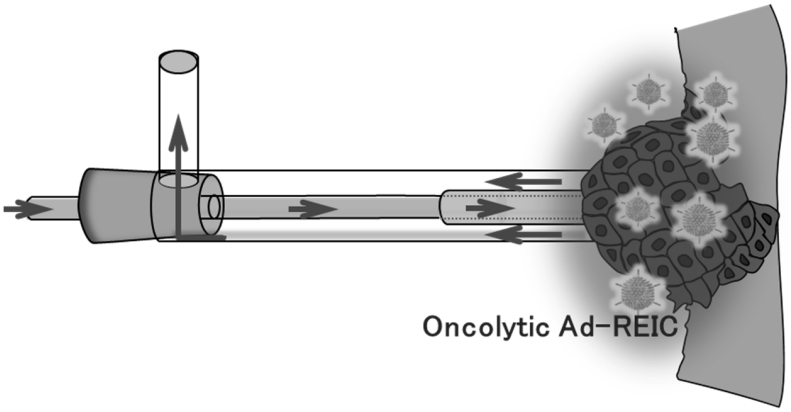
86　新規抗癌ウイルス医薬の開発とその局所投与法の最適化	渡部　昌実

【目的】近年、抗癌ウイルス医薬（遺伝子治療製剤や腫瘍融解ウイルス製剤）は、遺伝子発現やウイルスの制限増殖というこれまでの医薬品とは異なる作用機序で働く新しい医薬品として、難治性癌疾患の分野においてその実用化が期待されている。我々は従来、癌治療遺伝子 *REIC/Dkk-3* の臨床利用に関する研究を実施しており、制限増殖型アデノウイルスベクター（Oncolytic Adenovirus）に *REIC/Dkk-3* 遺伝子を搭載した新規の癌治療剤 : Oncolytic Ad-REIC の開発に成功している。そこで、当該治療剤の抗腫瘍効果を検証・最適化することで、次世代の抗癌治療法としての基盤の確立を目指した。

【方法】本研究では新しい *REIC/Dkk-3* 遺伝子治療として制限増殖型アデノウイルスベクター : Oncolytic Ad-REIC を展開するべく、癌細胞株に Oncolytic Ad-REIC を添加した場合の抗腫瘍シグナルについてその動態を解析した。さらに我々が独自に開発した *In situ* 浸透システムを用いて、治療剤の局所注入による浸透・拡散について最適化をはかる為の基盤研究を実施した。

【結果】ヒト前立腺癌細胞株 PC3 細胞において Oncolytic Ad-REIC およびそのコントロール : Oncolytic Ad ウイルスベクターにより癌細胞死が誘導された。いずれのベクターについても添加により、細胞内の c-Myc 発現の著明な減少およびリン酸化 GSK3β の発現増強が認められた。癌細胞死誘導効果およびリン酸化 GSK3β の発現増強は、Oncolytic Ad を添加した場合に比べ Oncolytic Ad-REIC の場合に顕著であった。また、Oncolytic Ad-REIC 等を *In situ* 浸透システムを用いてより効果的に腫瘍内に局所注入する為の予備検討研究を実施し、特定の溶媒において一定の成果が得られた。当該システムについて、今後、更なる改良を行う予定である。本研究において、Oncolytic Ad-REIC により惹起される抗腫瘍シグナルの一端が明らかとなり、このシグナリングにより Oncolytic Ad-REIC の強力な抗腫瘍効果が誘導されている可能性が示唆された。

