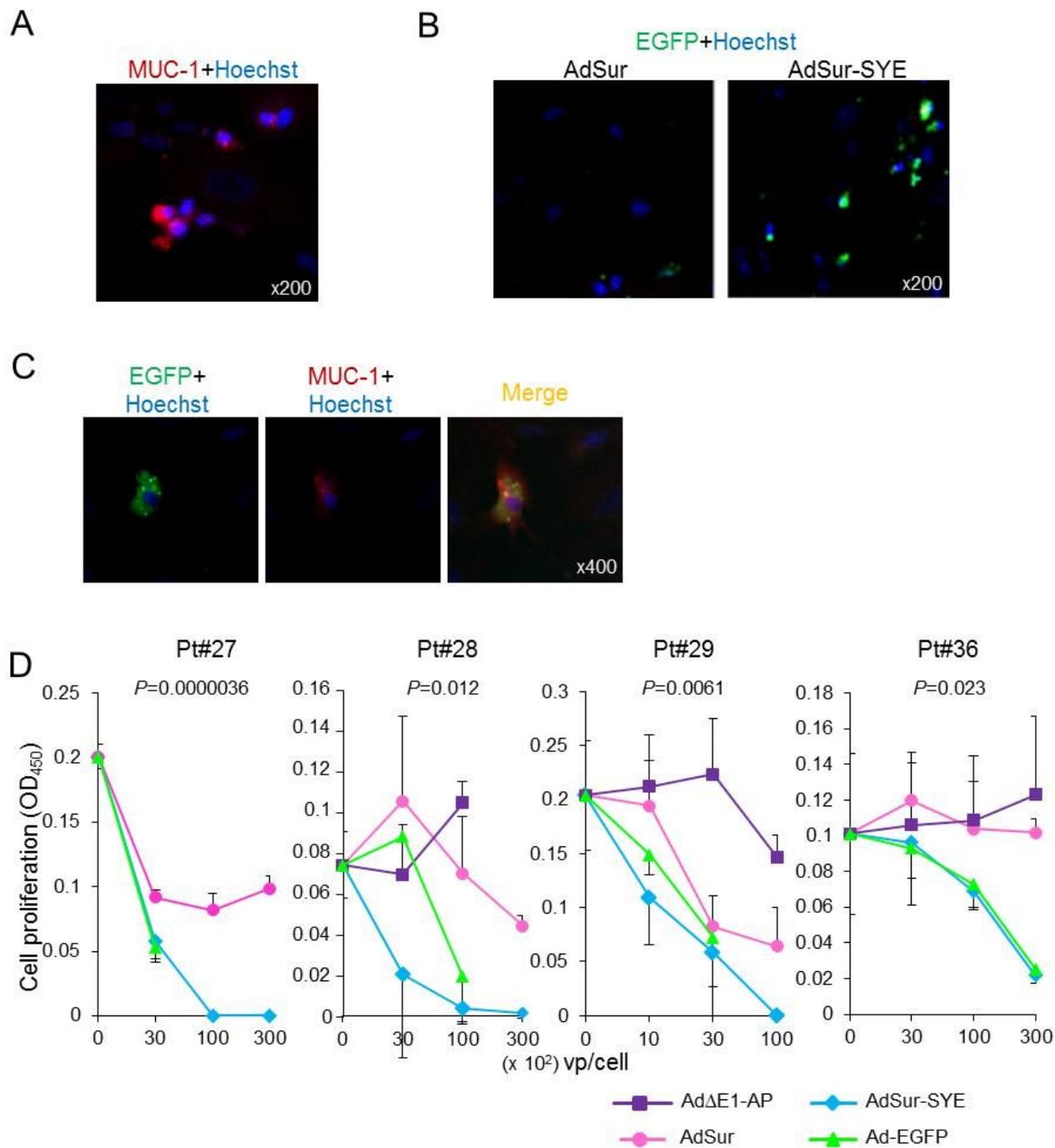


図1 ヒト膵がん切除標本におけるAdSur-SYEの腫瘍溶解効果

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

腫瘍溶解性アデノウイルスによる細胞障害活性は、ウイルス増殖によるものであるが、その詳細についてはあまり明確ではなく、感染した細胞によって異なると考えられる。本研究の標的である難治性の膵がんは多くの症例で、p53 遺伝子が変異または欠損していることが多く、また悪性中皮腫は p53 経路の上流が 70 - 80% 欠損しているため、機能的に p53 経路が失活状態にある。ともに、p53 遺伝子を発現させると、細胞死が誘導されることから、p53 経路の活性化が腫瘍溶解性ウイルスの細胞死誘導にどのような影響を与えるかどうかを検討した。その結果、単独の場合に比較して、Ad-p53 と腫瘍溶解性ウイルスの併用における細胞障害活性は相乗効果を示し、また *in vivo* の系においても併用効果が確認された。その分子機構を解析すると、腫瘍溶解性ウイルスは Ad-p53 による p53 発現のみならず、その経路の活性化を MDM2 分子の発現低下を介して増強し、アポトーシスを誘導する一方でオートファジーの関与は少ないと考えられた。しかし、p53 の発現自体はウイルス増殖そのものを低下させることが判明した。そこで、p53 分子の分解系を阻止する nutlin-3a や heat shock protein 90 阻害剤を用いて検討すると、確かに両者は内因性の p53 分子の増加と活性化を誘導した。次に Ad-53 による外因性の p53 分子に関して検討すると、nutlin-3a との併用は細胞障害活性等において相乗効果を示したが、heat shock protein 90 阻害剤との併用によっては、むしろ拮抗作用が生じていた。これは heat shock protein 90 分子が有するシャペロン効果によるものと推定される。本邦における腫瘍溶解性ウイルスによる臨床研究は、その実施症例が少ないことから、まず悪性中皮腫を対象に非増殖性アデノウイルスによる臨床研究を企画し、現在実施に向けてすべての準備を終えて、患者のリクルートに入っている。

A. 研究目的

現在の薬物治療の治療成績の向上のために、各腫瘍の特性を個別化し、それに応じて標的化医薬を使用することが大きな方向性の一つになっている。したがって、各腫瘍における主たるシグナル異常をバイオマーカーとして用い、この経路を制御することに研究の主眼が置かれている。遺伝子医薬の作用機構も上記の分子標的医薬となんら変わる点がなく、特定の標的分子の発現を制御することによって、直接的な細胞死を誘導しようとするものである。とりわけ、ウイルス増殖によって腫瘍の細胞死を惹起する腫瘍溶解性アデノウイルスでは、その直接的細胞死のみならず、細胞シグナル系も活性化できることから、他の阻害剤との併用も可能であり、さらにはウイルスが有するアジュバンド効果によって、抗腫瘍免疫応答も促進することが可能である。すなわち、細胞死を起こした腫瘍より漏出する腫瘍抗原分子を、抗原提示細胞が効率

的に取り込む一方、同細胞が活性化によって二次的な抗腫瘍免疫応答の誘導が可能となる。この免疫応答の活性化は、従来の抗がん剤や放射線治療などが有する免疫抑制作用と一線を画し、当該ウイルスによる治療の優れた点である。さらに遺伝子医薬は従来の医薬品とは異なる細胞死の機構を有していることから、従来の抗がん剤等の併用や、他の治療法の補完作用を有すると考えられる。

腫瘍溶解性ウイルスは、中国市場において医薬品として上市され、欧米を中心に臨床試験が実施されてきている。これらの臨床試験の成績は、単独使用で抗がん剤耐性となった患者を対象にしているため、特段の治療効果を示してはいない。しかし、当該患者に対してすべての症例ではないにしても、他の抗がん剤と比較してもある一定レベル以上の抗腫瘍効果を示している例がある。最近では免疫抑制状態を解除するため、制御性 T 細胞等をはじめとする細胞集団の

機能を抑制する抗体群との併用が盛んに研究されている。これは当該ウイルスの持つ免疫応答作用の性質を考慮すれば、合理的な選択といえる。

残念なことに、本邦における遺伝子医薬の臨床研究は、諸外国に比較して著しく立ち遅れており、国際競争力を完全に失っている状況が続いている。これは承認された遺伝子医薬が諸外国でも少なく、開発リスクを本邦製薬企業、ベンチャー企業が負担しきれない点にあると考えられる。そこで、先行している諸外国に追いつくためには、予後不良な腫瘍に絞り込み、それに特化した形でベクター開発を進めることが良い方法ではないかと思われる。その点では、膵がん、悪性中皮腫がまさにその対象疾患の候補である。一方で、臨床研究を推進することによって、安全性の実証することによって、他の薬剤にはない遺伝子医薬特有の法的規制面での改善を推し進めることも必要である。

本年度は、腫瘍溶解性ウイルスによる細胞死の増強を目的に p53 経路が果たす役割について解析し、細胞死に影響を与える因子の一つとして検討した。膵がんでは多くの症例で p53 遺伝子に変異しており、p53 経路の活性化が期待できない。また悪性中皮腫では、p53 遺伝子の上流に位置する INK4a/ARF 領域が 70 から 80% の臨床症例で欠損しており、結果的に p53 経路が機能的に欠損状態となっている。したがって、これらの難治性腫瘍に対する腫瘍溶解性ウイルスの細胞傷害活性を検討するうえで、p53 経路の検討は重要と考えられる。また、p53 分子は主にユビキチン化を受けて分解されるが、この経路を薬剤等によって変化させることによって、p53 経路の活性化が可能となりうる。さらに、悪性中皮腫を対象に臨床研究を実施するが、前臨床試験を終了させて、現在その実施に向けて具体的な準備を進めている。

B. 研究方法

B-1. 細胞傷害活性と細胞周期の検討

細胞増殖機能は WST-8 試薬（和光純薬）を使用したミトコンドリアの活性を測定する手法（WST アッセイ）で検討した。未処理の細胞の吸光度（450 nm）を 100% とし、薬剤等処理群の測定値との割合で、細胞傷害活性を算出した。細胞周期の検討は、感染細胞等を 70% のエタノールで固定後、RNase（50 $\mu\text{g/ml}$ ）で処理し、propidium iodide (PI, 50 $\mu\text{g/ml}$) で染色後、FACSCalibur（解析ソフト CellQuest、BD, USA）を用いて解析した。

