201438104A

厚生労働科学研究委託費
革新的がん医療実用化研究事業

悪性胸膜中皮腫に対する新規治療法の開発及び実用化に関する研究

平成 26 年度　委託業務成果報告書

業務主任者　　仲　哲治

独立行政法人　医薬基盤研究所

平成 27(2015)年 3 月

本報告書は、厚生労働省の平成 26 年度厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、独立行政法人医薬基盤研究所が実施した平成 26 年度「悪性胸膜中皮腫に対する新規治療法の開発及び実用化に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費
革新的がん医療実用化研究事業

悪性胸膜中皮腫に対する新規治療法の開発及び実用化に関する研究

平成26年度　委託業務成果報告書

業務主任者　　仲　哲治

独立行政法人　医薬基盤研究所

平成27(2015)年3月

目　次

Ⅰ．委託業務成果報告（総括）

悪性胸膜中皮腫に対する新規治療法の開発及び実用化に関する研究
仲　　哲　治 …… 1

Ⅱ．委託業務成果報告（業務項目）

1.　GMP 基準に準拠した AdSOCS3 のスケールアップ製造に関する研究
白　川　利　朗
（資料）悪性胸膜中皮腫に対する新規治療法の開発及び
実用化に関する研究 …… 10

2.　GMP 基準に準拠した AdSOCS3 のスケールアップ製造に関する研究
谷　　憲三郎
（資料）GMP 準拠 AdSOCS3 の製造に向けた基礎研究 …… 13

3.　AdSOCS3 の追加の非臨床試験の準備に関する研究
金　田　安　史
（資料）悪性胸膜中皮腫に対する新規治療法の開発及び
実用化に関する研究 …… 16

4.　AdSOCS3 の追加の非臨床試験の準備に関する研究
野　村　愼太郎
（資料）悪性胸膜中皮腫に対する新規治療法の開発及び
実用化に関する研究 …… 24

5.　AdSOCS3 の追加の非臨床試験の準備に関する研究
土　井　俊　彦
（資料）悪性胸膜中皮腫に対する新規治療法の開発及び
実用化に関する研究 …… 29

6.　AdSOCS3 の追加の非臨床試験の準備に関する研究
奥　村　明之進
（資料）癌間質の制御による悪性腫瘍の転移抑制のための基礎研究 …… 31

Ⅲ．学会等発表実績 …… 40

Ⅳ．研究成果の刊行物・別刷 …… 49

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書（総括）

悪性胸膜中皮腫に対する新規治療法の開発及び実用化に関する研究

業務主任者　仲哲治　独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部　創薬基盤研究部長

研究要旨

本研究の目的は、5年生存率が3.7%と極めて予後が悪く有効な治療法が確立されていない悪性胸膜中皮腫に対して、業務主任者らが単離したサイトカインシグナル伝達抑制分子(SOCS3)の胸腔内投与による遺伝子治療を世界で初めて実用化するために必要な非臨床試験を達成することである。

悪性胸膜中皮腫は診断が難しいため発見時に進行期である事が多く、放射線療法や化学療法が奏功し難いため、新たな治療法の早急な開発が必要とされている。近年、悪性胸膜中皮腫等の癌において、サイトカインシグナル伝達の異常と発癌や癌細胞の増殖亢進との関係が明らかにされている。SOCS3の細胞内強制発現は、JAK/STAT系以外に、MAPKやFAKなどのシグナル伝達経路も抑制し、p53の活性化も促進するため、SOCS3は癌細胞の増殖や生存シグナルを遮断する革新的抗癌剤としての実用化が期待される。

既に業務主任者らはマウスを用いて、悪性胸膜中皮腫に対するGMP準拠のアデノウイルス(Ad)ベクターを用いたSOCS3（AdSOCS3）の抗腫瘍効果及びその薬理作用を明らかにし、SOCS3が悪性胸膜中皮腫の新規治療薬として有用である事を報告し(Iwahori K, Naka T et al. 2011 Int J Cancer)、カニクイザルにおける安全性も確認している。さらに、PMDA事前面談（平成24年10月）を踏まえ、追加で実施予定の非臨床試験実施計画に係る対面助言を平成25年6月6日に受け、業務主任者が立案した計画及びプロトコールに対しPMDAから既に了解を得ており、実用化に向けて創薬支援戦略室と相談中である。

本年度においては、SOCS分子による抗腫瘍効果の作用機序を解明するため、*in vitro*での解析を行った。その結果、SOCS分子によるG2/M期での細胞周期の新たな制御機構を発見した。

担当責任者
白川利朗　神戸大学大学院保健学研究科　教授
谷憲三朗　九州大学生体防御医学研究所　九州大学病院先端分子細胞治療科　教授
金田安史　大阪大学大学院　医学系研究科　遺伝子治療学　教授
野村慎太郎　長浜バイオ大学　バイオサイエンス学部・アニマルバイオサイエンス学科　実験病理学　教授
土井俊彦　独立行政法人　国立がん研究センター　早期・探索臨床研究センター先端医療科　消化管腫瘍内科学　副院長・科長
奥村明之進　大阪大学大学院　医学系研究科　外科学講座呼吸器外科学　教授

A. 研究目的

本研究の目的は、業務主任者が単離したサイトカインシグナル伝達抑制分子(SOCS3)の胸腔内投与による遺伝子治療を有効な治療法が確立されていない悪性胸膜中皮腫に対して実用化するため、遺伝子治療に実績のある担当責任者との共同研究により非臨床試験を達成することである。

業務主任者は、研究初年度である本研究において SOCS3 による抗腫瘍効果の作用機序の解明を目的とし、SOCS-3 と機能と活性が近い SOCS-1 を用いて抗腫瘍効果の解析を行った。

B. 研究方法

(1) 細胞

MKN45、KATO-III は Japanese Collection of Research Bioresources より入手した。AGS は ATCC より購入した。

(2) ウェスタンブロット解析

細胞より radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA; 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% protease-inhibitor cocktail, and 1% phosphatase-inhibitor cocktail) を用いて細胞を溶解し、(16,100rcf, at 4° C, 15 min) し、上清を回収することでタンパク質を抽出した。