抗癌ウイルス医薬の局所投与法最適化の概念図



86. 新規抗癌ウイルス医薬の開発とその局所投与法の最適化

渡部　昌実

岡山大学病院 新医療研究開発センター

Key words：制限増殖型アデノウイルスベクター，*In situ* 浸透システム

緒　言

難治性癌疾患に対する抗癌ウイルス医薬（遺伝子治療製剤や腫瘍融解ウイルス製剤）は、遺伝子発現やウイルスの制限増殖というこれまでの医薬品とは異なる作用機序で働く新しい医薬品として、その実用化が期待されている。近年、サイトカインである GM-CSF を発現し癌免疫を活性化させる腫瘍融解ウイルス製剤：OncoVEX が欧州で承認されるなど、欧米では大手製薬会社も参入して遺伝子治療薬の企業レベルでの臨床開発が加速している［1～5］。いわゆる“遺伝子治療”の概念が発出され、その有用性・将来性が唱えられてから既に長い年月が経過しているが、現在世界的に見ると、遺伝子治療製剤・ウイルス製剤を用いる新規治療法は新しい飛躍の時代を迎えつつあるといえる。一方で、固形癌に対して腫瘍融解ウイルス製剤を局所に直接投与する場合には、その薬剤投与法自体に課題があると思われる。腫瘍内において薬剤を局所投与する場合は、注入した部位において上昇する局所の圧を制御することが困難である為、「薬液の刺入針を伝った外部へのバックフロー」、「意図しない部位への薬液の漏れ」、「不均一な薬液の広がり」といった問題が発生する［6，7］。これらは、治療薬剤の局所注入による浸透・拡散という観点から、当該治療法による疾患の治療効果に重大な影響を与える問題であり解決が望まれている。

我々はこれまでに、癌治療遺伝子 *REIC/Dkk-3* の前立腺癌での臨床利用に関する研究を実施してきた［8～10］。その研究の過程で、制限増殖型アデノウイルスベクター（Oncolytic Adenovirus）に *REIC/Dkk-3* 遺伝子を搭載した新規の癌治療剤：Oncolytic Ad-REIC の開発に成功している。これら Oncolytic Ad-REIC により REIC タンパク質を発現しながら極めて強力な抗癌細胞作用を実現することが可能となり、現在、岡山大学を含め共同で特許申請中である（特願 2014-110672）。本研究では従来の *REIC/Dkk-3* 遺伝子治療研究に新規の制限増殖型アデノウイルスベクター：Oncolytic Ad-REIC を融合展開するべく、Oncolytic Ad-REIC 添加によるヒト癌細胞での抗腫瘍シグナルの動態について解析を行った。さらに我々が独自に開発した *In situ* 浸透システムを用いて、治療剤の局所注入による浸透・拡散について最適化をはかる為の基盤研究を実施した。

方法および結果

1. Oncolytic Ad-REIC による抗腫瘍細胞内シグナルの動態解析

本研究で用いた Oncolytic Ad-REIC およびそのコントロールとしての Oncolytic Ad のウイルスベクターの構造を図 1 に示した。ヒト前立腺癌細胞株 PC3 細胞において、それぞれのベクターを培養液に添加した場合の癌細胞死誘導および細胞死関連タンパク質の活性化・発現動態、また細胞死関連シグナルの動態についてウェスタンブロット法で解析した。結果として、PC3 細胞において Oncolytic Ad-REIC および Oncolytic Ad 添加により細胞死が誘導され、1 MOI（Multiplicity of Infection）の添加において Oncolytic Ad-REIC および Oncolytic Ad による癌細胞死誘導率を比較した場合、Oncolytic Ad-REIC においてより強く細胞死が誘導された（図 2）。さらにこれらの癌細胞死が誘導される分子メカニズムを解明する為、それぞれのベクター添加 24 時間後に細胞を回収、サンプルを作製しウェスタンブロットを行ったところ、細胞内の c-Myc 発現の著明な減少およびリン酸化 GSK3β の発現増強が認められた（図 3）。特にリン酸化 GSK3β の発現増強は、Oncolytic Ad を添加した場合に比べ Oncolytic Ad-REIC の場合に顕著であった。