B-2. 相乗効果の検討

複数の薬剤の作用の解析については CalcuSyn ソフト（Biosoft, UK）を使用した。このソフトでは、対象となる薬剤による細胞増殖抑制レベルの各測定時点（Fa, fractions affected）において、相対的な WST アッセイの曲線の傾きを算出してこれを combination index として当該ソフトで算出した。同 index が 1 以下であれば相乗効果と判定し、1 以上は拮抗作用と判定した。

B-3. アデノウイルスの作製

本研究で使用したアデノウイルスはすでに作製済みである。腫瘍溶解性ウイルスに関しては E1 領域の転写調節領域を、アデノウイルス固有のものから、約 600bp のヒト遺伝子 midkine (MK) あるいは survivin (Sur) 由来の 5' 側転写調節領域で置換しており (Ad-MK あるいは Ad-Sur)、p53 遺伝子、mda-7 遺伝子を発現する非増殖性アデノウイルスベクター (Ad-p53, Ad-mda-7) は、市販のキットを使用して作製している。これらのベクターは基本的にはタイプ 5 型ではあるが、併用実験においては、タイプ 35 型ベクターとファイバー・ノブ領域を置換したベクターを使用した。これは、同じタイプ同士のウイルスでは受容体との結合をめぐって競合がおり、感染効率が低下するのを回避するためにである。

B-4. ウェスタンブロット法

方法は通常の方法で実施し、蛍光は ECL system (GE Healthcare, UK) を用いて発色させた。抗体は、caspase-3, cleaved caspase-3, caspase-8, cleaved caspase-8, caspase-9, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), Beclin-1, Atg5, LC3A/B 等 (Cell Signaling, Danvers, USA) 目的に応じて適切に選択して使用した。

(倫理面への配慮)

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 実験等に関しては、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（大臣確認を含む）が取られおり、その上で実施している。

C. 研究結果

C-1. 腫瘍溶解性ウイルスの細胞死と p53 発現の関係

アデノウイルスの増殖による細胞死の誘導は古くから知られているが、その詳細な機構については、明確な結論が得られているとは言えず、その詳細な機構は不明である。この細胞死の機序は、ウイルスが感染した細胞の遺伝的背景に

よっても異なるはずであり、特に腫瘍細胞の場合、細胞死に関わる因子は複雑である。MK あるいは Sur の転写調節領域で E1 領域遺伝子の発現を制御する腫瘍溶解性アデノウイルス、Ad-MK、Ad-Sur による細胞死は基本的にはアデノウイルスと同一であるが、標的とする腫瘍によって異なると想定される。ヒト膵がん細胞の PANC-1 細胞は p53 が変異型であり、AsPC-1 細胞の p53 遺伝子は欠損型である。まず、この細胞に上記アデノウイルスを感染させると、細胞死が誘導されるが、これをトリパンブルー染色検討すると、細胞死にいたる過程は意外と長時間を要し、感染後 5 日から 10 日かけて完全に細胞死が誘導されていた。しかし、この時 PI 染色とセルソーターによる sub-G1 分画は大体 50% 程度であり、また WST アッセイにおいても細胞の代謝能は約 20% 程度残存していた。一方 cytopathic effects は、ほとんどの細胞で観察されていた。さらに、アポトーシスの関わる遺伝子発現について検討すると、caspase-8 および-9 さらに PARP の cleavage は生じていたが、シスプラチンによる細胞死と比較すると、その活性は弱いものであった。また、Endo G 発現、truncate AIF 発現も増強せず、オートファジーのマーカーである Beclin-1, Atg5 の発現、LC3A/B I から II への変換もなかった。したがって、確かに p53 非依存的なアポトーシスは誘導されていると判断されるが、その以外の細胞死の機序は現在不明のままである。

また、この時 p53 遺伝子を発現させる非増殖型アデノウイルス (Ad-p53) を併用した場合の効果を検討した。Ad-p53 単独でも PANC-1 細胞、AsPC-1 細胞に細胞障害活性は誘導されたが、当該腫瘍溶解性アデノウイルスと併用すると、その細胞障害活性は、細胞の種類、アデノウイルスの種類を問わず相乗効果を示した。AsPC-1 細胞を使用して p53 経路の下流に関して検討すると、Ad-p53 による p53 発現は Ad-Sur との併用によって増加し、それに応じて caspase-3、PARP の cleavage が増強してはいたが、Beclin-1, Atg5 の発現は変化がなかった。このことを確認するために、annexin V 染色を行うと、Ad-p53 との併用は、Ad-p53 および Ad-Sur 単独より、優位に陽性染色細胞が増加していた。すなわち、腫瘍溶解性ウイルスの増殖はおそらく E1A 発現を解して p53 の安定性に寄与し細胞死を誘導すると考えられた。そこで p53 の分解に関わる MDM2 分子の発現を検討すると、腫瘍溶解性ウイルスとの併用によって、Ad-p53 で誘導された同分子の発現量が低下していた。一方、Ad-p53 による p53 発現が、ウイルス増殖自体に与える影響を TCID50 測定によって検討すると、Ad-Sur 単独より両者の併用のほうがむしろ低下

していた。またウエスタンブロット法により、初期応答遺伝子である E1A 発現と構造蛋白質である hexon 発現は、Ad-p53 感染後の時間経過とともに、Ad-Sur 単独よりも併用で低下していた。したがって、腫瘍溶解性ウイルスの細胞死に与える p53 の影響については、細胞障害活性に関しては相乗効果を示すが、ウイルスの増殖にはむしろ抑制する作用を示した。MDM2 抑制を介した p53 の安定化がその相乗効果の原因と考えられ、ウイルス増殖による細胞死誘導よりも、p53 経路の活性化によるアポトーシスの誘導が上回ると考えられた。

そこで、p53 変異型のヒト食道がん細胞を使用して同様な実験を行った。Ad-MK および Ad-Sur 感染によって caspase-8, -9, -3, PARP の cleavage が生じ DR5 の発現上昇、Bcl-xL の発現低下が生じており、また一部ではあるが Bid の truncation の誘導されていたことより、この場合は外因性・内因性の両方のアポトーシスが誘導されていた。しかし、Beclin-1, Atg5 の発現や LC3A/B の I から II への移行はわずかであり、オートファジーの関与は低いと判断された。Ad-p53 と併用してみると、やはり細胞の種類、腫瘍溶解性アデノウイルスの種類を問わず、誘導される細胞障害活性は相乗効果を示していた。また、両者の併用によって、in vivo における抗腫瘍効果も増強していた。さらに、p53 経路の活性化についても、Ad-MK との併用によって Ad-p53 による p53 発現の増強、p53 の Ser15, 46 残基のリン酸化、Bax, Puma, Fas 発現の増加が誘導されていた。したがって、腫瘍溶解性アデノウイルス自体では、感染細胞の p53 が変異型であるため p53 経路の活性化が起こらないものの、外来性 p53 による同経路の活性化がより強く惹起されていた。またこの時、Ad-MK, Ad-Sur のウイルス増殖能そのものは Ad-p53 感染によって低下していた。すなわち、上記のことより p53 経路が正常であること、あるいは同経路を正常化することによって、腫瘍溶解性ウイルスによる抗腫瘍効果をより強く誘導することが可能になると判断される。

C-2. 低分子化合物による p53 経路の活性化

上記によって p53 経路の活性化がウイルス増殖による細胞障害活性に重要であることが明らかになったので、この p53 経路について低分子化合物を使用した活性化について検討した。MDM2 分子は p53 蛋白質と結合し、同蛋白質のユビキチン化を促進して分解を促進することから、MDM2 と p53 結合を阻害する nutlin-3a は p53 蛋白質の分解を阻止してその増加を誘導できる。一方 MDM2 と構造が類似している MDMX 分子は p53 蛋白質と結合し、p53 分子の転写活性化を阻害

する。また、MDMX 分子の安定化にはシャペロン効果を有する heat shock protein 90 (HSP90) が関与していることから、HSP90 の阻害剤は MDMX の安定化を阻止し、その結果 p53 分子の転写活性化能を増加させる。そこで、p53 遺伝子型が野生型である悪性中皮腫細胞 (MSTO-211H、NCI-H28) を用いて、p53 発現に与える影響について検討した。Nutlin-3a は p53 蛋白質の増加とリン酸化を誘導し、標的遺伝子である p21 分子さらには Puma の発現を増加させ、アポトーシスを誘導した。HSP90 阻害剤として geldanamycin 誘導体である 17-AAG, 17-DMAG を使用して、同様な実験を行ってみると、p53 蛋白質発現増加、同蛋白質のリン酸化、p21 遺伝子の発現誘導を起こし、一方 MDMX の発現自体は低下していた。さらに AKT のリン酸化が低下しており、細胞障害活性も誘導されていた。この時、HSP90 は受容体タイプの tyrosine kinase に対してもシャペロン効果を示すため、HSP90 阻害剤は、当該 tyrosine kinase の活性化を阻害し、AKT のリン酸化を阻止したと考えられる。そこで、nutlin-3a と HSP90 阻害剤を併用し細胞障害活性を検討すると、相乗効果が誘導されていた。したがって、nutlin-3a および HSP90 阻害剤は p53 蛋白質の安定化と活性化を誘導することが可能で、Ad-p53 あるいは腫瘍溶解性ウイルスとの併用が期待できると想定された。

しかし、p53 遺伝子型の異なる細胞を用いて、細胞障害活性をさらに詳細に検討してみると、nutlin-3a は確かに p53 野生型細胞の方がより同活性を示したが、HSP90 阻害剤の場合は、同活性は全く p53 遺伝子型に依存していなかった。このことは、HSP90 阻害剤の場合は、MDMX 阻害作用に依存しない経路のよって、p53 経路が活性化することを示唆しており、HSP90 阻害剤と Ad-p53 あるいは腫瘍溶解性ウイルスとの併用は、相乗効果を誘導しない可能性があると考えられた。