SDS-PAGE (5-20%グラジェントゲル(和光純薬)) には、10μg のタンパク質をアプライした。40mA で 50min 泳動し、PVDF 膜に 120mA、1 時間転写した。転写後、1% BSA/TBST (TBS+ 0.1% Tween20) にて室温で 1 時間ブロッキングし、抗 phospho-Chk2 抗体 (Thr68; 1:1,000, CST), 抗 Chk2 (1:1,000, CST), 抗 phospho-cdc2 (Tyr15; 1:1,000, CST), 抗 phospho-cdc2 (Thr161; 1:1,000, CST), 抗 anti-phospho-cdc25C (Thr48; 1:1,000, CST), 抗 cdc25C (1:1,000, CST), 抗 cyclinB1 (1:1,000, CST), 抗 phospho-STAT3 抗体 (Tyr705; 1:1,000, CST), 抗 STAT3 抗体 (1:1,000, santa cruz biotech), 抗 GAPDH (1:2,000, santa cruz biotech), 抗 ATR 抗体 (1:1,000, santa cruz biotech), 抗 SOCS-1 (1:1,000, IBL) 1 時間インキュベートした。TBST で 10 分間、3 回ずつ洗浄した後、TBST で 5,000 倍希釈した HRP 標識抗ウサギ抗体 (GE healhcare) を用いて PVDF 膜を室温で 1 時間インキュベートした。PVDF 膜を TBST で 10 分間、3 回ずつ洗浄した後、蛍光反応システム (PerkinElmer 社) により、反応したタンパク質を検出した。。

(3) 増殖アッセイ

MKN45, KATO-III, AGS を 96-well plates に 2,000 cells/well でまき、様々な濃度の AdSOCS1 あるいは AdLacZ を感染させた。48 時間後に Cell Counting Reagent SF (ナカライテスク) を加えることで発色させ、Microplate reader (Bio-Rad Model 680) にて主波長 450nm、副波長 630nm の吸光度を測定した。

(4) 細胞周期解析

細胞を 6 ウェルプレートに 30,000cells/well となるように 2ml ずつ (10% 血清入り培地) まいた。翌日、AdSOCS あるいは AdLacZ を 160 MOI で感染させ、24 時間後に BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit (型番、340242) を用いて FACS CANTO-II にて測定することで細胞周期解析を行った。

(5) 免疫沈降

MKN45 細胞に AdSOCS1 あるいは AdLacZ を 40MOI で感染させた。タンパク質は 48 時間後に RIPA バッファーを用いて抽出した。免疫沈降は 1 mg のタンパク質と、抗 ATR 抗体 (N-19, 1:200; Santa Cruz Biotechnology) を混合し 4 度で一晩反応させた。その後、Protein G SepharoseTM 4 Fast Flow (GE Healthcare Japan Corporation, Tokyo, Japan) を添加し、4 度で 1 時間反応させた。ビーズを RIPA バッファーで 5 回洗浄し、30 μl の 2× SDS-PAGE sample バッファーを加えて 95 度で 5 分間加熱することで溶出し、ウェスタンブロット解析に用いた。

(6) siRNA トランスフェクション

siRNA ON-TARGET Plus SMART pools は Thermo Scientific Dharmacon: nontargeting (D-001810-10-20)、ATR (L-003202-00-0010) より購入した。siRNAs は siRNA バッファー

(GE Healthcare)に 20 μM のストックとなるように溶解した。細胞を 12 ウェルプレートに 1.0 × 10^5cells/well となるように 1 ml (RPMI1640 培地、10%血清含有、抗生物質フリー) ずつ播種した。翌日 Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて細胞に siRNA をトランスフェクションした。

12 pmol の siRNA を 100 μl の Opti-MEM I Reduced Serum Medium で希釈した。別のチューブに Lipofectamine RNAiMAX (2.5 μl)を 100 μl の Opti-MEM I Reduced Serum Medium で希釈した。希釈した siRNA duplex を希釈した Lipofectamine RNAiMAX と混合し、15 分インキュベートし、12 ウェルプレートの細胞にトランスフェクションした(12 ウェルプレート 1 ウェル当たり、siRNA 12 pmol と Lipofectamine RNAiMAX 2.5 μl を用いた)。24 時間後に細胞は AdSOCS1 あるいは AdLacZ を感染させ、アデノウイルスベクターを 24 時間感染させた後にタンパク質抽出を行いウェスタンブロット解析に用いた。

(7) 統計解析

統計解析はカイ二乗検定、 ウェルチの t 検定、 Mann-Whitney U 検定を用いた。多群解析では一元配置分散分析による解析と多重比較は Scheffe 法により行った。p 値は両側で 0.05 未満を有意差有りとした。

C．研究結果

結果は D 項にまとめて記載した。

D．結果・考察

SOCS-1 の作用機序に関する検討を進めた。その結果、癌細胞株(MKN45, AGS, KATO-III)に SOCS-1 を強制発現させるとコントロールの AdLacZ と比較して細胞増殖抑制効果を示した(図 1.a)。AdSOCS-1 の強制発現は STAT3 の自己リン酸化を阻害することも確認された(図 1.b)。AdSOCS-1 による抗腫瘍効果を調べるため、細胞周期解析を行った。その結果、SOCS-1 の強制発現は G2/M 期で各種癌細胞株(MKN-45, AGS, KATO-III)の細胞周期を停止させることを明らかにした(図 2a)。SOCS-1 の強制発現による G2/M 期での細胞周期停止についての詳細な機序解析について、G2/M 期での細胞周期制御に関与するタンパク質をウェスタンブロット解析することで行った。その結果、コントロールの AdLacZ 感染細胞と比較し AdSOCS-1 感染細胞では、Chk2 の Thr68 のリン酸化増強、CDC25c の Thr48 リン酸化状況、cdc2 の Thr161 リン酸化低下、Tyr15 リン酸化低下を誘導することが明らかとなった(図 2b)。

SCOS-1 強制発現によりなぜ Chk2 の Thr68 のリン酸化増強が誘導されるかを明らかにするため、Chk2 をリン酸化するキナーゼである ATR と SOCS1 との相互作用を検討した。MKN45 細胞に AdLacZ あるいは AdSOCS-1 を感染させ、抗 ATR 抗体で共免疫沈降を行った結果、AdLacZ 感染細胞と比較し AdSOCS-1 感染細胞では、SOCS-1 および p53 の共免疫沈降が確認された(図 3a)。さらに、ATR の発現を siRNA でノックダウンしたとき、SOCS-1 の強制発現において、Chk2 の Thr68 のリン酸化の増強が認められないことも明らかにした(図 3b)。このとき、細胞周期解析の結果から SOCS-1 強制発現により誘導される G2/M 期での細胞周期停止の誘導も ATR の発現をノックダウンさせたときには認められなくなっていた(図 3c)。このことから、SOCS-1 の強制発現による G2/M 期での細胞周期停止の誘導には SOCS-1 と ATR の相互作用を介したシグナル伝達経路が関与していることが明らかとなった(論文投稿中)。

