様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：１２１０２
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2010～2012
課題番号：22590755
研究課題名（和文）　癌選択的増殖型アデノウイルスを用いた胆道癌の遺伝子化学療法の有効性と安全性の評価
研究課題名（英文）　Evaluation of efficacy and safety of gene-chemotherapy for biliary cancers using oncolytic adenovirus armed with UPRT.
研究代表者
安部井　誠人（ABEI MASATO）
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：20261802

研究成果の概要（和文）：
腫瘍融解ウイルスとその遺伝子治療への応用は，癌の革新的治療法として期待されているが，宿主の抗ウイルス免疫を克服する課題を有する。本研究では，UPRT 遺伝子搭載腫瘍融解アデノウイルス(Ad)が，in vitro でハムスター胆嚢癌，膵癌の細胞内で，in vivo でも膵癌同種皮下移植腫瘍内で，良好に増殖し UPRT 発現により癌の 5-FU 感受性を著明に増強すること，さらに高容量や臨床容量の免疫抑制剤サイクロフォスファマイド(CP)の併用が，血清抗 Ad 抗体産生を抑制，同ウイルスの腫瘍内での増殖と UPRT 発現を亢進し，抗腫瘍効果をさらに増強すること，を示した。本ウイルスを用いた遺伝子化学療法の有効性と安全性，さらに CP が有効な遺伝子武装腫瘍融解ウイルス療法のための宿主の抗ウイルス免疫の克服に有効であることが初めて判明した。

研究成果の概要（英文）：
Oncolytic viruses offer great promise as cancer therapeutics, but host antiviral immunity must be overcome for their efficacy.　In this study, we demonstrated the efficacy and safety of an oncolytic adenovirus (OAd) expressing uracil phosphoribosyltransferase (UPRT), which greatly enhances the sensitivity of cancer cells to 5-fluorouracil, and further enhancement of this efficacy by a high-dose or clinically-approved safe dose of the immunosuppressive agent cyclophosphamide (CP) in Syrian hamsters with or without preexisting immunity.　This is the first study demonstrating enhancement by CP of the efficacy of an OAd armed with a therapeutic gene in Ad-permissive immunocompetent animals, indicating the ability of CP to overcome the hurdle of antiviral immunity for effective virus-gene therapy.

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２０１０年度	1,400,000	420,000	1,820,000
２０１１年度	1,000,000	300,000	1,300,000
２０１２年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総　計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：消化器内科学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学
キーワード：　腫瘍融解ウイルス，遺伝子治療，アデノウイルス，サイクロフォスファマイド

１．研究開始当初の背景

(1) 腫瘍融解ウイルスを用いた癌の遺伝子治療

癌細胞選択的に増殖し癌を融解壊死させる腫瘍融解アデノウイルスは，欧米の臨床試験において画期的有効性が認められ，近年，中国では世界初の遺伝子治療薬として承認され，注目されている。また，腫瘍融解ウイルスは，癌の遺伝子治療用の基盤ベクターとしても注目されている（遺伝子武装腫瘍融解ウイルス)。

これまで研究代表者らは，抗癌剤 5-FU の効果を増強する酵素 Uracil phosphoribosyltransferase (UPRT)に注目し，その遺伝子を搭載した腫瘍融解アデノウイルスが，担癌ヌードマウスにおいて癌の 5-FU 感受性を著明に増強すること(遺伝子化学療法)を明らかにしてきた（*Seo E, et al. Cancer Res. 2005:65;546-52*)。

しかし，ヌードマウスはアデノウイルスの感染宿主ではなく免疫不適格なため，本治療法の有効性と安全性の評価は不十分であった。

近年，シリアンハムスターが，アデノウイルスの感染宿主であり，腫瘍融解アデノウイルスの有効性と安全性の評価に適切な動物であることが明らかにされたが，UPRT 遺伝子武装腫瘍融解アデノウイルスの効果は検討されていない。

(2) 癌の遺伝子治療の課題：抗ウイルス免疫の克服

一方，最近，癌の遺伝子治療の課題として，宿主の抗ウイルス免疫を克服する必要があることが指摘されている。

サイクロフォスファマイド(以下，CP)は，免疫抑制剤・抗癌剤として広く臨床で使用されている薬剤であるが，最近，CP による、免疫抑制が種々の腫瘍融解ウイルスの効果を増強することが報告されている。