C-3. Nutlin-3a と HSP90 阻害剤による Ad-p53 発現の効果

上記の点を踏まえて、まず Ad-p53 と nutlin-3a あるいは HSP90 阻害剤との併用効果を検討した。Ad-p53 を p53 遺伝子が変異型の悪性中皮腫細胞に感染させると、それ単独によって細胞傷害活性が生じたが、これに低濃度の nutlin-3a を併用することによって、同細胞傷害活性は相乗効果を示した。実際に、Ad-p53 によって生じた p53 蛋白質発現は nutlin-3a によって安定化し、さらに発現レベルが上昇していた。しかし、Ad-p53 を感染させた上記細胞に HSP90 阻害剤で処理すると、p53 蛋白質の発現がむしろ低下しており、細胞傷害活性も併用によ

り拮抗作用が観察された。より詳しく解析をすると、HSP90 阻害剤は転写レベルの p53 産生を抑制しないが、蛋白質合成が著しく傷害されていた。なお、HSP90 阻害剤によって、タイプ 5 型 Ad の受容体発現、感染効率そのものには低下はしていなかった。したがって、p53 は HSP90 のシャペロン作用のクライアント蛋白質であるため、大量の p53 が産生された場合には、HSP90 阻害剤が同作用を負に制御し、結果的にその合成速度を遅延させると想定された。

また、数多くの蛋白質が HSP90 のシャペロンのクライアント蛋白質であることから、HSP90 阻害剤は多様な作用を示す。例えば、HSP90 阻害剤は本研究によって MDA-7 蛋白質の発現を上昇させるが、この MDA-7 遺伝子を発現させる Ad-mda-7 と上記腫瘍溶解性ウイルスは、細胞傷害活性において、相乗効果を示すことを見出している。したがって、HSP90 阻害剤の作用は一樣ではなく、また一方で腫瘍溶解性ウイルスの効果の増強には、複数の候補分子があり、その分子の発現を低分子化合物等で制御することによって抗腫瘍効果を向上させることが可能であることを示唆している。

C-4. 悪性中皮腫に対する臨床研究

切除不能悪性中皮腫を対象にアデノウイルスの胸腔内投与を行う臨床研究を実施する。使用するベクターは非増殖性であるが、本邦においては胸腔内にアデノウイルスを投与した症例はないことから、まず安全性の高い非増殖性ベクターより実施する。使用するベクターは、hepatocyte growth factor (HGF) /c-Met 系を、競合的に阻害する NK4 分子の発現を可能にするアデノウイルス (Ad-NK4) で、NK4 分子による遺伝子治療は世界で最初である。既に、病棟における患者マネジメントの方法、薬剤部におけるベクターの廃棄処理、臨床試験部とのデータマネジメントの打合せと終了し、患者のリクルートに関して関連医療機関、ウェブサイトにて募集しており、またその臨床研究の内容を公開している。本研究では基本的には第一相臨床試験に相当する容量増加試験であり、安全性の検討がその主たる目的である。

D. 考察

腫瘍溶解性アデノウイルスの細胞障害活性は、アデノウイルスの増殖によるものと考えられるが、実際には感染する細胞の遺伝的背景によって異なると考えられる。これまでの報告では、アポトーシスやオートファジーなどの機構が示唆されているが、変異型 p53 遺伝子を有する腫

がんで検討するとオートファジーの関与は少なく、非 p53 経路によるアポトーシスと考えられた。一方、機能的に p53 経路が失活している悪性中皮腫では、p53 遺伝子そのものが野生型であることが多いため、腫瘍溶解性アデノウイルス感染によって E1A を介して p53 経路が活性化され、アポトーシスが主に誘導された。オートファジーは p53 発現によって抑制される傾向にあり、悪性中皮腫においては当該ウイルスによってほとんどオートファジーは誘導されていなかった。そこで、p53 を Ad-p53 で発現させ、腫瘍溶解性ウイルスとの併用効果を検討すると、ほとんどの Fa ポイントで CI が 1 以下となる相乗効果を示した。しかも、p53 経路の活性化からアポトーシスに至る経路が、増殖性ウイルスによって活性化されており、これは同ウイルスの増殖による E1A 発現が寄与したと考えられる。すなわち E1A は p53 分子の分解に関与する MDM2 分子の発現を低下させ、結果的に p53 経路が賦活化する作用があり、p53 経路は増殖性ウイルスによる細胞死に影響を与えていた。しかし、p53 経路の活性化は、増殖性ウイルスによる細胞死を増強し、感染細胞がより早期に死滅するため、結果的に産生されるウイルス量は低下した。また p53 分子の発現による細胞周期の停止も、ウイルス増殖には負に作用するはずである。

低分子化合物による p53 経路の活性化方法は、主に MDM2 と p53 分子の結合阻害によるものが多く、nutlin-3a をはじめ RITA などの化合物が検討されている。本研究では、IC50 を計算することによって、p53 遺伝子型と同薬剤の関係を検討すると、nutlin-3a は p53 遺伝子型に一致して感受性が決定されたが、HSP90 阻害剤は p53 遺伝子型とは一致しなかった。HSP90 阻害剤は、oncogenic 変異型な p53 蛋白質を減少させるため、その抗腫瘍効果に与える影響は複雑である。HSP90 は AKT のみならず MDM2 分子もクライアント蛋白であり、野生型の p53 分子に関してはその発現は増加させると考えられているが、変異型 p53 の発現減少の理由は明確ではない (Oncogene 27; 2445-2455, 2008)。また、p53 および AKT 非依存的に p21 分子の発現誘導を HSP90 阻害剤は誘導するため、増殖性アデノウイルスに与える影響は、一概には言えないようである。同阻害剤はアデノウイルスの増殖を促進するという報告があるが、本研究では予備的実験ながら、同阻害剤はウイルス増殖そのものには影響を与えてはなかった。なお、RITA についてはまだ実施例が少ないが、基本的には nutlin-3a を同じ効果を示している。

Nutlin-3a 類似体をはじめ、p53 経路の作用する薬剤、また HSP90 阻害剤類似体は、医薬品として開発が進んでいる。これらは単独において

その効果を検討されているが、膵がんや悪性中皮腫のように p53 経路が欠損した症例が多い場合は、比較的効果的と考えられており、一方でウイルス増殖による遺伝子医薬から見ても関連性が想定される。本研究で示されたように、当該遺伝子医薬の効果に p53 経路が一定の役割を果たすことは、標的細胞の遺伝的背景から当該ウイルスの効果を知る上で、p53 分子が一つのバイオマーカーになりうると考えられ、上記低分子化合物と併用は治療効果の面からよい組み合わせと考えられる。

E. 結論

難治性で p53 経路が失活している膵がんおよび悪性中皮腫を標的として、腫瘍溶解性アデノウイルスによる細胞死を検討した。その結果、p53 経路の活性化によって当該ウイルスによるアポトーシスが増強し、細胞障害活性においては相乗効果が得られた。しかし、同経路の活性化自体は、ウイルスの増殖をむしろ抑制していた。低分子薬剤を用いた p53 分子の発現上昇による、上記ウイルスの殺細胞効果の増強は、使用した薬剤によって結果が異なり、MDM2 分子と p53 分子の結合を阻害する nutlin-3a では、相乗効果を示したが、MDMX 分子と p53 分子の結合を阻害する HSP90 阻害剤では、むしろ拮抗作用を示した。腫瘍溶解性ウイルスの抗腫瘍効果に作用する分子機構の解明は、今後の遺伝子医薬の開発に大きな影響を与えるが、上記腫瘍に関しては、p53 経路の活性化は重要な要素となると考えられた。

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) Takagi-Kimura M, Yamano T, Tagawa M, Kubo S. Oncolytic virotherapy for osteosarcoma using midkine promoter-regulated adenoviruses. **Cancer Gene Ther.** 21; 126-132, 2014.
- 2) Tagawa M, Shirane K, Yu L, Sato T, Furukawa S, Mizuguchi H, Kuji R, Kawamura K, Takahashi N, Kato K, Hayakawa S, Sawada S, Furukawa K. Enhanced expression of the β 4-galactosyltransferase 2 gene impairs the mammalian tumor growth. **Cancer Gene Ther.** 21: 219-227, 2014.
- 3) Fukamachi T, Ikeda S, Saito H, Tagawa M, Kobayashi H. Expression of