E．結論

本研究にて、SOCS-1 が ATR と結合し、Chk2 のリン酸化増強を介して G2/M 期での細胞周期停止を誘導する事を新たに発見した(論文投稿中)。これらの結果を SOCS-3 でも検証している。

現在、SOCS分子の強制発現による抗腫瘍効果を発揮しやすいバイオマーカーを同定すべく研究を進めている。このようなバイオマーカーをコンパニオン診断薬として活用し、医師主導治験時に治療奏功性の高い患者の選択を評価する。さらに、薬効を引き出すのに適したベクター投与量を決定すべく、悪性胸膜中皮腫同所移植モデルを用いて用量探索試験も実施中である。

F．健康危険情報

該当無し。

G．研究発表

G-1. 論文発表

1. Furukawa K, Kawamoto K, Eguchi H, Tanemura M, Tomimaru Y, Akita H, Hama N, Wada H, Kobayashi S, Nonaka Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Kumada T, Satomura S, Ito T, Serada S, **Naka T**, Mori M, Doki Y, Miyoshi E, Nagano H. Clinico-Pathological Significance of Leucine-Rich Alpha-2-Glycoprotein-1 in Sera of Patients with Pancreatic Cancer. Pancreas. 2015 Jan ;44(1):93-98.

2. Yang L, Fujimoto M, Murota H, Serada S, Fujimoto M, Honda H, Yamada K, Suzuki K, Nishikawa A, Hosono Y, Yoneda Y, Takehara K, Imura Y, Mimori T, Takeuchi T, Katayama I, **Naka T**. Proteomic identification of heterogeneous nuclear RNP-K as a novel cold-associated autoantigen in patients with secondary Raynaud's phenomenon. Rheumatology. 2014 In Press.

3. Kawabata A, Serada S, **Naka T**, Mori Y. Human herpesvirus 6 gM/gN complex interacts with v-SNARE in infected cells. J Gen Virol 2014 Dec;95(Pt 12):2769-77.

4. AzumaK, Serada S, Takamatsu S, Terao N, Takeishi S, Kamada Y, **Naka T**, Miyoshi E. Identification of sialylated glycoproteins in doxorubicin-treated hepatoma cells with glycoproteomic analyses. J Proteome Res 2014 Nov 7;13(11):4869-77.

5. Morimoto A, Serada S, Enomoto T, Kim A,Matsuzaki S, Yokoyama T, Takahashi T, Ueda Y, Yoshino K, Fujita M, Fujimoto M, Kimura T, **Naka T**. Annexin A4 induces platinum resistance in a chloride- and calcium-dependent manner. Oncotarget. 2014 Sep 15;5(17):7776-87.

6. Kotobuki Y, Yang L, Serada S, Tanemura A, Yang F, Nomura S, Kudo A, Izuhara K, Murota H, Fujimoto M, Katayama I, **Naka T**. Periostin Accelerates Human Malignant Melanoma Progression by Modificating the Melanoma Microenvironment. Pigment Cell Melanoma Res. 2014 Jul;27(4):630-9.

7. Oji Y, Tatsumi N, Fukuda M, Nakatsuka S, Aoyagi S, Hirata E, Nanchi I, Fujiki F, Nakajima H, Yamamoto Y, Shibata S, Nakamura M, Hasegawa K, Takagi S, Fukuda I, Hoshikawa T, Murakami Y, Mori M, Inoue M, **Naka T**, Tomonaga T, Shimizu Y, Nakagawa M, Hasegawa J, Nezu R, Inohara H, Izumoto S, Nonomura N, Yoshimine T, Okumura M, Morii E, Maeda H, Nishida S, Hosen N, Tsuboi A, Oka Y, Sugiyama H. The translation elongation factor eEF2 is a novel tumor-associated antigen overexpressed in various types of cancers. Int J Oncol. 2014

May;44(5):1461-9.

8. Yang L, Murota H, Serada S, Fujimoto M, Kudo A, **Naka T**, Katayama I. Histamine Contributes to Tissue Remodeling via Periostin Expression. J Invest Dermatol. 2014 Aug;134(8):2105-13.

9. Matsuzaki S, Enomoto T, Serada S, Yoshino K, Nagamori S, Morimoto A, Yokoyama T, Kim A, Kimura T, Ueda Y, Fujita M, Fujimoto M, Kanai Y, Kimura T, **Naka T**. Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A. Int J Cancer. 2014 Apr 15;134(8):1796-809.

10. Sadaoka T, Serada S, Kato J, Hayashi M, Gomi Y, **Naka T**, Yamanishi K, Mori Y. Varicella-zoster virus ORF49 functions in the efficient production of progeny virus through its interaction with essential tegument protein ORF44. J Virol. 2014 Jan;88(1):188-201.

11. Ota M, Serada S, **Naka T**, Mori Y. MHC class I molecules are incorporated into human herpesvirus-6 viral particles and released into the extracellular environment.
Microbiol Immunol. 2014 Feb;58(2):119-25.

G-2. 学会発表

1. 2014 ACR/ARHP Annual Meeting: November 14 - 19 Boston, Massachusetts. Boston Convention & Exhibition Center.
Leucine-Rich Alpha-2 Glycoprotein Is a Potential Disease Activity Marker Under IL-6 Suppression in Autoimmune Arthritis.
Yusuke Takahashi, Minoru Fujimoto, Satoshi Serada and **Tetsuji Naka**

2. 2014 ICIS: 26th - 29th October 2014 Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne.
Leucine-rich α2 glycoprotein promotes TGFβ1-induced apoptosis in the lewis lung carcinoma cell lines.
Norihiko Takemoto, Tomoshige Matsumoto, Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, **Tetsuji Naka**

3. EULAR2014 Paris: June 14 2014
Measurement of serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein a novel disease activity biomarker in rheumatoid arthritis for the detection of biologic-associated tuberculosis. Tomoharu Ohkawara, Minoru Fujimoto, Satoshi Serada, **Tetsuji Naka.**

H．知的財産権の出願・登録状況

名　称	：食道がんのマーカーおよびその利用
発明者	：仲哲治、世良田聡、藤本穣、豊浦雅義、庄屋雄二
出願人	：独立行政法人 医薬基盤研究所
出願日	：2013 年 12 月 27 日
出願番号	：特願 2013-272085
国際出願番号	：PCT/JP2014/006455
出願日	：2014 年 12 月 25 日

名称	：悪性腫瘍の治療薬
発明者	：**仲哲治**、世良田聡、藤本穣、豊浦雅義、庄屋雄二
出願人	：独立行政法人 医薬基盤研究所

出願日　　　：2013 年 12 月 27 日
出願番号　　：特願 2013-272084
国際出願番号：PCT/JP2014/006456
出願日　　　：2014 年 12 月 25 日