しかし，治療遺伝子を搭載した腫瘍融解ウイルスの抗腫瘍効果に対する CP の効果は全く不明である。

２．研究の目的

(1) 本研究では，UPRT 遺伝子搭載 E1 変異アデノウイルスを用いた遺伝子化学療法の臨床応用を視野に入れ，アデノウイルスの感染宿主かつ免疫適格なシリアンハムスターの胆嚢癌(KIGB-5)，膵癌(HaP-T1)の同種担癌モデルを用い，UPRT 遺伝子搭載 E1 変異アデノウイルスの有効性と安全性を検証することを，当初の目的とした。

(2) また，研究の過程において，さらに免疫抑制剤 CP の併用効果をも実験的に検証することが，第二の研究目的として追加された。

３．研究の方法

(1)材料：

①細胞

HaP-T1 (ハムスター膵臓癌細胞)

KIGB-5(ハムスター胆嚢癌細胞)

Panc-1（ヒト膵臓癌細胞）

Mia Paca2（ヒト膵臓癌細胞）

44TKB（ヒト胆道癌細胞）

Sk-CHA1（ヒト胆道癌細胞）

②アデノウイルス

AxE1CAUP（UPRT 搭載腫瘍融解アデノウイルス）

AxCAZ3（LacZ 発現アデノウイルス）

(2)方法

①In vitro 実験

・癌細胞におけるアデノウイルス受容体(CAR)，UPRT の発現を Western blot 法により確認した。

・アデノウイルスによる癌細胞への遺伝子導入効率を LacZ 発現アデノウイルスの感染後，β gal assay により検討した。

・癌細胞におけるアデノウイルスの増殖を定量 PCR 法により検討した。

・癌細胞の 5-FU 感受性を WST-1 法により検討した。

②In vivo 実験

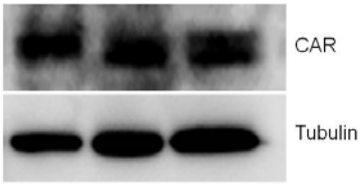
1)シリアンハムスターの両側腹部に同種 HaP-T1 皮下腫瘍を作成し，片側腫瘍にのみ AxE1CAUP を腫瘍内注入した後,高容量CP,5-FU を腹腔内投与し，腫瘍径，体重を観察した。対側腫瘍の増大から抗腫瘍免疫を評価した。一部の動物では血清抗 Ad 抗体価を測定，また腫瘍内の AxE1CAUP の存在（E1A 免疫染色)，UPRT 発現（リアルタイム PCR，Western blot）を検討した。

2)あらかじめハムスターを AxE1CAUP で免疫(筋注)した後（Preimm 群)，AxE1CAUP/5-FU 療法を行い，既存免疫のない群（Nonimm 群）と比較した。また，臨床容量の中等量 CP(37 mg/kg：ヒト換算 5 mg/kg，週 2 回)の同時投与が，Preimm 群，Nonimm 群における治療効果を増強するか否かを検討した。