- acidosis-dependent genes in human cancer nests. **Mol. Clin. Oncol.** 2: 1160-1166, 2014.
- 4) Suzuki T, Kawamura K, Li Q, Okamoto S, Tada Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Yamaguchi N, 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.
 - 5) Yamamoto Y, Hiraoka N, Goto N, Rin Y, Miura K, Narumi K, Watabe T, Tagawa M, Aoki K. A targeting ligand enhances infectivity and cytotoxicity of an oncolytic adenovirus in human pancreatic cancer tissues. **J. Control Release** 192: 284-293, 2014.
 - 6) Okamoto S, Jiang Y, Kawamura K, Shingyoji M, Tada Y, Sekine I, Takiguchi Y, Tatsumi K, Kobayashi H, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M. Zoledronic acid induces apoptosis and S-phase arrest in mesothelioma through inhibiting Rab family proteins and topoisomerase II actions. **Cell Death Dis.** 2014 Nov 13;5:e1517.
 - 7) Zhong B, Ma G, Sato A, Shimozato O, Liu H, Li Q, Shingyoji M, Tada Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M. Fas ligand DNA enhances a vaccination effect by coadministered DNA encoding a tumor antigen through augmenting production of antibody against the tumor antigen. **J Immunol Res.** Volume 2015, Article ID 743828,
 - 8) Li Q, Sato A, Shimozato O, Shingyoji M, Tada Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M. Administration of DNA encoding the interleukin-27 gene augments anti-tumor responses through non-adaptive immunity. **Scand J Immunol.** (in press).
 - 9) Ma G, Zhong B, Okamoto S, Jiang Y, Kawamura K, Liu H, Li Q, Shingyoji M, Sekine I, Tada Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M. A combinatory use of adenoviruses expressing melanoma differentiation-associated gene-7 and replication-competent adenoviruses produces synergistic effects on pancreatic carcinoma cells. **Tumor Biol** (in press).
- Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K. A small molecule that inhibits p53 degradation influences cytotoxicity of Ad-p53 in INK4A/ARF-defective mesothelioma with wild-type p53 gene. 17th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, May 21-24, 2014, Washington DC. (May 22, 2014)
- 3) Tagawa M, Chai K, Okamoto S, Kawamura K, Li Z, Jiang Y, Yamaguchi N, Shingyoji M, Tada Y, Sekine I, Takiguchi Y, Tatsumi K, Kubo S, Shimada H, Hiroshima K. An agent influencing p53 metabolism modulates Ad-p53-mediated cytotoxicity in mesothelioma bearing the wild-type p53 gene. 20th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, August 6-8, 2014, Tokyo. (August 7, 2014)
 - 4) Yamamoto Y, Hiraoka N, Rinn Y, Miura K, Narumi K, Tagawa M, Aoki K. Targeting ligand enhances infectivity and cytotoxicity of an oncolytic adenovirus in human pancreatic cancer tissues. 20th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, August 6-8, 2014, Tokyo. (August 6, 2014)
 - 5) Tagawa M, Kawamura K, Okamoto S, Shingyoji M, Sekine I, Takiguchi Y, Tada Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K. Restoration of p53 functions is a key element in gene therapy of malignant mesothelioma. International Society for Cell and Gene Therapy of Cancer 14, September 25-27, 2014, Amsterdam. (September 25, 2014)
 - 6) Tagawa M, Kawamura K, Okamoto S, Shingyoji M, Sekine I, Takiguchi Y, Tada Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K. Restoration of p53 functions is a key element in gene therapy of malignant mesothelioma. The 12th international conference of the international mesothelioma interested group, October 21-24, 2014, Cape Town. (October 23, 2014)
 - 7) Tada Y, Okamoto S, Shimazu K, Kozono T, Shingyoji M, Takiguchi Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M. Zoledronic acid induces apoptosis and S-phase arrest in mesothelioma through inhibiting Rab and topoisomerase II actions. The 12th international conference of the international mesothelioma interested group, October 21-24, 2014, Cape Town. (October 23, 2014)
 - 8) Kubo S, Takagi-Kimura M, Tagawa M. Enhanced transduction and antitumor efficiency of fiber-modified midkine promoter-regulated oncolytic adenovirus in human malignant mesothelioma. The 12th international conference of the international

学会発表

- 1) Tagawa M, Kawamura K, Okamoto S, Tada Y, Tatsumi K, Hiroshima K, Shimada H. A new therapeutic strategy for cancer with replication-competent adenoviruses powered by the midkine promoter. Third Midkine Symposium, April 21-23, 2014, Kyoto. (April 21, 2014)
- 2) Tagawa M, Kawamura K, Okamoto S, Jiang Y, Li Z, Kubo S, Shingyoji M, Tada Y, Takiguchi

- mesothelioma interested group, October 21-24, 2014, Cape Town. (October 22, 2014)
- 9) Ak G, Metintas S, Tada Y, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M, Metintaş M. Relationship of serum mesothelin and midkine levels in the diagnosis and prognosis in patients with malignant mesothelioma. The 12th international conference of the international mesothelioma interested group, October 21-24, 2014, Cape Town. (October 22, 2014)
- 10) 江媛媛、岡本慎也、李知瀚、久保秀司、関根郁夫、滝口裕一、多田裕司、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 25-27 日 (横浜市)(9 月 27 日)
- 11) 山本由姫、林洋正、後藤尚子、平岡伸介、田川雅敏、青木一教：腫瘍特異的リガンドによるヒト膵がん外科切除標本に対する腫瘍溶解ウイルスの効果の増強。A cancer-targeting ligand strongly enhances cytotoxic activity of oncolytic adenovirus in human pancreatic cancer tissues. 第 73 回日本癌学会学術総会 平成 26 年 9 月 25-27 日 (横浜市)(9 月 27 日)
- 12) 竹信尚典、下里修、藤村雄一、秋田直洋、山口陽子、力石浩志、池田英里子、田川雅敏、中川原章、古関明彦、上條岳彦：神経芽腫スフェア特異的に発現する転写因子 CDX1 は細胞の幹細胞性を制御する。Tumor sphere specific expression of transcription factor CDX1 regulates stem cell-related genes in neuroblastoma. 第 73 回日本癌学会学術総会 平成 26 年 9 月 25-27 日 (横浜市)(9 月 25 日)
- 13) 岡本慎也、江媛媛、李知瀚、久保秀司、関根郁夫、滝口裕一、多田裕司、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三、田川雅敏：Nutlin-3a と Hsp90 阻害剤による併用投与はヒト悪性中皮腫細胞に対して p53 依存的な相乗効果を示す。Combination of nutlin-3a and Hsp90 inhibitors produces p53-dependent synergism on human mesothelioma cells. 第 73 回日本癌学会学術総会 平成 26 年 9 月 25-27 日 (横浜市)(9 月 25 日)
- 14) 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 RalA 抗原に対する免疫反応。Immune response to tumor antigen, RalA, in patients with gastrointestinal cancers. 第 73 回日本癌学会学術総会 平成 26 年 9 月 25-27 日 (横浜市)(9 月 25 日)
- 15) 西山夏織、田川雅敏、長谷川慶、沼崎宗夫：IL-17A は臓器に特異的な異なった effector cell により腫瘍の転移を抑制する。IL-17A inhibits tumor metastasis using organ-specific distinct effector cells. 第 73 回日本癌学会学術総会 平成 26 年 9 月 25-27 日 (横浜市)(9 月 25 日)
- 16) 長谷川慶、田川雅敏、西山夏織、沼崎宗夫：Type III interferon 発現アデノウイルスの腫瘍組織への投与は interferon-gamma および CD8 T cell 依存性の抗癌作用を示す。Adenoviral transduction of type III interferons inhibits the tumor growth depending on the interferon- and CD8 T cells. 第 73 回日本癌学会学術総会 平成 26 年 9 月 25-27 日 (横浜市)(9 月 27 日)
- 17) 田川雅敏、多田裕司、新行内雅斗、由佐俊和、島田英昭、廣島健三、巽浩一郎：アデノウイルス製剤を用いた悪性中皮腫に対する遺伝子治療の実施にむけて。第 21 回石綿・中皮腫研究会 平成 26 年 10 月 11 日 (名古屋市)(10 月 11 日)
- 18) 多田裕司、岡本慎也、由佐俊和、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三、田川雅敏：ピスフォスフォネートによる悪性中皮腫に対する抗腫瘍効果。第 21 回石綿・中皮腫研究会 平成 26 年 10 月 11 日 (名古屋市)(10 月 11 日)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

標的ベクターに関する細胞表面分子の探索

研究分担者 内田 宏昭

東京薬科大学生命科学部・准教授（平成27年 1月31日まで）

東京大学医科学研究所・講師（平成27年 2月 1日より）

研究要旨

私たちはアデノウイルスベクターのがん標的化デリバリーに好適な表面抗原の系統的・網羅的探索を目的に、抗体結合変異型アデノウイルスを用いた抗体スクリーニングを施行した。抗原同定を完了した抗体（431 クローン）の抗原は 62 種類（重複を除く）に及んだ。本標的分子探索系に加え、抗体にタンパク合成阻害毒素を結合させたイミュノトキシン（iTox）の殺細胞効果を指標とした抗体スクリーニング系を新たに樹立し、この探索系（iTox 系）を用いた抗体スクリーニングを精力的に進めた。様々なタイプのヒトがん細胞に対する標的化抗体を選抜した結果、高い iTox 活性を有する抗体を 301 クローン樹立することに成功し、そのうち 203 クローンの抗原同定を完了した。これら 2 種類のスクリーニング法により樹立した抗体の抗原リストにはがん分子標的治療の候補分子として有望なものが高い比率で含まれており、今後の標的ベクター開発におけるターゲット分子の候補になりうると考えられた。本年度は、これらの抗体スクリーニング法に加えて新規に抗体結合変異型単純ヘルペスウイルスベクターを探索プローブに用いた抗体スクリーニング法をデザインし、その樹立に成功した。すでに 30 クローンの抗体を選抜・樹立することに成功し、その抗原の同定を進めている。

A. 研究目的

難治性がんに対する効果的な遺伝子治療・ウイルス療法の開発のためには、ベクターをがん細胞へ特異的にデリバリーできるかどうかが鍵となる。私たちは、アデノウイルスベクターのがん標的化デリバリーに好適な表面抗原の系統的・網羅的探索を目的に、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 モチーフを組み込んだファイバー変異型 Adv-FZ33 アデノウイルスを作製した。Adv-FZ33 の抗体依存的な細胞侵入を指標とした抗体スクリーニング系を樹立し、選抜された高性能抗体の抗原分子の同定を免疫沈降・質量分析にて行った。その結果、昨年度までに抗原同定を完了した 431 クローンの抗原は 62 種類（重複を除く）に及んだ。その抗原名は、Integrins, CD9, CD276, MHC class I, BSG, CEACAMs, EPCAM, CD55, SLC3A2, TFRC, CD59, Na/K-ATPases, CD46, CD47, CD109, MCAM, EPHA2, CD44, FOLH1, CD63, CSPG4, NT5E, ADAM10, PVR, IL13RA2, ALPP/ALPPL2, ICAM1, MME, ENG, ANPEP, F11R, TACSTD2 (Trop-2), CD81, TMEM2, MHC class II, ICAM3, EGFR, F3, IGF1R, L1CAM, PRNP, PTGFRN, CD151, MF12, PSCA, LYPD3, MS4A1, CD82, CD99, CDH1, SPINT1, JAM3, NCAM2, NLGN4X, PRSS8, SCARB1, THY1, ANXA2, BCAP31,