I. 研究協力者

藤本　穣　医薬基盤研究所
　　　　　免疫シグナルプロジェクト
　　　　　主任研究員
世良田聡　医薬基盤研究所
　　　　　免疫シグナルプロジェクト
　　　　　研究員
髙橋　剛　大阪大学大学院
　　　　　医学系研究科
　　　　　消化器外科　助教
中塚梨絵　医薬基盤研究所
　　　　　免疫シグナルプロジェクト
　　　　　大学院生

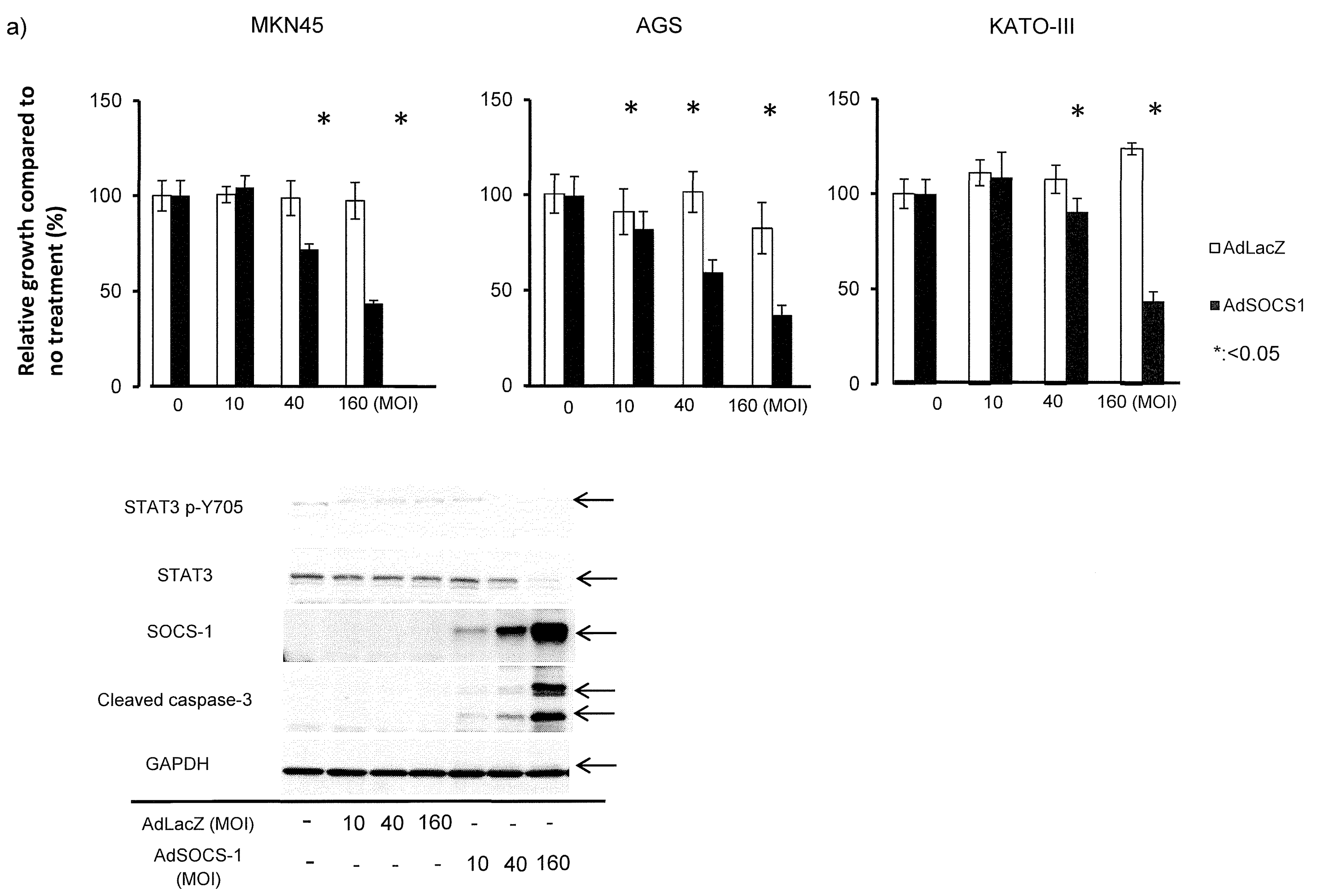


図1. MKN45, AGS, KATO-IIIに対してSOCS-1の強制発現は細胞増殖を抑制する

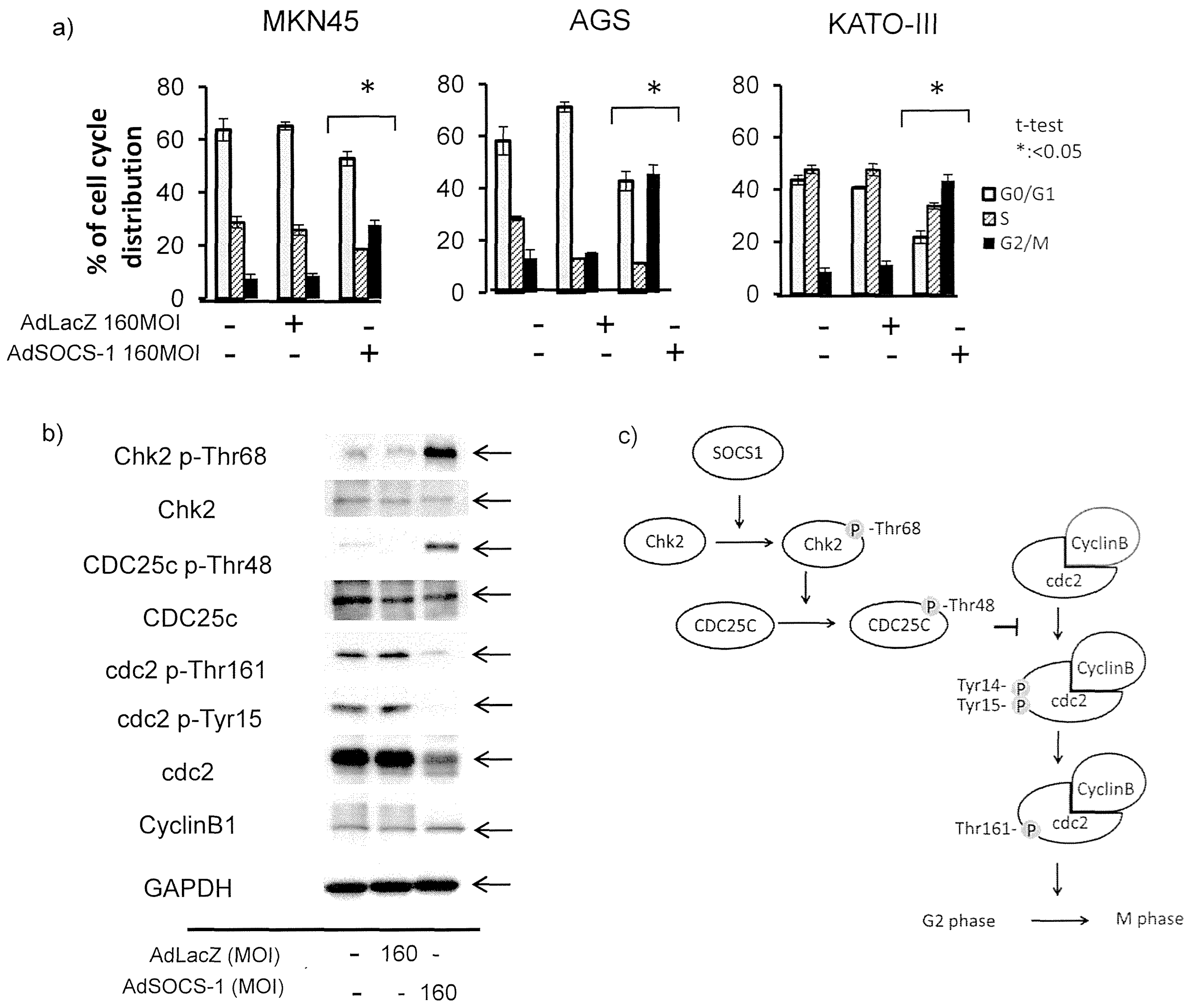


図2. MKN45, AGS, KATO-IIIに対してSOCS-1の強制発現はG2/M期で細胞周期を停止する