４．研究成果

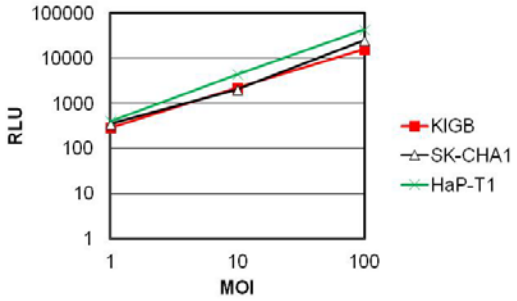
(1) In vitro 実験

①ハムスター癌細胞における CAR の発現を Western blot 法により確認した。

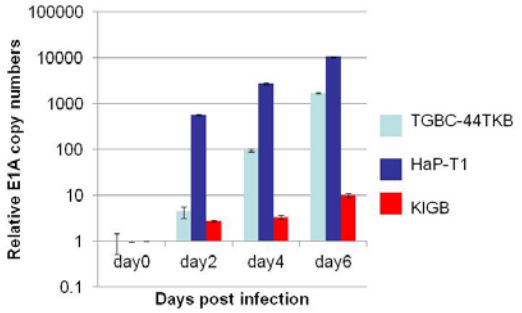


KIGB-5, HaP-T1, SK-CHA1

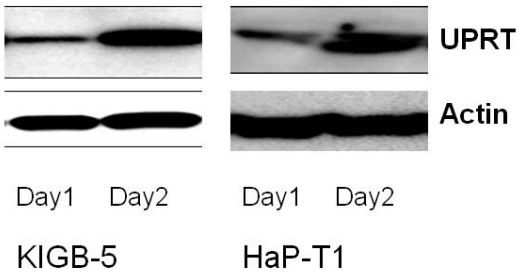
②ハムスター癌細胞において，アデノウイルスが良好に感染し，LacZ を発現することをβ gal assay で確認した。



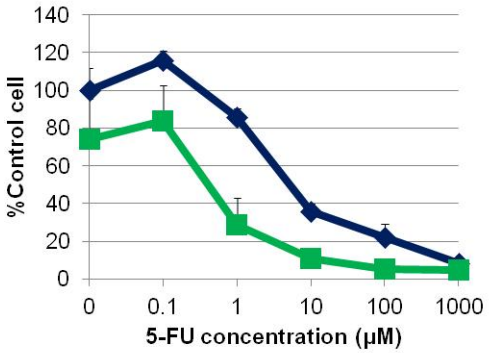
③ハムスター癌細胞において，AxE1CAUP が良好に増殖することを Real time PCR 法で確認した。



④ハムスター癌細胞において，AxE1CAUP が良好に UPRT 蛋白を発現することを Western blot 法で確認した。

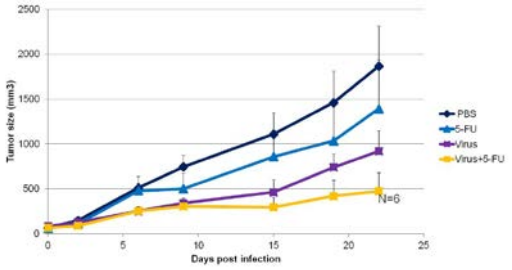


⑤AxE1CAUP に感染後、ハムスター膵臓癌細胞 HaP-T1 の 5-FU に対する感受性が増強した。



(2)ハムスターHaP-T1 膵癌細胞の同種皮下腫瘍モデルを用いた in vivo 実験：UPRT 遺伝子搭載腫瘍融解アデノウイルス AxE1CAUP・5-FU 併用遺伝子化学療法の効果と安全性

●AxE1CAUP・5-FU 併用遺伝子化学療法の抗腫瘍効果

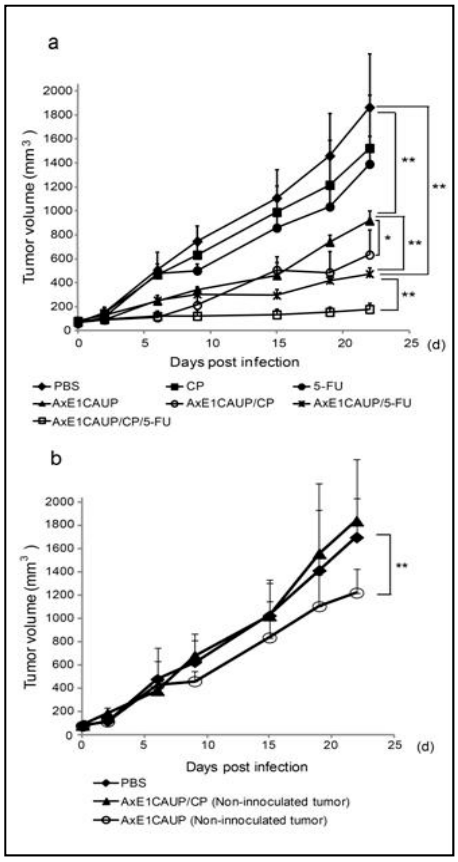


AxE1CAUP・5-FU 併用療法は PBS・AxE1CAUP 単独・5-FU 単独と比較して有意に腫瘍増殖を抑制した。治療経過中，PBS 群，AxE1CAUP 単独群，5-FU 単独群，AxE1CAUP/5-FU 併用群における体重変化に有意差は認められなかった。