CA12, PVRL2, ALCAM であった。

Adv-FZ33 系に加え、私たちは、がん標的化抗体の新たな探索方法として、抗体にタンパク合成阻害毒素を結合させたイミュノトキシン（iTox）の殺細胞効果を指標とした抗体スクリーニング系を樹立した。ジフテリアトキシン（DT）と連鎖球菌プロテイン G 由来の抗体結合ドメイン 3C を持つ DT3C は簡便に抗体へ結合させることができ、抗体と DT3C の結合体すなわち iTox が表面抗原との結合を介してエンドサイトーシスで細胞内へ取り込まれると強力な殺細胞活性を示す。昨年度までにこの探索系（iTox 系）を用いた抗体スクリーニングを精力的に進めた結果、有望ながん標的化抗原・抗体を同定・樹立することに成功した。膀胱がん細胞株、肺がん細胞株、精巣がん細胞株、メラノーマ細胞株、白血病細胞株、食道がん細胞株、グリオーマ細胞株、肝がん細胞株、胆管がん細胞株、腎がん細胞株、骨肉腫細胞株など、合計 19 種類のヒト細胞株を免疫原とした抗体スクリーニングを行った。その結果、高い iTox 活性を呈するモノクローナル抗体を合計 301 クローン樹立することに成功した。このうち 203 クローンに対する抗原決定を完了した。抗原の種類は 36 種類（重複を除く）に及び、その中にはがん分子標的治療

の標的候補分子として有望であるものが高い比率で含まれていた。特に有望な抗原分子として TACSTD2 (Trop-2), IL13RA2, PSCA, CD276, SLC3A2, NT5E などが挙げられ、今後の標的ベクター開発における標的分子の候補になりうると考えられた。本年度はこれらの抗体スクリーニング法に加えて新規に抗体結合変異型単純ヘルペスウイルス (HSV) ベクターを探索プローブに用いた抗体スクリーニング系を確立することを目指して研究を遂行した。

B. 研究方法

右上図は抗体結合変異型単純ヘルペスウイルスの概念図である。単純ヘルペスウイルス (HSV) の細胞侵入 (エントリー) は、ウイルス外被の糖タンパク質 gD が宿主細胞表面の受容体に結合することにより成立する。gD 受容体としては HVEM および nectin-1 が報告されている。そこで私たちは gD が HVEM と nectin-1 に結合できなくなるよう gD 遺伝子に欠失および変異を施し、これに抗体の Fc 部分に結合するドメインを挿入することにより、抗体結合変異型 gD をデザインした (図)。この変異 gD を組み込んだ変異 HSV を作製し、そのウイルス学的特性を評価した。

膵がん細胞株、グリオーマ細胞株、腎がん細胞株、骨肉腫細胞株、と多彩な種類のヒトがん細胞株を用いてマウスを免疫し、抗体結合変異型 HSV の標的細胞株への感染の程度を指標として、新規の標的化抗体のスクリーニングを施行した。

抗原同定に際しては、免疫原として用いたがん細胞株または抗体が強く結合するがん細胞株の表面タンパク質をビオチンにて標識後、1% NP40 などを含む可溶化バッファーにて膜タンパク質を可溶化し、抗体と Protein G セファロースビーズの結合複合体を用いて免疫沈降を行った。沈降サンプルを SDS-PAGE により分離した後に膜転写し、認識抗原および共沈分子の分子量をアビジン-HRP 酵素を用いて決定した。その上で非標識細胞を用いた免疫沈降を行い、沈降サンプルを SDS-PAGE により分離した後に CBB 染色し、すでに決定した分子量を示すバンドをゲルより切り取り、質量分析を行った。質量分析にて予想された抗原に関しては全長の cDNA を購入または RT-PCR にてクローニングして発現プラスミドに組み込み、CHO-K1 または 293T 細胞に遺伝子導入した後、フローサイトメーターにて抗体の反応性を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究では、がんの遺伝子治療・抗体療法などに関する基礎的な検討のみを行う。すでに樹

方法: 抗体と結合可能な改変 HSV を用いて抗体をスクリーニングする

仮説

抗体結合改変 HSV を用いて抗体をスクリーニングすれば標的化 HSV に好適な抗体を得られるのでは？



立された細胞株と動物を用いて行う実験であるため、人権の保護などの問題に該当する留意事項は特になし。本研究に関連した組換え DNA 実験に関しては、課題名「抗体医薬・遺伝子治療・再生医療の基礎的研究」として、東京薬科大学で承認済みである。動物実験についても課題名「癌細胞に対するモノクローナル抗体の作製および癌の診断・治療の研究」として東京薬科大学で承認済みである。

C. 研究結果

抗体結合変異型 gD プラスミドを CHO-K1 細胞にトランスフェクションして抗 gD 抗体を用いたフローサイトメトリ解析を行った結果、変異 gD タンパク質の細胞膜表面における発現が確認された。また変異 gD 発現 CHO-K1 細胞を蛍光標識抗体とインキュベートしてフローサイトメトリ解析を行った結果、変異 gD タンパク質に抗体が結合したことによると考えられる蛍光強度の上昇が観察された。同様の実験を抗体結合ドメインの IgG との結合に参与するアミノ酸をアラニンに置換した変異体を挿入した変異 gD を用いて行ったところ、この変異 gD タンパク質は細胞膜表面に発現するにもかかわらず蛍光標識抗体と結合できないことが示された。すなわち変異 gD タンパク質はその抗体結合ドメインを介して抗体と結合することが示唆された。

そこで、HSV ゲノムに抗体結合変異型 gD 遺伝子配列を組み込むことにより抗体結合変異型 HSV を作製した。gD 受容体を発現しない CHO-K1 細胞およびこれに HVEM あるいは nectin-1 を発現させた亜株に野生型 gD をもつウイルスならびに変異ウイルスを感染させた結果、変異ウイルスの HVEM および nectin-1 を介したエントリーの効率は野生型 gD をもつウイルスと比較して著しく低下していることが示された。また、膵がん細胞などの表面に発現するがん抗原として知られる CEA-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) を発現させた CHO-K1 細胞亜株に抗 CEACAM6 抗体を結合させた変異ウイルスを感染させたところ、ウイルスのエントリーが検出された。しかしながら、抗体非存在下

においては変異ウイルスの CEACAM6 発現 CHO-K1 細胞へのエンタリーは認められなかった。以上の結果からこの抗体結合変異型 HSV は抗原および抗体の結合に依存してエンタリーすることが示唆された。

これらのウイルス学的解析の結果をふまえて、膵がん細胞株、グリオーマ細胞株、腎がん細胞株、骨肉腫細胞株を免疫原とした抗体スクリーニングを行った。その結果、抗体結合変異型 HSV の細胞侵入をサポートしうるモノクローナル抗体を合計 30 クローン樹立することに成功した。現在、その抗原の同定を進めている。

D. 考察

本年度は、新たな抗体スクリーニング法として抗体結合変異型 HSV を探索プローブとしたシステムを立ち上げた。HSV の細胞侵入のメカニズムはアデノウイルスとは大いに異なることから、前述の Adv-FZ33 系の抗体スクリーニングで選別された抗原・抗体セットのレパートリーとは異なる新たながん標的化抗原・抗体セットの樹立が期待される。

また、抗体結合変異型 HSV のウイルス学的解析の結果、このウイルスは抗体非依存的な細胞侵入能が極めて低いレベルに抑えられていることが判明した。このことは、抗体スクリーニングを施行する際のバックグラウンドのレベルが低いということの意味する。したがって、Adv-FZ33 系ではその高いバックグラウンドに埋没してしまい偽陰性の判定をされてしまっていたような比較的発現量の低いがん抗原を認識する抗体も選別することが可能となるものと予測される。

今後も様々なタイプのがん細胞を免疫原として、これら複数の私たち独自のスクリーニング系で抗体を選抜・樹立してゆくことにより、新たなターゲット分子を同定できる可能性が高い。

E. 結論

ファイバー変異型アデノウイルス(Adv-FZ33)系ならびにイミュノトキシン(iTox)系を用いた高効率がん標的化抗体のスクリーニングの成功に続き、本年度は、新規に抗体結合変異型 HSV を探索プローブとしたがん標的化抗体のスクリ

ーニング系の樹立に挑み、これに成功した。この新たな系もすでに順調に稼働している。今後もこのプロジェクトを進めることにより、がん標的化治療への応用が有望な抗原・抗体セットの樹立が十分に見込まれる。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表 論文発表

- 1) Miyagawa Y, Marino P, Verlengia G, Uchida H, Goins WF, Yokota S, Geller DA, Yoshida O, Mester J, Cohen JB, Glorioso JC. (2015) Herpes simplex viral-vector design for efficient transduction of nonneuronal cells without cytotoxicity. **PNAS**. 112:E1632-41.
- 2) Nishii Y, Yamaguchi M, Kimura Y, Hasegawa T, Aburatani H, Uchida H, Hirata K, Sakuma Y. (2015) A newly developed anti-Mucin 13 monoclonal antibody targets pancreatic ductal adenocarcinoma cells. **Int J Oncol** 46:1781-7.
- 3) Mazzacurati L, Marzulli M, Reinhart B, Miyagawa Y, Uchida H, Goins WF, Li A, Kaur B, Caligiuri M, Cripe T, Chiocca N, Amankulor N, Cohen JB, Glorioso JC, Grandi P. (2014) Use of miRNA response sequences to block off-target replication and increase the safety of an unattenuated, glioblastoma-targeted oncolytic HSV. **Mol Ther** 23:99-107.
- 4) Yamaguchi M, Nishii Y, Nakamura K, Aoki H, Hirai S, Uchida H, Sakuma Y, Hamada H. (2014) Development of a sensitive screening method for selecting monoclonal antibodies to be internalized by cells. **Biochem Biophys Res Commun** 454:600-603.
- 5) Yamamoto Y, Hiraoka N, Goto N, Rin Y, Miura K, Narumi K, Uchida H, Tagawa M, Aoki K. (2014) A targeting ligand enhances infectivity and cytotoxicity of an oncolytic adenovirus in human pancreatic cancer tissues. **J Control Release** 192:284-293.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