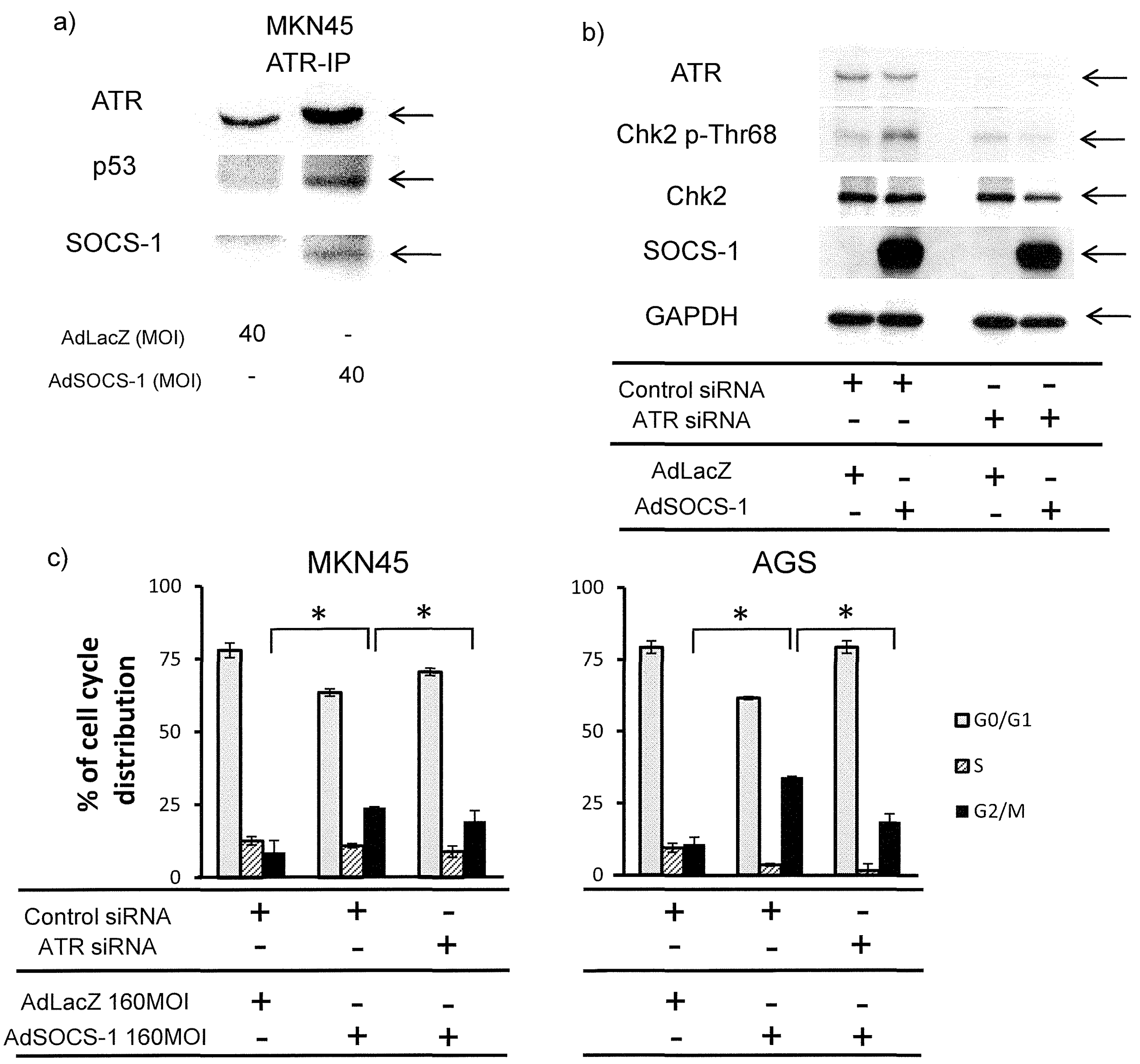


図3. SOCS-1の強制発現はATRを介してG2/M期で細胞周期停止を誘導する

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

悪性胸膜中皮腫に対する新規治療法の開発及び実用化に関する研究

担当責任者　白川利朗　神戸大学大学院保健学研究科　教授

研究要旨

本研究の目的は、5年生存率が3.7%と極めて予後が悪く有効な治療法が確立されていない悪性胸膜中皮腫に対して、業務主任者らが単離したサイトカインシグナル伝達抑制分子(SOCS3)の胸腔内投与による遺伝子治療を世界で初めて実用化するために必要な非臨床試験を達成することである。