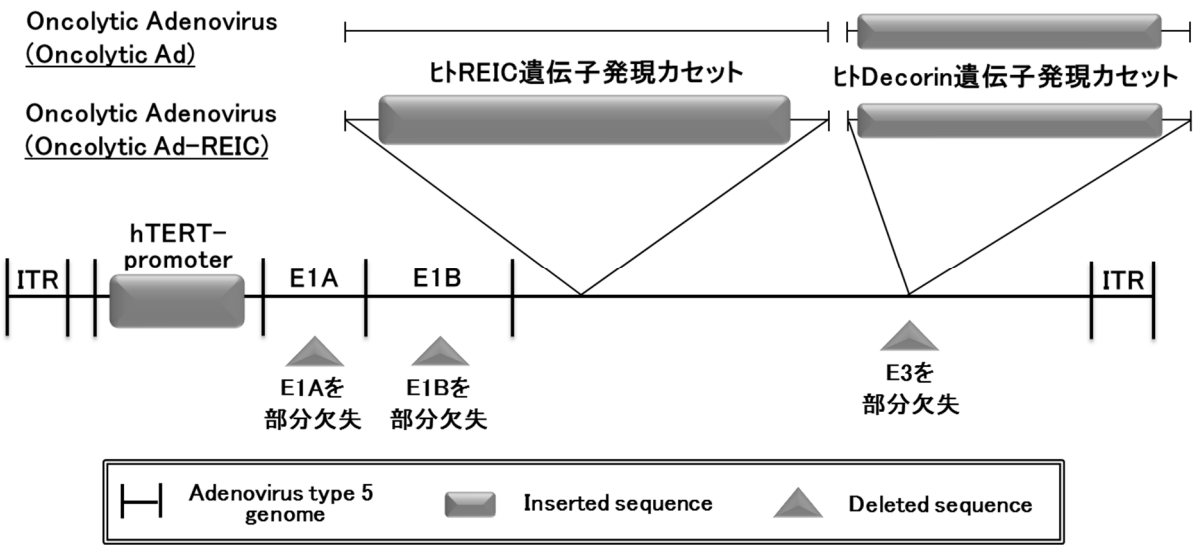


図 1. Oncolytic Ad-REIC および Oncolytic Ad の構造図

Oncolytic Ad-REIC は、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）プロモーターにより増殖が制限される 5 型アデノウイルスを骨格としている。感染した癌細胞において増殖すると同時に、挿入した遺伝子発現カセットによってヒト REIC タンパク質と腫瘍の形成と成長に拮抗するヒト Decorin タンパク質を発現させる。

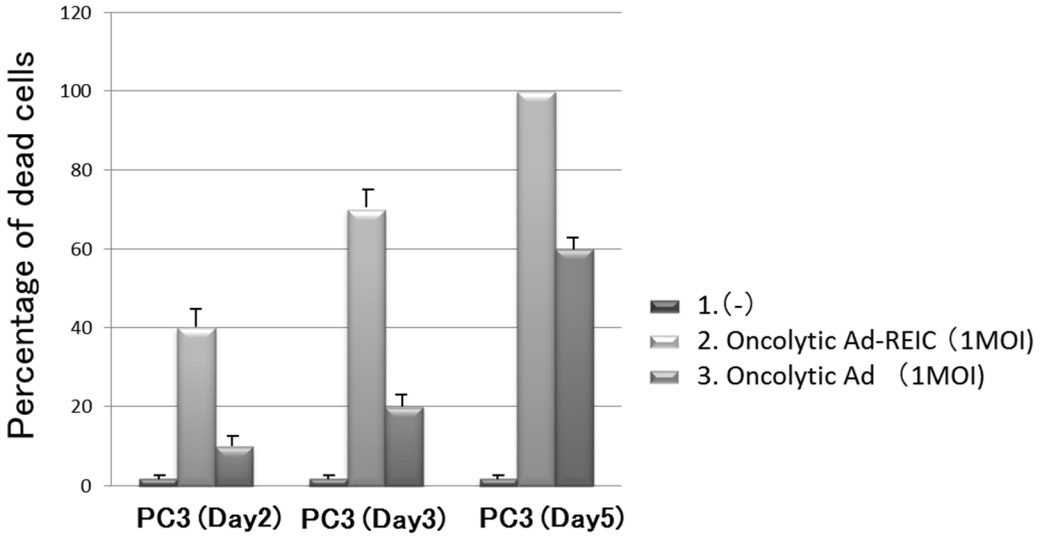


図 2. Oncolytic Ad-REIC および Oncolytic Ad 添加による癌細胞死誘導率

ヒト前立腺癌細胞株 PC3 細胞において Oncolytic Ad-REIC および Oncolytic Ad を 1 MOI でそれぞれ添加した場合の細胞死誘導率を示した。