アデノウイルスベクターに対する生体反応の解析

研究分担者 水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野・教授

研究要旨

制限増殖型アデノウイルス（Ad）を含め、Ad ベクターは、その優れた特性から革新的癌治療薬として大きな期待が寄せられている。しかしながら Ad ベクターによる遺伝子治療（導入）の際には、自然免疫及び獲得免疫が強く惹起されることによって、組織障害および遺伝子発現効率の低下が誘導される。従って Ad ベクターによる自然免疫および獲得免疫活性化機構の解明は極めて重要な課題である。我々はこれまでに microRNA (miRNA)を利用して、Ad 遺伝子の E1 遺伝子非依存的な発現を抑制可能な Ad ベクターを開発している。特に E4 遺伝子の 3' 非翻訳領域に肝臓特異的 miRNA である miR-122a を挿入した Ad-E4-122aT 投与群では、肝臓における Ad 遺伝子の発現が劇的に抑制されるとともに、肝障害が顕著に低減していた。そこで H26 年度は Ad-E4-122aT の遺伝子導入特性についてさらに検討を進めた。その結果、Ad-E4-122aT 投与群では、後期の肝障害のみならず自然免疫活性化によって引き起こされる早期の肝障害についても有意に抑制されていた。また遺伝子発現効率について検討したところ、従来型 Ad ベクターでは投与後徐々に遺伝子発現効率が低下したのに対し、Ad-E4-122aT では約 1 年にわたり高い遺伝子発現を示した。さらに E1 遺伝子非依存的な Ad 遺伝子の発現について検討したところ、炎症性サイトカインが E1 遺伝子非依存的な Ad 遺伝子の発現を誘導することを見出した。

A. 研究目的

腫瘍溶解性アデノウイルス（Ad）を含む Ad ベクターは、その高い感染効率（遺伝子導入効率）から次世代の抗癌剤として大きな期待を集めている。しかしながら一方で、Ad ベクターを生体に投与すると、自然免疫ならびに獲得免疫が強く誘導され、組織障害ならびに遺伝子発現効率の低下につながる事が明らかとなっている。癌治療において癌細胞が免疫系によって排除されることは治療効果の増強につながるものの、癌組織以外の組織においては組織障害などの副作用につながる。従って、Ad ベクター投与後の自然免疫および獲得免疫活性化機構の解明は、Ad ベクターの臨床応用に向けて極めて重要な課題である。これまでに我々は、Ad ベクターによる自然免疫活性化に Tank binding kinase 1 (TBK1) が重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、非増殖型 Ad ベクターは、自己増殖に必須の E1 遺伝子を欠損させることで、理論上 Ad 遺伝子が発現しないよう設計されている。しかしながら Ad ベクター作用後、わずかに Ad タンパク質が発現することにより、Ad タンパク質に対する細胞性免疫や Ad タンパク質そのものによる組織障害が誘導され、遺伝子発現が徐々に減弱することが問題となっている。

そこで我々は Ad 遺伝子の E1 遺伝子非依存的な発現を抑制するために、E2A, E4, pIX 遺伝子の 3' 非翻訳領域に microRNA (miRNA) の標的配列を挿入した Ad ベクターを開発することに成功した。特に肝臓特異的 miRNA である miR-122a の標的配列を挿入した Ad-E4-122aT は、肝臓における Ad 遺伝子の発現を大きく抑制するとともに、投与後後期の肝障害を改善することに成功した。そこで今年度は、投与後早期における肝障害と遺伝子発現効率に関して検討を行った。さらに、E1 遺伝子非依存的な Ad 遺伝子の発現に関するメカニズム解明を行った。

B. 研究方法

B-1. Ad ベクター投与後の早期における肝障害の評価

C57Bl6 マウスに Ad ベクターを 1×10^{11} vector particle (VP)/mouse の投与量で尾静脈内投与した。投与 2 日後に肝臓を回収し、組織切片を作製した。組織切片を顕微鏡下観察することにより、Ad ベクターによる肝障害レベルを評価した。さらに Ad ベクター投与後、経時的に血液を回収し、肝障害マーカーである血清中 Alanine aminotransferase (ALT) 値を測定した。

B-2. Ad ベクター投与後の炎症性サイトカインの発現誘導

C57Bl/6 マウスに Ad ベクターを 1×10^{11} vector particle (VP)/mouse の投与量で尾静脈内投与した。投与より 3 時間後、脾臓より全 RNA を回収した。その後、cDNA を合成し、定量的 RT-PCR により各種サイトカイン mRNA 量を定量した。

B-3. Ad ベクター投与後の遺伝子発現効率

C57Bl/6 マウスに Mouse secreted alkaline phosphatase (mSEAP) を発現する Ad ベクターを 1×10^{10} infectious titer unit (IFU)/mouse の投与量で尾静脈内投与した。なお、mSEAP 発現のプロモーターとしては、肝臓特異的プロモーターである AHA プロモーター (Apolipoprotein E enhancer + 1-antitrypsin promoter) を用いた。投与後経日的に血清を回収し、血清中 mSEAP 発現量を定量した。

B-4. 各種サイトカインで前処理した初代肝細胞に対する Ad ベクターの細胞障害性に関する検討

C57Bl/6 マウスより回収したマウス初代肝細胞に Ad ベクターを 300, 3000 VP/cell で作用させた。6 時間後、Recombinant Interleukin (IL)-6 を含む培地に置換し培養した。その後、48 時間培養後、細胞障害を培地中の Lactate dehydrogenase (LDH) 発現量を測定することで評価した。

B-5. 炎症性サイトカインが Ad 遺伝子の発現に及ぼす影響

各種培養細胞を Recombinant Tumor necrosis factor (TNF)-alpha を含む培地で培養した。その後、従来型 Ad ベクターを 100 VP/cell で作用させ、24 時間培養したのち、全 RNA を回収した。cDNA を合成したのち、定量的 RT-PCR により Ad 遺伝子発現量を定量した。

(倫理面への配慮)

本研究は、各分担研究者が所属する研究施設の各種委員会の承認を得た上で実施している。なお本研究においては、公知の細胞株以外のヒト由来の試料は使用していない。

C. 研究結果

C-1. Ad ベクター投与後の早期における肝障害の評価

これまでに我々は E2A, E4, pIX 遺伝子の 3' 非翻訳領域に肝臓特異的な miRNA である miR-122a、もしくは脾臓特異的な miRNA である miR-142-3p の標的配列 (完全相補配列) を挿入

した Ad ベクターを開発するとともに、それらの Ad ベクターでは挿入した miRNA 標的配列と該当組織での miRNA 発現プロファイルに応じて、Ad 遺伝子の発現が抑制されることを見出している。特に E4 遺伝子の 3' 非翻訳領域に miR-122a の標的配列を挿入した Ad ベクター (Ad-E4-122aT, Fig.1) では、肝臓において Ad 遺伝子の発現が大きく抑制されるとともに、投与後後期 (6-10 日後) の肝障害が大きく抑制されることを明らかにしている。Ad ベクターによる肝障害は、投与後早期の肝障害 (投与 1-3 日後) と後期の肝障害 (6-10 日後) に大別される。後期の肝障害は一般的に獲得免疫によるものと考えられているが、早期の肝障害は Ad ベクターによる自然免疫活性化が関与していることが知られている。そこで H26 年度は、Ad-E4-122aT による早期の肝障害について検討を行った。

まず Ad-E4-122aT 投与 2 日後の肝臓の組織切片を作製し、肝障害を評価した。その結果、従来型 Ad ベクター投与群では、肝臓中に炎症細胞の浸潤や肝細胞のアポトーシスが観察された。一方で Ad-E4-122aT 投与群においては、そのような肝障害は大きく抑制されていた。また血清中 ALT 値を測定したところ、従来型 Ad ベクター投与群では有意な ALT 値の上昇が観察されたのに対し、Ad-E4-122aT 投与群では PBS 投与群と同程度の ALT 値のみしか観察されなかった。以上の結果より、Ad-E4-122aT 投与群では、後期の肝障害のみならず、早期の肝障害も抑制されることが示された。

C-2. Ad ベクター投与後の炎症性サイトカインの発現誘導

これまでに Ad ベクターによる早期の肝障害に、Ad ベクターによって惹起される炎症性サイトカインが大きく関与することが報告されている。そこで Ad ベクター投与後の脾臓における炎症性サイトカイン mRNA 量 (IL-6, IL-12, IFN-gamma) を検討した。その結果、従来型 Ad ベクター、Ad-E4-122aT 投与群ともに同程度の炎症性サイトカイン mRNA 量を示した。以上の結果より、Ad-E4-122aT は従来型 Ad ベクターと同程度の自然免疫活性化能を有することが示された。

C-3. Ad ベクター投与後の遺伝子発現効率

次に Ad ベクター投与後の遺伝子発現効率について検討を行った。これまでに Helper-dependent Ad ベクターを用いた報告から、Ad 遺伝子の発現を抑制することにより遺伝子発現量が向上するのみならず、遺伝子発現期間も改善されることが報告されていることから、

レポーター遺伝子として mSEAP 遺伝子を用いることで、経口的に遺伝子発現効率を評価することとした (mSEAP は血中に分泌されるため、血液を回収することで遺伝子発現効率を評価することが可能)。その結果、投与後初期 (~7 日目) の遺伝子発現量に関しては、従来型 Ad ベクターと Ad-E4-122aT とで有意な差は観察されなかった (Fig.2)。しかしその後、従来型 Ad ベクター投与群では徐々に遺伝子発現量が低下していったのに対し、Ad-E4-122aT 投与群においては約 1 年にわたり高効率な遺伝子発現を示した。以上の結果より、Ad-E4-122aT は早期および後期の肝障害が抑制されることにより、長期にわたり高効率な遺伝子発現を示すことが明らかとなった。