悪性胸膜中皮腫は診断が難しいため発見時に進行期である事が多く、放射線療法や化学療法が奏功し難いため、新たな治療法の早急な開発が必要とされている。近年、悪性胸膜中皮腫等の癌において、サイトカインシグナル伝達の異常と発癌や癌細胞の増殖亢進との関係が明らかにされている。SOCS3の細胞内強制発現は、JAK/STAT系以外に、MAPKやFAKなどのシグナル伝達経路も抑制し、p53の活性化も促進するため、SOCS3は癌細胞の増殖や生存シグナルを遮断する革新的抗癌剤としての実用化が期待される。

既に業務主任者らはマウスを用いて、悪性胸膜中皮腫に対するGMP準拠のアデノウイルス(Ad)ベクターを用いたSOCS3 (AdSOCS3) の抗腫瘍効果及びその薬理作用を明らかにし、SOCS3が悪性胸膜中皮腫の新規治療薬として有用である事を報告し(Iwahori K, Naka T et al. 2011 Int J Cancer)、カニクイザルにおける安全性も確認している。さらに、PMDA事前面談（平成24年10月）を踏まえ、追加で実施予定の非臨床試験実施計画に係る対面助言を平成25年6月6日に受け、業務主任者が立案した計画及びプロトコールに対しPMDAから既に了解を得ており、実用化に向けて創薬支援戦略室と相談中である。

本年度においてはAdSOCS3の悪性胸膜中皮腫に対する抗腫瘍効果及びその薬理作用を明らかにする目的で、その一般的な作用機序の解明の目的で、悪性胸膜中皮腫以外の細胞を用いて実験を行った。STAT3を過剰発現するヒト前立腺癌細胞にAdSOCS3を感染させることによりSOCS3を発現させることでき、STAT3の発現を抑制することが可能となった。STAT3の発現を低下することで、強い細胞増殖抑制効果が得られたと考察されたため、JAK/STAT3依存性に増殖を示す癌細胞にAdSOCS3による遺伝子治療が有効であると考えられた。

A.　研究目的

アデノウイルス(Ad)ベクターを用いたSOCS3（AdSOCS3）の悪性胸膜中皮腫に対する抗腫瘍効果及びその薬理作用を明らかにする目的で、その一般的な作用機序の解明の目的で、悪性胸膜中皮腫以外の細胞を用いて実験を行った。

B.　研究方法

ヒト前立腺癌細胞、LNCap を実験に用いた。AdSOCS3のLNCapに対するIn Vitro細胞毒性をAlamar Blueアッセイにて検討した。

またAdSOCS3あるいはAd-LacZ（mock control）を10pfu/cellの濃度でLNCap細胞に感染させた際のSOCS3およびSTAT3の各mRNAの発現の増減を定量的RT-PCR法にて検討した。

C.　研究結果

In Vitro細胞毒性では、AdSOCS3の感染濃度

依存性に細胞毒性が認められた。
（Data not shown）

AdSOCS3 の感染により、LNCap 細胞の SOCS3 mRNA の発現が有意に増強された。
（図１）

AdSOCS3 の感染により、LNCap 細胞の STAT3 mRNA の発現が有意に抑制された。
（図２）

D. 結果・考察

今回、STAT3 を過剰発現するヒト前立腺癌細胞に AdSOCS3 を感染させることにより SOCS3 を発現させることでき、STAT3 の発現を抑制することが可能となった。その結果として強い細胞増殖抑制効果が得られたと考察される。

E. 結論

AdSOCS3 は STAT3 を過剰発現するヒト前立腺癌細胞で強い細胞増殖抑制効果を認め、同様に STAT3 を過剰発現する悪性胸膜中皮細胞に対する増殖抑制効果も期待できる。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

該当無し。

G-2. 学会発表

該当無し。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

I .研究協力者

該当無し。

図１．SOCS3 mRNA の発現量

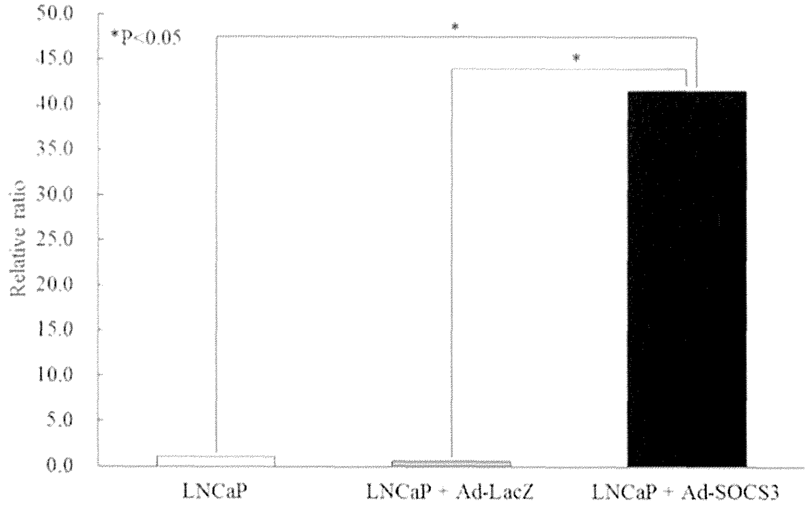
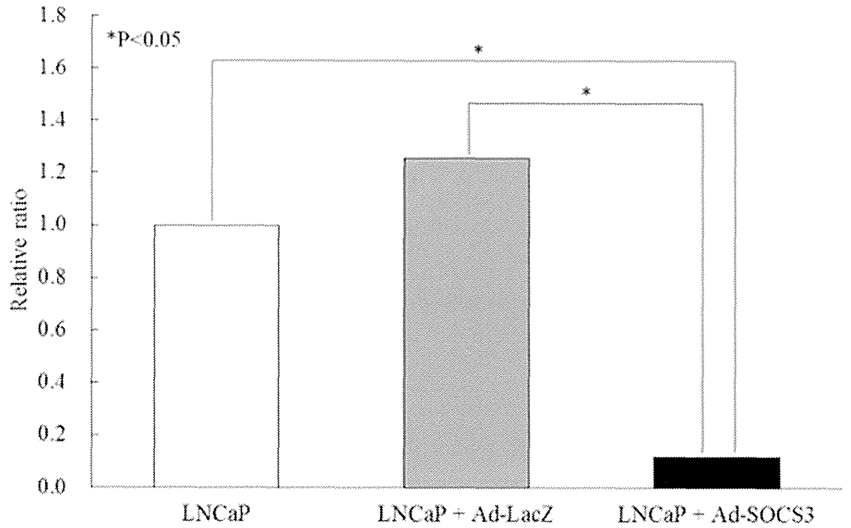