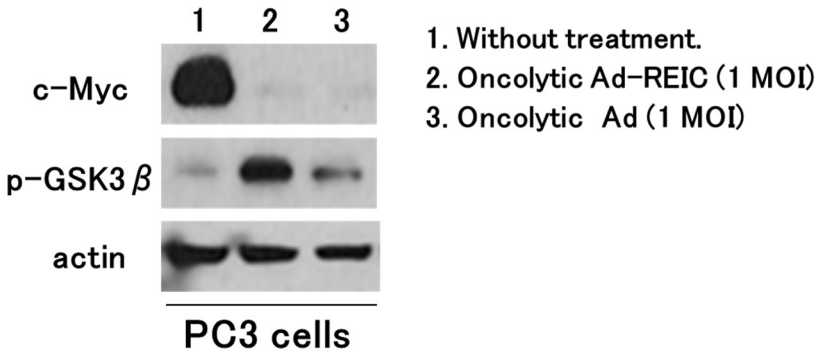


図 3. Oncolytic Ad-REIC および Oncolytic Ad 添加による細胞死誘導の分子機序の解析
ウエスタンブロット法にて、細胞死に関連する各タンパク質因子のベクター添加後の動態を示した。

2. *In situ* 浸透システムを用いた各種溶媒の局所における浸透・拡散について

我々のこれまでの遺伝子治療研究により、固形癌に対する薬剤の局所注入に基づく治療においては、それらの治療薬剤をどのように局所病巣へ注入するかによりその治療効果が大きく左右されることが明らかとなっている［5］。実際に薬剤を腫瘍組織内に局所注入する際には、当該薬剤がその組織内で可及的に均等に、また広い範囲に拡散・運搬されることが望ましいと考えられる。すなわち、遺伝子治療製剤や腫瘍融解ウイルス製剤を組織内へ局所注入する治療法の効果を増強または副作用を制御する為には、対象とする組織内に当該薬剤を適切に浸透・拡散させる局所投与手法の改良が不可欠である。そこで本研究では、Oncolytic Ad-REIC 等を *In situ* 浸透システムを用いて、より効果的に腫瘍内に局所注入する為の予備検討研究を実施した。シリアンハムスターにおいて皮下腫瘍を作製し、*In situ* 浸透システムを用いて各種溶媒を腫瘍内に浸透・拡散させ、その後、腫瘍割面を観察することにより浸透・拡散の程度を解析した（図 4)。結果として、エタノール等の組織浸透性を有する溶媒においてより広い範囲での浸透・拡散が可能となることが確認された。

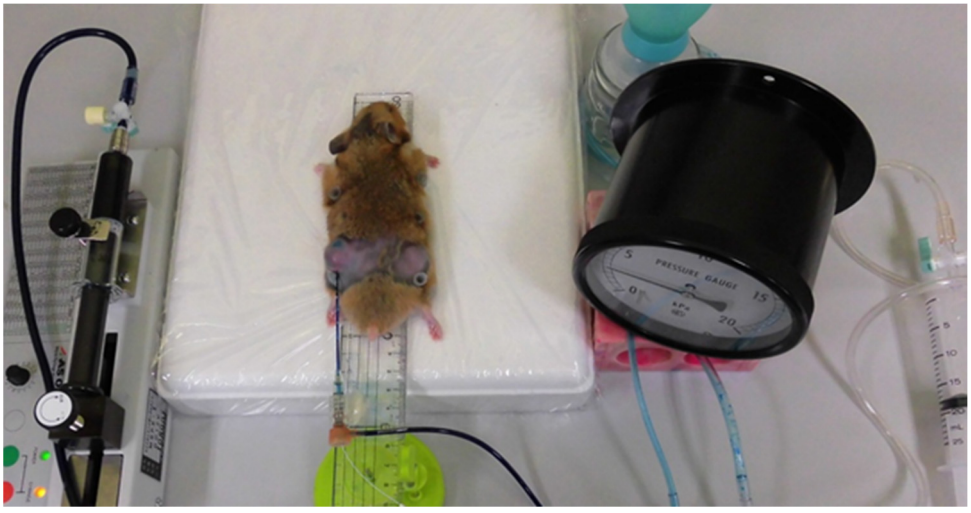


図 4. *In situ* 浸透システムを用いた実験の写真
シリアンハムスターにおいて皮下腫瘍を作製し、各種溶媒について *In situ* 浸透システムを用いてその浸透・拡散の程度を解析した。