C-4. 各種サイトカインで前処理した初代肝細胞

C-2 における検討において、従来型 Ad ベクターと Ad-E4-122aT は同程度の自然免疫活性化能 (炎症性サイトカイン誘導能) を示したことから、従来型 Ad ベクターと Ad-E4-122aT 投与群における早期の肝障害レベルの差は、誘導された炎症性サイトカイン量の差ではないことが示唆された。しかしこれまでに Ad ベクターによって誘導された炎症性サイトカインが Ad ベクターによる早期の肝障害に関与することが報告されていることから、我々は炎症性サイトカインが従来型 Ad ベクターによる肝障害を増強しているのではないかと考えた。そこで、マウス初代肝細胞に Ad ベクターを作用させたのち、IL-6 を含む培地で培養した。その結果、まず炎症性サイトカイン非存在下では、Ad-E4-122aT 作用群では有意な細胞障害は観察されなかったのに対し、従来型 Ad ベクター作用群では有意な細胞障害 (培養上清中の LDH 活性の上昇) が観察された。さらに IL-6 もしくは IFN-gamma 含有培地で培養したところ、従来型 Ad ベクター作用群では IL-6 を作用させた場合で約 1.5 倍 LDH 活性の上昇が観察された。それに対し、Ad-E4-122aT 作用群では IL-6 を作用させた場合には有意な LDH 活性の上昇は観察されなかった。以上の結果より、Ad ベクターによって誘導された IL-6 が Ad ベクターによる肝障害を増強していることが示唆された。

C-5. 炎症性サイトカインが Ad 遺伝子の発現に及ぼす影響

そこで次に炎症性サイトカインが Ad 遺伝子の E1 遺伝子非依存的な発現に及ぼす影響について検討することとした。HeLa 細胞をヒト TNF-alpha で前処理したのち、Ad ベクターを作用させ、Ad 遺伝子の発現を測定したところ、E2A

遺伝子で約 1.8 倍、E4 遺伝子で約 3 倍の mRNA 量の上昇が観察された。以上の結果より、炎症性サイトカインが Ad 遺伝子の E1 遺伝子非依存的な発現を活性化することが示唆された。

D. 考察

Ad ベクターによる肝障害は、投与後早期 (投与 1 ~ 3 日後) に起こる肝障害と後期 (投与 6 ~ 10 日後) に起こる肝障害とに大別される。後期の肝障害は、Ad タンパク質に対する細胞性免疫によって誘導されることが報告されている。さらに我々は、Ad-E4-122aT では肝細胞における Ad タンパク質の発現を抑制することで、抗原提示が抑制されるために Cytotoxic T lymphocytes (CTL) による攻撃を受けないため肝障害が軽減されていることを明らかにしている。一方で早期の肝障害については、Ad ベクターによって誘導された炎症性サイトカインが肝障害の原因であることが報告されているものの、後期の肝障害と比較して解明が進んでいないのが現状である。

我々が開発した Ad-E4-122aT は、miR-122a を利用して Ad 遺伝子の不要な発現を抑制することにより、後期の肝障害を抑制可能であることを明らかにしている。今回、後期の肝障害のみならず早期の肝障害についても検討したところ、Ad-E4-122aT 投与群では、早期の肝障害も軽減していた。そこで Ad-E4-122aT による炎症性サイトカインの誘導について検討したところ、従来型 Ad ベクターと比較し有意な差は観察されなかった。Ad ベクターによる炎症性サイトカインの誘導メカニズムについては様々な機構が報告されているが、主には Ad ゲノムが Toll-like receptor 9 (TLR9) をはじめとするパターン認識受容体に認識されることで誘導されると考えられている。Ad-E4-122aT も従来型 Ad ベクターも、miR-122a 標的配列以外は違いがないことから、両ベクター間に炎症性サイトカイン発現誘導に差がないと考えられる。

しかしながら本検討により炎症性サイトカインは、Ad 遺伝子の発現を活性化させることで、肝障害を促進させていることが示唆された。Ad 遺伝子のうち、一部の Ad 遺伝子のプロモーター領域には NF- κ B の結合領域が存在することが報告されている。従って炎症性サイトカインにより活性化した NF- κ B が Ad 遺伝子の転写を活性化したものと考えられる。また我々は Rag2/IL2Rcg ノックアウトマウス (免疫不全マウス) においても従来型 Ad ベクターによって肝障害が誘導されること、さらには Ad-E4-122aT では全く肝障害が誘導されないことから、Ad 遺伝子産物そのものが獲得免疫非依存的に肝障害

を誘導していることが示唆された。以上の結果より、投与早期においても、炎症性サイトカインによって誘導された Ad 遺伝子産物が肝障害を誘導しているものと考えられる。

E. 結論

- 1) Ad-E4-122aT では、後期の肝障害のみならず早期の肝障害も軽減されることが示された。また Ad-E4-122aT は、従来型 Ad ベクターよりも長期間にわたり高効率な遺伝子発現を示すことが示された。
- 2) 炎症性サイトカインが Ad 遺伝子の E1 遺伝子非依存的な発現を促進しており、それによって早期の肝障害が誘導されている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Shimizu K, Sakurai F, Tomita K, Nagamoto Y, Nakamura SI, Katayama K, Tachibana M, Kawabata K, Mizuguchi H. Suppression of leaky expression of adenovirus genes by insertion of microRNA-targeted sequences in the replication-incompetent adenovirus vector genome. **Mol. Ther. Methods Clin. Dev.** 1:14035.
- 2) Hemmi M, Tachibana M, Tsuzuki S, Shoji M, Sakurai F, Kawabata K, Kobiyama K, Ishii KJ, Akira S, Mizuguchi H. The early activation of CD8+ T cells is dependent on type I IFN signaling following intramuscular vaccination of adenovirus vector. **Biomed Res Int.** 2014:158128.

学会発表

- 1) 櫻井文教、水口裕之 . Post-transcriptional Gene Silencing 機構を利用した高機能型遺伝子組換えアデノウイルスの開発 .日本薬学会第 135 年会 (神戸) 2015 年 3 月 .
- 2) 清水かほり、櫻井文教、飯塚俊輔、立花雅史、西中徹、寺田知行、水口裕之 . アデノウイルスベクター投与後早期の肝障害は、アデノウイルス遺伝子の発現抑制により軽減される .日本薬学会第 135 年会(神戸) 2015 年 3 月 .
- 3) 町谷充洋、櫻井文教、清水かほり、立花雅史、水口裕之 . NF- κ B がアデノウイルスの増殖に及ぼす影響に関する検討, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会(横浜)2014

年 11 月 .

- 4) 清水かほり、櫻井文教、飯塚俊輔、富田恭子、長基康人、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新規アデノウイルスベクターの開発と機能評価 . 第 64 回 日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都) 2014 年 10 月 .
- 5) 清水かほり、櫻井文教、飯塚俊輔、富田恭子、長基康人、立花雅史、西中徹、寺田知行、水口裕之 . ウイルス遺伝子の発現抑制により高効率な導入遺伝子の発現と低い肝障害を示すアデノウイルスベクターの開発 . アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014 (東京) 2014 年 9 月 .
- 6) Shimizu K, Sakurai F, Nakamura S, Tachibana M, Mizuguchi H . Suppression of leaky expression of Ad genes leads to the reduction in the adenovirus vector-mediated hepatotoxicity at the not only late phase but also early phase .第 20 回日本遺伝子治療学会年次学術集会 (東京) 2014 年 8 月 .
- 7) Sakurai F, Shimizu K, Tomita K, Nagamoto Y, Tachibana M, Mizuguchi H . EFFICIENT AND LONG-TERM TRANSGENE EXPRESSION BY A NOVEL ADENOVIRUS VECTOR EXHIBITING MICRORNA-MEDIATED SUPPRESSION OF VIRAL GENE EXPRESSION . 第 20 回日本遺伝子治療学会年次学術集会 (東京) 2014 年 8 月 .
- 8) 櫻井文教、清水かほり、富田恭子、長基康人、立花雅史、水口裕之 . microRNA 依存的にウイルス遺伝子の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 30 回日本 DDS 学会学術集会 (東京) 2014 年 7 月 .

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し

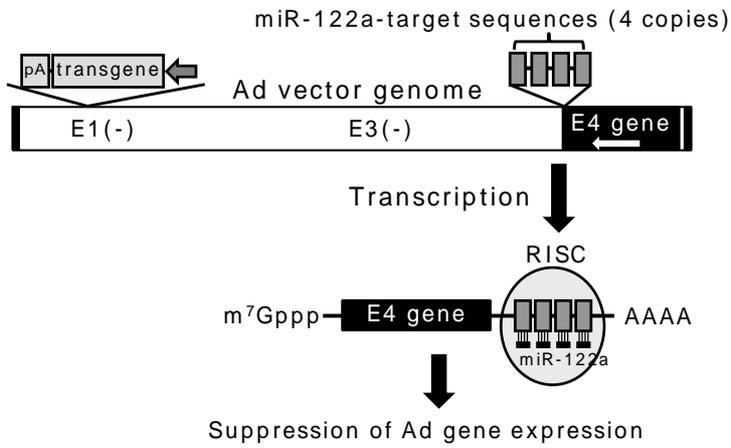


Fig.1 Schematic diagram of Ad-E4-122aT. Four copies of a sequence perfectly complementary to miR-122a were incorporated into the 3'-untranslated region of the E4 gene. Translation of the E4 genes are efficiently suppressed by miR-122a.