図２．STAT3 mRNA の発現量



厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

GMP 準拠 AdSOCS3 の製造に向けた基礎研究

担当責任者　谷憲三朗　九州大学生体防御医学研究所
九州大学病院先端分子細胞治療科・教授

研究要旨

本研究の目的は、5 年生存率が 3.7%と極めて予後が悪く有効な治療法が確立されていない悪性胸膜中皮腫に対して、業務主任者らが単離したサイトカインシグナル伝達抑制分子(SOCS3)の胸腔内投与による遺伝子治療を世界で初めて実用化するために必要な非臨床試験を達成することである。

悪性胸膜中皮腫は診断が難しいため発見時に進行期である事が多く、放射線療法や化学療法が奏功し難いため、新たな治療法の早急な開発が必要とされている。近年、悪性胸膜中皮腫等の癌において、サイトカインシグナル伝達の異常と発癌や癌細胞の増殖亢進との関係が明らかにされている。SOCS3 の細胞内強制発現は、JAK/STAT 系以外に、MAPK や FAK などのシグナル伝達経路も抑制し、p53 の活性化も促進するため、SOCS3 は癌細胞の増殖や生存シグナルを遮断する革新的抗癌剤としての実用化が期待される。

既に業務主任者らはマウスを用いて、悪性胸膜中皮腫に対する GMP 準拠のアデノウイルス(Ad)ベクターを用いた SOCS3 (AdSOCS3) の抗腫瘍効果及びその薬理作用を明らかにし、SOCS3 が悪性胸膜中皮腫の新規治療薬として有用である事を報告し(Iwahori K, Naka T et al. 2011 Int J Cancer)、カニクイザルにおける安全性も確認している。さらに、PMDA 事前面談（平成 24 年 10 月）を踏まえ、追加で実施予定の非臨床試験実施計画に係る対面助言を平成 25 年 6 月 6 日に受け、業務主任者が立案した計画及びプロトコールに対し PMDA から既に了解を得ており、実用化に向けて創薬支援戦略室と相談中である。また、研究代表者はこれまでに東京大学医科学研究所、田原教授との共同研究で GMP 基準に準拠した AdSOCS3 の製造に成功している。AdSOCS3 の非臨床試験にはベクター製造のスケールアップが必要である。

担当責任者は本年度、GMP 準拠 AdSOCS3 の製造に向け、九州大学病院分子細胞調整センター(KU-MCPC)におけるウイルス製造に向けた基盤を整備すると共に、タカラバイオ株式会社にて 293 細胞の拡大培養を実施し、293 細胞のストックを作成中である。さらに、製造されたウイルスの非臨床試験実施を目的に、マウス悪性中皮腫腫瘍モデルの作出を独自に行った。

A. 研究目的

AdSOCS3 の非臨床試験にはベクター製造のスケールアップが必要である。そこで、本年度において、GMP 準拠 AdSOCS3 の製造に向け、九州大学病院分子細胞調整センター(KU-MCPC)におけるウイルス製造に向けた基盤を整備すると共に、製造されたウイルスの抗腫瘍効果検討を目的に、マウス悪性中皮腫腫瘍モデルの作出を独自に行った。

B. 研究方法

１）ウイルス製剤作製のための KU-MCPC における基盤整備：
GMP(GCTP)準拠の品質保証されたウイルス製造工程を構築する。

２)ヒト中皮腫細胞胸腔内播種モデルの作出:
ヒト中皮腫細胞胸腔内播種モデルの作製には、悪性胸膜中皮腫細胞株である MSTO-211H 細胞を American Type Culture Collection (ATCC)

より購入し、ACC-MESO-1 細胞、ACC-MESO-4 細胞を理研バイオリソースセンター（RIKEN BRC）より購入し実験に供した。全ての細胞株は 10 %非働化仔ウシ血清添加 RPMI1640 培地を用いて継代・維持を行った。麻酔下の BALB-c nu/nu マウスに対し、適切な角度に屈曲した注射針を用いて、第一肋骨と第二肋骨の間から 1×10^6 個（MSTO-211H 細胞）又は 5×10^6 個（ACC-MESO-1 細胞、ACC-MESO-4 細胞）の悪性胸膜中皮細胞を胸腔内に投与した。投与後、2 日毎に体重測定を行い、経過観察を行った。著しく体重減少が見られた日にヌードマウスの解剖を行い、胸腔内の細胞生着の有無を確認した。

C．研究結果

１）ウイルス製剤作製のための KU-MCPC における基盤整備：

本年度においては、バリデートされた限外ろ過装置と超遠心器との独創的なシークエンシャルシステムを構築し、GMP 準拠無菌培養室での大量培養を可能にする閉鎖系回路の組み上げに着手した。電子化された工程管理システムを用いて、GMP 準拠全製造工程において環境モニタリンデータを含む記録管理を実施する体制整備に着手した。ウイルス製剤の力価を含む出荷時品質評価項目の策定を行い、無菌検査、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験等を含む品質検査の実施体制を整備した。さらに、東京大学医科学研究所より 293 マスターセルバンクを提供いただき、タカラバイオ株式会社に輸送した。タカラバイオ株式会社にて 293 細胞の拡大培養を実施し、293 細胞のストックを作成中である。H27 年 2 月に AdSOCS3 をワーキングウイルスとして回収し、H27 年 3 月中に AdSOCS3 の GMP 試験製造を実施する。

２）ヒト中皮腫細胞胸腔内播種モデルの作出:

胸腔内投与後、（著しく）体重減少が見られた 17 日後（MSTO-211H 細胞）及び 30 日後（ACC-MESO-1 細胞、ACC-MESO-4 細胞）に、マウスの解剖を行った。結果、全ての細胞株において悪性胸膜中皮細胞の生着を確認した。中でも MSTO-211H 細胞及び ACC-MESO-1 細胞においては、胸腔内の細胞数の顕著な増加が見られた。本研究において、白人及び日本人由来ヒト中皮腫細胞を用いた同所性胸腔内播種 BALB-c nu/nu マウスモデルの作出に成功し、本モデルマウスは製造されたウイルスの薬理効果試験及び毒性試験に有用であると考えられる。

D．結果・考察

KU-MCPC における GMP 準拠ウイルス製剤作製のための基盤整備は今後の研究代表者のアデノウイルス(Ad)ベクター作製に止まらず、広範なウイルスベクターもしくはウイルス製剤作製への基盤技術となるものと期待できる。またタカラバイオ社では H27 年 2 月に AdSOCS3 をワーキングウイルスとして回収し、H27 年 3 月中に AdSOCS3 の GMP 試験製造を実施するための研究を実施中である。またヒト中皮腫細胞胸腔内播種モデルの作出も研究代表者の目指す悪性中皮腫遺伝子治療非臨床試験研究を実施して行く上で極めて役立つ情報を提供できるものと期待される。