(3)ハムスターHaP-T1 膵癌細胞の同種皮下移植腫瘍モデルを用いた in vivo 実験：免疫抑制剤サイクロフォスファマイド(CP)の併用によるさらなる抗腫瘍効果の増強

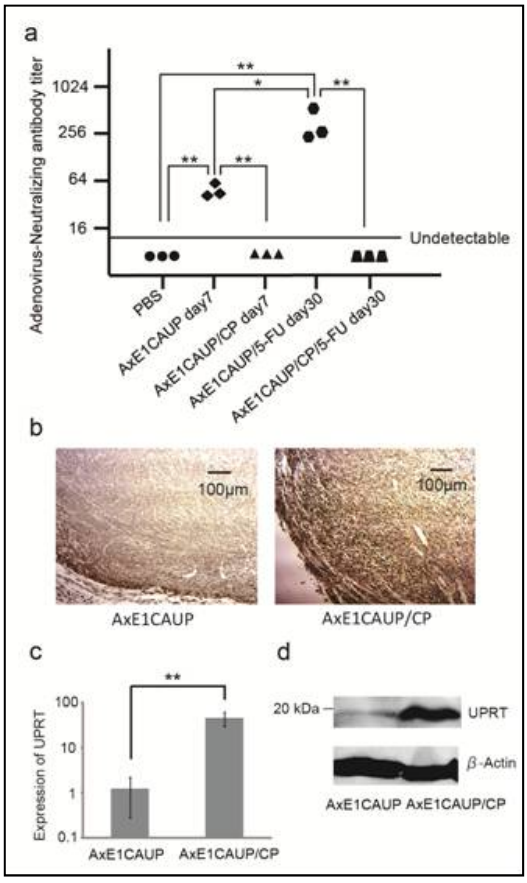
①高容量 CP：

●AxE1CAUP/5-FU/高容量 CP の抗腫瘍効果



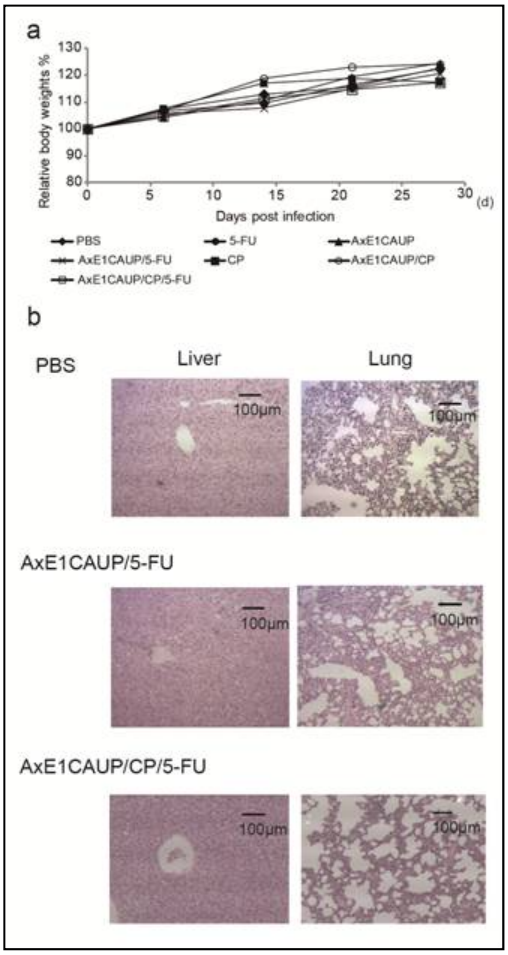
ハムスターHaP-T1 皮下移植腫瘍において，AxE1CAUP/5-FU 併用療法は，PBS 群，AxE1CAUP 群に比し有意(P<0.01)に強く腫瘍増殖を抑制した(a)。さらに高容量 CP を追加すると，CP 非追加群に比し有意(P<0.01)にさらに強く腫瘍増殖を抑制した(a)。AxE1CAUP 群の対側腫瘍も，PBS 群の対側腫瘍に比し有意(P<0.01)に増殖抑制されたが，この全身的抗腫瘍効果は AxE1CAUP/CP 併用群ではみられなかった(b)。