考　察

本研究において、Oncolytic Ad-REIC による抗腫瘍細胞内シグナルの一端が明らかとなり、このシグナリングにより Oncolytic Ad-REIC の強力な抗腫瘍効果が誘導されている可能性が示唆された。今後、様々な種類の癌疾患において Oncolytic Ad-REIC の有用性が検証され、実用化の為の開発が進められることが期待される。一方、*In situ* 浸透システムを用いて薬剤をより効果的に腫瘍内に局所注入する為の予備検討研究を実施し、特定の溶媒において一定の成果が得られた。当該システムについて、今後、更なる改良を行う予定である。

文　献

1) 公文裕巳．前立腺癌に対する遺伝子治療の現状と展望．前立腺癌（第 2 版），日本臨牀，2011；544-549.
2) 内田恵理子，五十嵐友香，佐藤陽治．遺伝性難病に対する遺伝子治療薬の臨床開発促進のためのレギュラトリーサイエンス共同研究．国立医薬品食品衛生研究所報告，2014；132：10-12.
3) 那須保友．基礎研究 入門コース「動物・細胞・各種遺伝子解析」．第 104 回日本泌尿器科学会総会 卒後教育プログラム テキスト原稿，2016；295-309.
4) 米満吉和．‘New Era of Old Concept’、2015 年は遺伝子治療と免疫療法が完全復帰を果たす年になる．日経バイオテク オンライン，2015　1 月 1 日.
5) 渡部昌実，定平卓也，那須保友．遺伝子治療．新前立腺癌学，日本臨牀，2016；221-225.
6) Bobo RH, Laske DW, Akbasak A, Morrison PF, Dedrick RL, Oldfield EH. Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Mar 15;91(6):2076-80. PubMed PMID: 8134351; PubMed Central PMCID: PMC43312.
7) Watanabe M. A novel in situ permeation system and its utility in cancer tissue ablation. Int J Oncol. 2015 Sep;47(3):875-83. doi: 10.3892/ijo.2015.3068. Epub 2015 Jun 29. PubMed PMID: 26134633; PubMed Central PMCID: PMC4532192.
8) Kumon H, Ariyoshi Y, Sasaki K, Sadahira T, Araki M, Ebara S, Yanai H, Watanabe M, Nasu Y. Adenovirus vector carrying REIC/DKK-3 gene: neoadjuvant intraprostatic injection for high-risk localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy. Cancer Gene Ther. 2016 Nov;23(11):400-409. doi:10.1038/cgt.2016.53. Epub 2016 Oct 21. PubMed PMID: 27767086; PubMed Central PMCID: PMC5116477.
9) Oka T, Kurozumi K, Shimazu Y, Ichikawa T, Ishida J, Otani Y, Shimizu T, Tomita Y, Sakaguchi M, Watanabe M, Nasu Y, Kumon H, Date I. A super gene expression system enhances the anti-glioma effects of adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene therapy. Sci Rep. 2016 Sep 14;6:33319. doi: 10.1038/srep33319. PubMed PMID: 27625116; PubMed Central PMCID: PMC5022040.
10) Kumon H, Sasaki K, Ariyoshi Y, Sadahira T, Ebara S, Hiraki T, Kanazawa S, Yanai H, Watanabe M, Nasu Y. Ad-REIC Gene Therapy: Promising Results in a Patient with Metastatic CRPC Following Chemotherapy. Clin Med Insights Oncol. 2015 Mar 23;9:31-8. doi: 10.4137/CMO.S23252. eCollection 2015. PubMed PMID: 25861236; PubMed Central PMCID: PMC4373706.