E．結論

本研究にて、AdSOCS3 の増幅に必要となる 293 マスターセルバンクの入手、細胞ストック作成に着手した。当初の予定通り、H27 年 3 月末までに AdSOCS3 の GMP 試験製造を完了する予定である。また本製剤を用いた非臨床試験研究実施に向けた基礎研究も順調に進めることができた。

F．健康危険情報

該当無し。

G．研究発表

G-1. 論文発表

1. Inoue H, **Tani K.** Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments.Cell Death Differ. 21:39-49, 2014

2. Yamaguchi S, Marumoto T, Nii T, Kawano H, Liao J, Nagai Y, Okada M, Takahashi A, Inoue H, Sasaki E, Fujii H, Okano S, Ebise H, Sato T, Suyama M, Okano H, Miura Y, **Tani K.** Characterization of common marmoset dysgerminoma like tumor induced by the lentiviral expression of reprogramming factors.Cancer Sci. 105:402-408, 2014.

3. Nii T, Marumoto T, Kawano H, Yamaguchi S, Liao J, Okada M, Sasaki E, Miura Y, **Tani, K.** Analysis of essential pathways for self-renewal in common marmoset embryonic stem cells. FEBS Open Bio. 4:213-219, 2014.

4. Narusawa M, Inoue H, Sakamoto C, Matsumura Y, Takahashi A, Inoue T, Watanabe A, Miyamoto S, Miura Y, Hijikata Y, Tanaka Y, Inoue M, Takayama K, Okazaki T, Hasegawa M, Nakanishi Y , **Tani K.** TLR7 ligand augments GM-CSF-initiated antitumor immunity through activation of plasmacytoid dendritic cells. Cancer Immunol Res. 2:568-580, 2014 .

5. Hamada K, Shirakawa T, Terao S, Gotoh A, **Tani K,** Huang W. Biosafety studies of carrier cells infected with a replication-competent adenovirus introduced by IAI.3B promoter. Mol Ther Meth Clin Develop. 2014 In Press.

G-2. 学会発表

1. **Kenzaburo Tani.** Our immune and gene therapy trials towards conquering cancers. Morning Lecture 6, The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 26 September, 2014.Yokohama.

2. **Kenzaburo Tani.** Our immune and gene therapy trials to conquer cancers シンポジウム１、癌免疫療法の現状と展望、第 27 回日本バイオセラピィ学会学術集会総会、12 月４日、大阪

H．知的財産権の出願・登録状況

【特許申請】

1. 新規腫瘍溶解性ウイルス
出願番号：61/315129
出 願 日：2012-04-19
発 明 者：谷憲三朗、井上博之、安成啓祐、宮本将平

2. 医薬組成物
出願番号：PCT/JP2013/061686
出 願 日：2013/4/19
発 明 者：井上　博之、谷　憲三朗

3. RECOMBINANT COXACKIEVIRUS
出願番号：61/812943
出 願 日：2013/4/17
発 明 者：谷　憲三朗

I.　研究協力者

岡崎利彦、宮本将平

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

悪性胸膜中皮腫に対する新規治療法の開発及び実用化に関する研究

担当責任者　金田安史　大阪大学大学院　医学系研究科　遺伝子治療学　教授

研究要旨

本研究の目的は、5 年生存率が 3.7%と極めて予後が悪く有効な治療法が確立されていない悪性胸膜中皮腫に対して、業務主任者らが単離したサイトカインシグナル伝達抑制分子(SOCS3)の胸腔内投与による遺伝子治療を世界で初めて実用化するために必要な非臨床試験を達成することである。

悪性胸膜中皮腫は診断が難しいため発見時に進行期である事が多く、放射線療法や化学療法が奏功し難いため、新たな治療法の早急な開発が必要とされている。近年、悪性胸膜中皮腫等の癌において、サイトカインシグナル伝達の異常と発癌や癌細胞の増殖亢進との関係が明らかにされている。SOCS3 の細胞内強制発現は、JAK/STAT 系以外に、MAPK や FAK などのシグナル伝達経路も抑制し、p53 の活性化も促進するため、SOCS3 は癌細胞の増殖や生存シグナルを遮断する革新的抗癌剤としての実用化が期待される。

既に業務主任者らはマウスを用いて、悪性胸膜中皮腫に対する GMP 準拠のアデノウイルス(Ad)ベクターを用いた SOCS3 (AdSOCS3) の抗腫瘍効果及びその薬理作用を明らかにし、SOCS3 が悪性胸膜中皮腫の新規治療薬として有用である事を報告し(Iwahori K, Naka T et al. 2011 Int J Cancer)、カニクイザルにおける安全性も確認している。さらに、PMDA 事前面談（平成 24 年 10 月）を踏まえ、追加で実施予定の非臨床試験実施計画に係る対面助言を平成 25 年 6 月 6 日に受け、業務主任者が立案した計画及びプロトコールに対し PMDA から既に了解を得ており、実用化に向けて創薬支援戦略室と相談中である。

悪性胸膜中皮腫の根治には、単剤ではなく異なる作用機序により抗腫瘍効果を発揮する抗癌剤を組み合わせた薬剤の併用が効果的であると考えられている。担当責任者が開発した HVJ-E は樹状細胞の成熟化、NK 細胞の活性化や CTL の惹起、制御性 T 細胞の抑制などの多彩な抗腫瘍免疫の活性化が可能であるだけでなく、腫瘍に直接的な細胞死を誘導する抗癌剤として開発を進めている。そこで本年度において担当責任者は悪性胸膜中皮腫細胞株に対して AdSOCS3 と HVJ-E を併用することによる抗腫瘍効果の検討を *in vitro* で行った。この結果は、将来的に AdSOCS3 と HVJ-E の併用療法の臨床応用につながると考えられる。

A. 研究目的

研究初年度である本研究において研究代表者は、HVJ-E を併用することによる AdSOCS3 の抗腫瘍効果の増強効果を解明することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 細胞

H226, H28, H2452 は ATCC より購入入手した。MESO-4 は RIKEN より購入した。EHMES-1 は愛媛大学の濱田先生より提供して頂いた。細胞は RPMI1640 培地に 10% FBS、100 units/mL ペニシリン G、100 μg/mL ストレプトマイシン硫酸塩を添加した培地にて、37 度、5% CO_2 インキュベーターで培養した。