●中和抗体，AxE1CAUP 増殖，UPRT 発現解析



(a)AxE1CAUP/CP 群では，血清抗 Ad 中和抗体が抑制された。
(b)AxE1CAUP/CP 群では，腫瘍内の Ad 増殖が促進したことを抗 E1A 抗体による免疫染色で確認した。
(c)AxE1CAUP/CP 群では，腫瘍内の UPRT mRNA の発現が増加したことを Real time RT-PCR により確認した。
(d)AxE1CAUP/CP 群では，腫瘍内の UPRT 蛋白の発現が増加したことを Western blot 法により確認した。

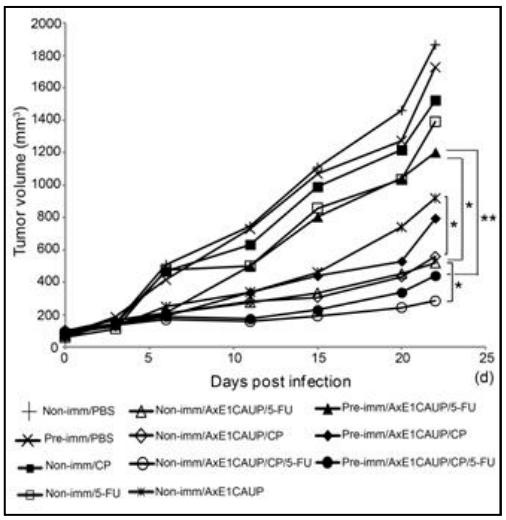
●治療中の副作用（体重，組織）の評価



AxE1CAUP/5-FU/高容量 CP 治療中，体重減少や肝，肺の組織障害はみられなかった。

②中等量 CP：

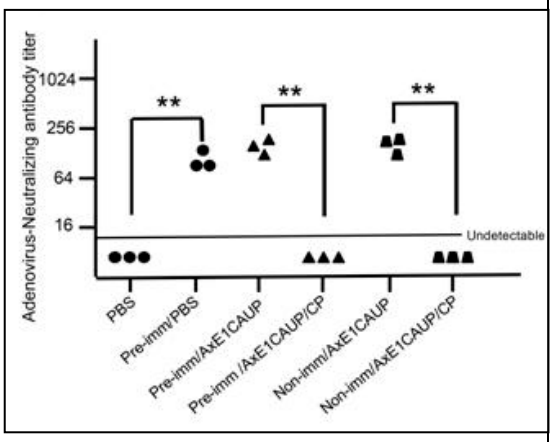
●AxE1CAUP/5-FU/中等量 CP 併用および既存免疫の抗腫瘍効果に与える影響



臨床容量の中等量 CP の併用でも

AxE1CAUP/5-FU の抗腫瘍効果は有意(P<0.05)に増強した。AxE1CAUP/5-FU の抗腫瘍効果は，Preimm 群では Nonimm 群に比し有意(P<0.05)に減弱したが，臨床容量の CP を併用したところ，Preimm 群でも CP 非投与群に比し有意(P<0.01)に増強した。

●中等量 CP による中和抗体産生抑制



中等量 CP(37 mg/kg：ヒト換算 5 mg/kg, 週 2 回)により既存免疫の有無にかかわらず，抗アデノウイルス中和抗体の産生は抑制された。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

(1) 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. 印刷中, 2013, DOI：10.1002/ijc.28132. PMID: 23444104, 査読有

(2) Kawashima R, Abei M, Fukuda K, Nakamura K, Murata T, Wakayama M, Seo E, Hasegawa N, Mizuguchi H, Obata Y, Hyodo I, Hamada H, Yokoyama KK. EpCAM- and EGFR- targeted selective gene therapy for biliary cancers using Z33-fiber modified adenovirus. Int. J. Cancer 129 巻, 2011, 1244-1253, 査読有

〔学会発表〕（計 10 件）

(1) 長谷川直之，安部井誠人，福田邦明，**兵頭一之介.** UPRT 遺伝子武装腫瘍融解アデノウイルスを用いた膵癌の遺伝子化学療法の基礎的検討 (1)：免疫適格同種ハムスター膵癌モデルにおける有効性と安全性の評価 第 99 回日本消化器病学会総会, 2013 年 3 月 21 日 かごしま県民交流センター，鹿児島

(2) 長谷川直之，安部井誠人，**福田邦明**，**兵頭一之介.** UPRT 遺伝子武装腫瘍融解アデノウイルスを用いた膵癌の遺伝子化学療法の基礎的検討 (2)：シクロフォスファミドによる免疫抑制との併用効果 第 99 回日本消化器病学会総会，2013 年 3 月 21 日，かごしま県民交流センター，鹿児島

(3) Hasegawa N, **Abei M**, Fukuda K, Seo E, Wakayama M, Kawashima R, Hamada H, Yokoyama KK, Obata Y, Hyodo I. Immunosuppression enhances the Efficacy of oncolytic adenovirus-mediated uracil phosphoribosyl Transferase (UPRT)/ 5-fluorouracil suicide gene therapy in immunocompetent adenovirus permissive Syrian hamsters, 2012 国際癌遺伝子・細胞治療学会(ISCGT), 2012 年 10 月 4 日, フラマホテル，シンガポール.

(4) Abei, M, **Hyodo I**, Kirn DH. Targeted and armed oncolytic vaccinia virus JX-594 for treating advanced liver cancers: Recent advances in global clinical trials and our clinical trial plan in Japan. 第 18 回日本遺伝子治療学会総会, 2012 年 6 月 30 日, 熊本テルサ, 熊本.

(5) Hasegawa N, Abei M, Fukuda K, Kawashima R, Seo E, Wakayama M, Hamada H, Yokoyama KK, Obata Y, Hyodo I. Efficacy and safety of oncolytic adenovirus combined with UPRT/5-FU suicide gene system: Evaluation in syngenic pancreas cancer model in immunocompetent, adenovirus-permissive Syrian hamsters. 第 18 回日本遺伝子治療学会総会, 2012 年 6 月 29 日, 熊本テルサ, 熊本.

(6) 安部井誠人，福田邦明，奥村敏之. 胆管細胞癌に対する標的化遺伝子治療と陽子線治療の研究. ワークショップ 15 胆管細胞癌の現状と展開. 第 48 回日本肝臓学会総会，2012 年 6 月 7 日，ホテル日

航金沢，金沢.

(7)Hasegawa N, Abei M, Fukuda K, Seo E, Wakayama M, Kawashima R, Murata T, Hamada H, Yokoyama KK, Obata Y, Hyodo I. Efficacy and safety of gene-chemo therapy using oncolytic adenovirus expressing uracil phosphoribosyl transferase (UPRT) followed by 5-fluorouracil administration in syngenic pancreatic and biliary cancers in immunocompetent adenovirus permissive Syrian hamsters. 第 15 回米国遺伝子・細胞治療学会，2012 年 5 月 17 日，ペンシルベニア・コンベンションセンター，フィラデルフィア，アメリカ合衆国。

(8)Abei M. Introduction to oncolytic virus therapy as novel cancer therapeutics. 第 4 回 West Japan Oncology Group International Symposium on Clinical Trial，2012 年 4 月 7 日，福岡ヒルトンホテル，福岡.

(9)Abei M, Kawashima R, Fukuda K, Nakamura K, Murata T, Yokoyama KK, Hamada H, Hyodo I. EpCAM and EGFR-targeted selective gene therapy for biliary cancers using Z33-fiber modified adenovirus. 第 16 回日本遺伝子治療学会総会，2010 年 7 月 2 日，栃木県総合文化センター，宇都宮.

(10)安部井誠人. 癌遺伝子治療研究の最近の動向：腫瘍融解ウイルス療法の概念，現状と将来展望. 特別講演. 第 28 回日本ヒト細胞学会,2010 年 8 月 30 日，研究交流センター，つくば.

６．研究組織

(1)研究代表者

安部井　誠人（ABEI MASATO）
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：20261802

(2)研究分担者

兵頭　一之介（HYODO ICHINOSUKE）
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：60416469
福田　邦明（FUKUDA KUNIAKI）
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：50447257
濱田　洋文（HAMADA HIROFUMI）
東京薬科大学・生命科学部・教授
研究者番号：00189614