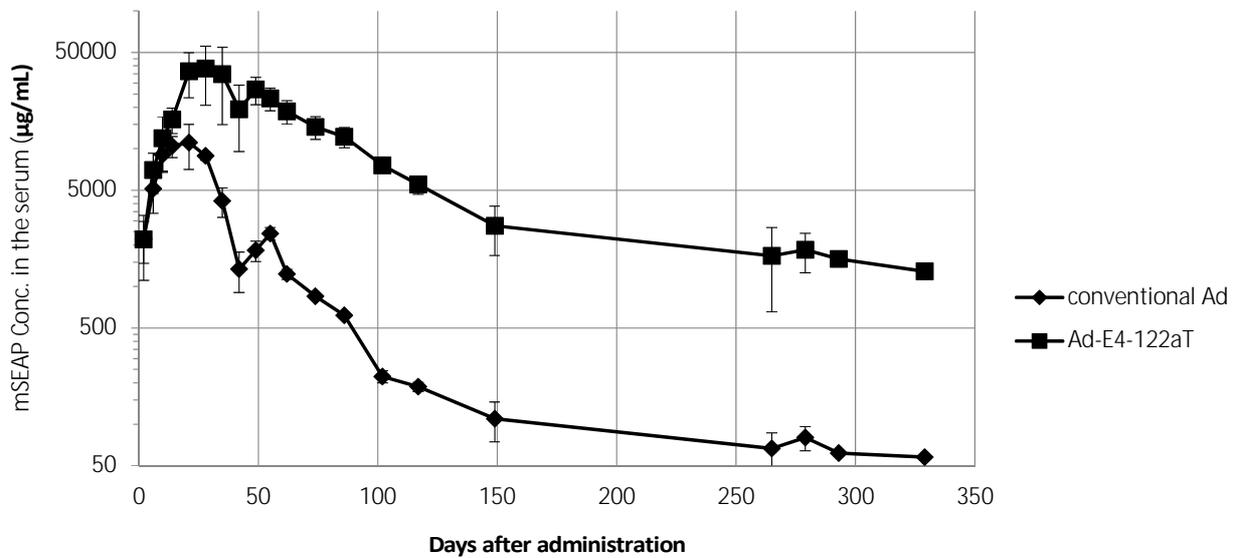


Fig. 2 Ad vector-mediated transgene expression in mice. mSEAP production in the serum following Ad vector administration. C57BL/6 mice were intravenously administered Ad vectors expressing the mSEAP gene under the control of an AHA promoter at 1×10^{10} IFU/mouse. Blood samples were collected via retro-orbital bleeding on the indicated days after injection. mSEAP production in the serum was determined by SEAP chemiluminescence assay. The data are expressed as the mean values \pm S.D. (n=4). mSEAP expression in the PBS-treated mice was below the detectable level.

標的ベクターの臨床面からの検討と評価

分担研究者 水野 正明 名古屋大学医学部附属病院・教授

研究要旨

本研究では、難治がんに対する標的バイオ医薬の一つとして腫瘍標的型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使用することを視野に入れて開発するため、腫瘍標的型アデノウイルスベクターの品質、有効性、安全性について検討を加えるとともに、それを実施する周辺インフラの整備を進めている。本年度は腫瘍標的型アデノウイルスベクターの GMP 製造法を確立するため、非臨床試験の対象項目とその研究グレード（GLP or Non-GLP）を見極め、必要な手順書等のリスト化と文書化を行った。さらに腫瘍標的型アデノウイルスベクターの製造法の確立においては、製造過程で生じる余剰の腫瘍標的型アデノウイルスベクターや生物材料を適切に処理する方法の基礎を確立した。

A. 研究目的

本研究では、本研究班内で開発が進められている腫瘍標的型アデノウイルスベクター（以下、当該ベクターという）を対象に臨床面から評価する仕組みづくりを進めてきた。

昨年度は、当該ベクターを用いる臨床試験を実施するにあたり求められる体制の検証並びに臨床試験における当該ベクターの品質、有効性、安全性を確保するためのバイオマーカー探索やその評価方法の検証を進めた。本年度はこれらを非臨床 Proof of Concept (POC) の観点から整理し、臨床試験実施に向けてのプロセスを進めた。さらに製造過程で生じる余剰の当該ベクターや生物材料を適切に処理する方法について検証を加えた。

B. 研究方法

当該ベクターの GMP 製造法を確立するため、非臨床試験の対象項目とその研究グレード（GLP or Non-GLP）を見極め、手順書や文書の策定を進めた。さらに試験デザインの具現化に向け、規制当局を念頭に入れた戦略的な開発を実施し、非臨床 POC 及び臨床試験実施の観点からそれぞれ検証を加えた。

C. 研究結果

C-1. 臨床試験実施に必要な手順書等のリスト化と文書化

当該ベクターを用いる臨床試験を実施するにあたり、求められる非臨床 POC はその基礎的な安全性と有用性のプロファイルである。そこで

臨床試験実施にあたり、求められる手順書や文書、さらには業務のリスト化と文書化を進めた。

1) 当該ベクターの品質：

当該ベクターの品質を評価するには規格と安定性の検討が必要となる。本研究の最終年度の成果として品質の担保ができるよう、品質管理 (QC:Quality Control) と品質保証 (QA:Quality Assurance) 体制をそれぞれ構築した。

2) 当該ベクターを用いた非臨床試験：

当該ベクターを用いた非臨床試験の実施を前提に、試験項目をまとめた。

薬効薬理試験

- ・効力を裏付ける試験 (in vitro)
- ・効力を裏付ける試験 (in vivo)
- ・副次的薬理試験
- ・安全性薬理試験 (中枢神経系) (GLP)
- ・安全性薬理試験 (心血管系) (GLP)
- ・安全性薬理試験 (呼吸器系) (GLP)
- ・薬力学的薬物相互作用試験

動態試験

- ・吸収
- ・分布
- ・代謝
- ・排泄

3) 毒性試験

- ・単回投与毒性試験 (GLP)
- ・反復投与毒性試験 (GLP)
- ・局所刺激性試験 (GLP)
- ・遺伝毒性試験 (GLP)
- ・がん原性試験 (GLP)
- ・生殖発生毒性試験 (GLP)
- ・免疫毒性試験 (GLP)

- ・造腫瘍性試験（GLP）
 - ・目的外細胞への形質転換
- 3) 当該ベクターを用いた臨床試験に必要な手順書及び文書の策定：
- 当該ベクターを用いた臨床試験の実施を前提に、必要な手順書等のリストをまとめた。
- 試験物製造
- ・試験物の製造に関する手順書
 - ・試験物の運搬に関する手順書
 - ・試験物の管理に関する手順書
- 臨床試験手順書
- ・試験調整委員会への業務委嘱に関する手順書
 - ・試験調整委員会の業務に関する手順書
 - ・試験実施計画書及び症例報告書の見本の作成に関する手順書
 - ・試験薬概要書作成に関する手順書
 - ・説明文書及び同意文書作成に関する手順書
 - ・被験者の健康被害補償に関する手順書
 - ・安全性情報の取扱いに関する手順書
 - ・記録の保存に関する手順書
 - ・効果・安全性評価委員会に関する手順書
 - ・モニタリングに関する手順書
 - ・監査の実施に関する手順書
 - ・総括報告書作成に関する手順書
 - ・緊急時開錠手順書
 - ・検体保管・管理・輸送及び測定実施に関する手順書
 - ・データマネジメントに関する手順書
 - ・登録・割付けに関する手順書
- 文書
- ・実施計画書（プロトコル検討委員会）
 - ・説明文書及び同意文書
 - ・症例報告書
 - ・試験物概要書
 - ・当該治験の実施を科学的に正当と判断した理由
 - ・症例ファイル
 - ・併用禁止薬・制限薬、同種・同効薬リスト
- 4) 当該ベクターを用いた臨床試験に必要な業務関連：
- 当該ベクターを用いた臨床試験の実施を前提に、必要な業務を整理した。
- データマネジメント
- ・データマネジメント計画書
 - ・症例登録計画書
 - ・登録システム構築
 - ・データベース構築
 - ・EDC 入力マニュアル
 - ・EDC ユーザー管理手順書
 - ・EDC ユーザー教育・訓練手順書
 - ・データチェックリスト
 - ・CRF 記入マニュアル
 - ・CRF の変更に関する手引き

- ・データ固定
- ・データマネジメント報告書
- 統計解析
- ・統計解析計画書
- ・統計解析プログラム
- モニタリング
- ・モニタリング計画書
- ・モニタリングチェックリスト
- 監査
- ・監査計画書
- ・監査チェックリスト

C-2. 当該ベクターのGMP製造法の確立

本年度は、当該ベクター製造時に生じる余剰の当該ベクターや生物材料（293細胞など）の効率的な処理方法について大気圧プラズマが当該ベクター並びにその製造に関連した生物材料の処理に適しているか否かを検討した。その結果、10分間の大気圧プラズマ照射により生物的活性を完全に抑えることがわかった。

D. 考察

当該ベクターを用いる臨床試験の実施にあたり、規制当局が求める前臨床試験項目や臨床試験概要について研究当初から念頭に入れておくことは極めて重要である。

昨年度までに、前臨床試験項目や臨床試験実施の際の人的支援体制、臨床試験の計画から報告までの過程を整理した。これを受け、本年度は実施に必要な手順書や文書の策定を行い、ほぼ完了した。事業性を重視した本取り組みは本研究が単なる基盤研究に留まらず、独立行政法人日本医療研究開発機構が目指す医療の産業化にも直結する成果と考えている。

一方、臨床試験用の当該ベクター製造においては、最終試験物の品質管理(QC)と品質保証(QA)が必要である。その際、製造の過程ででてくる不要な生物材料の処理は重要なポイントとなる。本年度は大気圧プラズマが当該ベクター並びにその製造に関連した生物材料の処理に適しているか否かを検討し、期待されたデータを得ることができた。本技術は今後、当該ベクター製造法において閉鎖系ユニットを活用する際に有用であると思われる。

E. 結論

難治がんに対する標的バイオ医薬の一つである腫瘍標的型アデノウイルスベクターの臨床試験実施に必要な品質、非臨床 POC、手順書並びに文書、さらには業務について考察を加え、リスト化並びに文書化を行った。

今後はこれらの成果を踏まえ、早期の臨床試験実施を目指したい。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
論文発表

- 1) Okazaki Y, Wang Y, Tanaka H, Mizuno M, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Uchida K, Kikkawa F, Hori M, Toyokuni S. Direct exposure of non-equilibrium atmospheric pressure plasma confers simultaneous oxidative and ultraviolet modifications in biomolecules. **J Clin Biochem Nutr.** 2014 55(3):207-15.
- 2) Torii K, Yamada S, Nakamura K, Tanaka H, Kajiyama H, Tanahashi K, Iwata N, Kanda M, Kobayashi D, Tanaka C, Fujii T, Nakayama G, Koike M, Sugimoto H, Nomoto S, Natsume A, Fujiwara M, Mizuno M, Hori M, Saya H, Kodera Y. Effectiveness of plasma treatment on gastric cancer cells. **Gastric Cancer.** 2014 Jul 6.
- 3) Cao D, Kishida S, Huang P, Mu P, Tsubota S, Mizuno M, Kadomatsu K. A new tumorsphere culture condition restores potentials of self-renewal and metastasis of primary neuroblastoma in a mouse neuroblastoma model. **PLoS One.** 2014 9(1):e86813..

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし