

13-13 がんに対する遺伝子治療の基礎的及び臨床的研究

－癌遺伝子治療増強法の開発－

主任研究者 大阪大学医学系研究科 金田安史

研究成果の要旨

癌組織特異的な導入技術の開発について、アデノウイルスのファイバー改変型とポリマー修飾 HVJ envelope vector を構築し、前者は初代培養ヒト白血病細胞や樹状細胞への導入に適し、後者は血液中での安定性が増し、また腹膜播種癌に対しても導入効率が増強された。また樹状細胞にアデノウイルスベクターを用いマウス *p53* 遺伝子発現を発現させると強い抗腫瘍効果が得られた。アデノウイルスベクターのファイバー部位に Protein A の抗体結合ドメインを導入したファイバー改変型ベクターを作製し、抗腫瘍抗体と併用すると抗体依存的に遺伝子を標的腫瘍細胞に導入でき 10-20 倍の遺伝子発現の増強が確認された。一方、腎癌に対する免疫遺伝子治療の増強のため液性免疫を誘導する腫瘍抗原を探索し、SEREX 法により候補となる抗原クローン testicular nuclear autoantigenic sperm protein を同定した。さらに抗腫瘍ワクチンとして TGF- β の異種動物由来のホモログの投与が有効であることを見出した。またマウス肺癌遺伝子ライブラリーにサブトラクション法を用いたり、HVJ-E vector を用いた新規癌治療遺伝子の探索法を駆使して 12 種類の候補遺伝子を分離した。樹状細胞と癌細胞の融合細胞と CpG オリゴ核酸の併用法により抗腫瘍免疫の誘導の増強と長期維持が極めて効率よくおこり、腫瘍を拒絶できる癌ワクチンとなりうる事がわかった。最後にウイルス複製を利用した癌破壊法の試みとしてテロメラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルス OBP-301 を作成したが、これはヒト非小細胞肺癌細胞および大腸癌細胞で選択的増殖性が確認できた。また肉腫特異的に増殖する単純ヘルペスウイルスの GMP レベルでの精製法を開発した。

研究者氏名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
金田安史	大阪大学大学院医学系研究科 教授	癌治療用非ウイルスベクターの開発
谷憲三郎	九州大学生体防御医学研究所 教授	がんに対する免疫遺伝子治療の効果増強因子の検討
濱田洋文	札幌医科大学 教授	白血病に対する免疫遺伝子治療
藤原俊義	岡山大学医学部・歯学部附属病院 助教授	アデノウイルスを基本骨格とする新規ウイルス製剤のがん診断・治療への応用
黒岡正之	大阪大学大学院医学系研究科 研究員	異種動物蛋白発現ベクターを用いた抗腫瘍免疫の増強法の開発
高橋克仁	大阪府立成人病センター研究所 部長	難治がんに対する制限増殖型ウイルスベクターを用いた遺伝子治療法の開発

総括研究報告

1 研究目的

本研究の目的は癌遺伝子治療の効果を増強させるための新規技術を開発し、将来の臨床応用を目指すことにある。

2 研究成果

1) 癌組織特異的な導入及び遺伝子発現技術の開発；

ウイルスベクターとしてアデノウイルスのファイバー改変型と非ウイルスベクターとしてポリマー修飾 HVJ envelope vector を構築し、それぞれの検討を行った。まずファイバー部に RGD 配列を挿入したアデノウイルスベクターを作製し CD40 リガンドの遺伝子導入効率を従来型のアデノウイルスと比較検討した。マウス CD40 リガンドをアデノウイルスベクターを用いてヒト慢性 B リンパ球性白血病細胞に遺伝子導入し抗白血病性免疫応答を誘導する免疫遺伝子治療が米国で施行され抗白血病免疫誘導および臨床効果が確認されている。しかしながら発現効率、安定性の問題でヒト CD40 リガンド遺伝子導入による抗腫瘍免疫誘導効果はまだ *in vitro* でも確認されていない。その原因の一つとして初代培養白血病細胞にはアデノウイルス受容体である CAR の発現は陰性であることが知られており CAR 非依存的にアデノウイルスを感染させる必要があると考えられている。そこでまずファイバー改変型アデノウイルスを用いてヒト白血病細胞および樹状細胞にヒト CD40 リガンド遺伝子を効率的に導入し T 細胞反応の誘導と抗腫瘍免疫応答に関する検討を行った。血液細胞上に発現するインテグリンを標的とするためにアデノウイルスファイバー部 H1 領域

に RGD 配列を導入したアデノウイルスにヒト CD40 リガンド cDNA を組み込んだアデノウイルスベクターを作製した。初代培養白血病細胞は急性または慢性 B リンパ球性白血病および B リンパ腫患者末梢血または骨髄液よりの単核球細胞を用いた。ヒト樹状細胞は健常人抹消血からプラスチック付着性単球を分離し GM-CSF, IL-4 とともに 7 日間培養誘導した未成熟樹状細胞を用いた。白血病細胞または樹状細胞に対して CD40 リガンド遺伝子導入を行い、T 細胞補助刺激分子である CD54, CD80, CD83, CD86 等の細胞表面抗原の発現が増強しているか否かを Flow Cytometry で解析した結果、従来型のアデノウイルスベクター（ファイバー野生型、CMV プロモーター）では確認できなかったヒト CD40 リガンドの白血病細胞での発現を認めた。これらのヒト CD40 リガンド遺伝子導入白血病細胞（急性 B リンパ球性白血病 3 例、慢性 B リンパ球性白血病 4 例、B リンパ腫白血病化 1 例）では T 細胞補助刺激分子 (CD80, CD86, CD54) 等の明らかな発現誘導、樹状細胞では成熟マーカー (CD25, CD83) 等の発現誘導が認められた。一方、陰性コントロールとして用いた lacZ 導入アデノウイルスベクターではこの様な形質変化を認めることはできなかった。この AxCA-hCD40L-F/RGD は白血病を標的とした免疫遺伝子療法を施行するうえで有用なベクターであることが示唆された。

さらに異なる方法としてアデノウイルスベクターのファイバー部位に ProteinA の抗体結合ドメインを導入したファイバー改変型ベクターを作製した。ヒト卵巣癌細胞 (SK-OV3) に対しては抗 erbB2 抗体、抗 integrin $\cdot 1$ 抗体を、ヒト多発性骨髄腫 (MM1S) に対しては抗 CD20 抗体、抗 CXCR4 抗体、抗 CD38 抗体等を

用いて遺伝子導入効率の変化を検討したところ、抗体依存的に遺伝子を標的腫瘍細胞に導入でき 10-20 倍の遺伝子発現の増強が確認された。

一方、非ウイルスベクターとしては細胞融合能をもつウイルスである HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan, Sendai virus) を不活性化し、ウイルス蛋白の産生をなくし殻 (エンベロープ) の機能のみを利用して高分子物質の導入を行う HVJ envelope (HVJ-E) vector を用いた。HVJ envelope (HVJ-E) vector の癌組織への導入効率を上げるため様々なポリマーで修飾した結果、硫酸プロタミンと分子量 5000 程度の cationic gelatin を用いることにより用いない場合の約 50 倍の遺伝子発現増強が培養癌細胞において可能になった。そこで in vivo での導入効率を検討したところ、皮下腫瘍に対しては無修飾の HVJ-E が、腹膜播種結腸癌に対しては硫酸プロタミンと cationic gelatin で修飾したベクターにより 5 倍程度の導入効率の増強をみた。ポリマー修飾した場合でも HVJ の融合蛋白に対する抗体で阻害されたことにより融合反応が導入に大きく影響していることがわかった。ポリマー修飾による生体組織での遺伝子発現効率の増強は血液によるベクターの分解抑制によることが明らかになった。

制限増殖型ウイルスによる新しいがん治療法として、ヒト悪性腫瘍の約 85%以上で活性が認められるテロメラーゼに着目し、この構成成分である hTERT 遺伝子のプロモーター配列を挿入することで、テロメラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルス OBP-301 を作成した。このウイルスはヒト非小細胞肺癌細胞および大腸癌細胞では OBP-301 感染後 3 日で 10-100 万倍、正常細胞では 100-1000 倍の増殖にとど

まり、その選択的増殖性が確認できた。マウスに移植したヒト非小細胞肺癌に 10×10^7 PFU の OBP-301 を腫瘍内投与したところ、有意な増殖抑制と腫瘍内壊死が認められ有用性が明らかになった。一方、平滑筋選択的増殖型・弱毒化単純ヘルペスウイルス $d12$. CALP Δ RR の臨床応用にむけて、GMP レベルのウイルス精製法を開発した。

2) 免疫遺伝子治療のための治療遺伝子の分離；

まず p53 遺伝子導入による治療効果を増強するために強い抗原提示能を有する樹状細胞 (DC) にアデノウイルスベクター (Ad-mp53) によりマウス p53 遺伝子発現を発現させた。遠心法を併用すると Ad-mp53 感染 36 時間後のウエスタンブロット解析で、明らかな p53 蛋白質の発現が認められた。次に C57/BL6 マウス背部に MCA-207 腫瘍を形成し、Ad-mp53 感染 DC を連続 3 日間腫瘍内あるいは皮下に投与したところ、腫瘍内投与では無処置の MCA-207 腫瘍に比べて有意に ($p < 0.05$) 増殖が抑制された。一方、皮下投与でも若干の増殖抑制傾向がみられたが、有意な抗腫瘍効果は認められなかった。さらに C57BL/6 マウスの両側背部皮下に MCA-207 腫瘍を形成し、一方に Ad-mp53 感染 DC を腫瘍内投与したところ、対側腫瘍においても無処置腫瘍に比べて有意な増殖抑制効果が観察され全身的な抗腫瘍免疫の誘導が示唆された。無処置 DC やコントロールウイルス感染 DC では、有意な抗腫瘍効果は認められなかった。

一方、腎癌に対する免疫遺伝子治療の増強のため液性免疫を誘導する腫瘍抗原の探索のため GM-CSF ワクチン接種開始後 4 年 4 ヶ月生存中の腎癌患者の腎癌細胞から遺伝子ライブ

ラリーを構築しSEREX (serological analysis of cDNA expression library)法を試みた。その結果、tNASP (testicular nuclear autoantigenic sperm protein)mRNA 発現が癌組織において有意に増加している傾向が見られた。また、tNASP と TMF (TATA element modulatory factor 1) に対する抗体価がGM-CSF 遺伝子導入ワクチン接種後に有意に増加している傾向が見られた。そして、健常人 23 名及び各種癌患者計 107 名の血清を検討した段階では、抗 tNASP 抗体価は健常人に対して子宮体癌患者血清で陽性率に統計学的に有意な差が認められ、特に抗 TMF 抗体価は健常人全員が検出限界以下であったのに対し、担癌患者では RCC (69%の陽性率)をはじめとして大腸癌、子宮癌で 50%以上の患者血清が陽性を示し、メラノーマ(39%の陽性率)、食道癌(33%の陽性率)においても統計学的に有意な差が認められた。tNASP と TMF については、癌抗原になりうる可能性ばかりでなく、その抗体を用いて癌診断にも大きな示唆を与えるものと考えられた。

一方、腫瘍より抽出した腫瘍特異的相補DNAライブラリーより polyvalent な抗腫瘍ワクチンの開発をめざして、候補遺伝子の分離を行った。マウスの肺癌細胞株 LL/2 と正常肺より相補DNAライブラリーを作製し、サブトラクティブハイブリダイゼーション法により、マウス肺癌特異的相補DNAライブラリーを得、これをもとにダイファレンシャルスクリーニング法を繰り返し、既知の遺伝子では 30 種類以上の癌特異的に発現する遺伝子を同定した。さらに癌組織により多くかつより正常組織との発現差の大きい遺伝子を 10 種類を選択した。これらはいずれも癌化に直接的あるいは間接的に関与しているものと考

えられ、今後はこれらの全部あるいは一部を抗原としたプラスミドDNAとアデノウイルスの組み合わせ投与による抗腫瘍ワクチンの有効性の検証を行っていく予定である。

新規癌治療遺伝子の探索として、HVJ-E vector が遺伝子ライブラリーの大量・迅速スクリーニングに極めて有効であることがわかり、マウスメラノーマをターゲットにして心臓の遺伝子ライブラリーを導入したところ、2 種類の新規遺伝子がクローニングされた。

3) 新たな癌ワクチン増強法の開発；

宿主の抗腫瘍免疫反応を効率よく高めるための手段として、腫瘍が分泌する免疫抑制性サイトカインである TGF- β に対する免疫反応を誘発することを試みた。この TGF- β の異種動物ホモログを用いたワクチンを作製し、抗原特異的な免疫反応の誘導能を検証した。マウスを用いた本実験において、マウス TGF- β の異種動物ホモログとして、ヒト TGF- β とカエル(Xenopus laevis) TGF- β を、マウス TGF- β に対してヒト TGF- β とカエル TGF- β を用いた。それぞれの蛋白を発現するプラスミドDNA を作製し、さらに部位特異的組換え反応を用いてアデノウイルスベクターを作製した。このプラスミドDNA を2週ごとに3回投与し、続いて同じ抗原を発現するアデノウイルスベクターを1回投与した。その後、それぞれのグループについて免疫学的検索を行った。昨年度にも示したように TGF- β に関する実験では、ヒト TGF- β とマウス TGF- β 投与群のすべてのマウスにおいて同種(マウス) TGF- β に対する自己抗体の産生が認められた。さらに TGF- β に関する実験においては、カエル TGF- β 投与群にのみ同種(マウス) TGF- β に対する自己抗体の産生が認められ、同種であるマウス TGF- β 投与群では、自己抗体の産生は認められな

った。この結果より、異種動物ホモログは同種のものに較べ自己に対する液性免疫の賦活に有利であると考えられた。現在、これらのワクチンにより免疫されたマウスに同種の腫瘍細胞を移植し、抗腫瘍効果を検証している。このなかで、ヒト TGF- β を含む投与群において部分的な腫瘍増殖抑制効果を認めている。上述のごとく自己抗体を産生したのは、ヒト TGF- β 、マウス TGF- β およびカエル TGF- β 2 のそれぞれの投与群であったが、このなかでヒト TGF- β 投与により産生された自己反応性の抗体が中和力を備えている可能性があり、さらなる検証が必要であると考えている。

もう1つのアプローチは樹状細胞と癌細胞ワクチンの増強である。X線照射またはマイトマイシン処理により増殖能をなくさせたマウス癌細胞 200 万個（腎癌細胞のRENCA, メラノーマのB16BL6）とマウス骨髄由来樹状細胞 400 万個を不活性化HVJと混合し融合させた。CpGオリゴ核酸の有無による 24 時間後のサイトカインの分泌を測定した。次にメラノーマ細胞で脾臓細胞を刺激したときの細胞傷害性T細胞の活性をクロミウムの放出により調べた。同様にマウスを免疫し、10 日後に 10 万個のメラノーマ細胞を皮内に移植し、マウスの腫瘍の生着、生存率、肺への転移を調べた。ワクチン接種後マウス足底部にメラノーマをうち、腫瘍塊を形成させ、その後の肺への転移を調べた。HVJの量に依存して融合効率が上昇し約 30%の融合細胞が再現性よく得られた。500 HAU (1.5×10^9 particles) のHVJ envelope vectorを用いたときが最も効率がよく、かつ 24 時間後の細胞も 90%以上が生存していた。融合 24 時間後のサイトカインの分泌についてはTNF- α , IL12 の発現が融合細胞を用いると 2500 pg/ml程度分泌されたが、CpG

オリゴ核酸を同時に用いると有意に高い(1.5 から 2 倍の) 分泌が見られた。これをマウス皮内に 1 週間隔で 2 回接種し 10 日後に脾臓を取り出しメラノーマ細胞で刺激したときの interferon- γ の分泌を測定した。融合細胞のみを用いると 1500 pg/ml程度であったが、CpGオリゴ核酸を併用すると 3000 pg/ml 以上に上昇した。免疫部位は皮内か皮下が最もよく、特に皮内投与では注入樹状細胞が所属リンパ節まで移動することがわかった。CTL については、メラノーマの場合、脾細胞とターゲットの癌細胞の比率が 90 のときに約 30%の特異的な細胞破壊が得られた。CpGオリゴ核酸により細胞破壊はさらに約 50%まで高められた。このCTLはメラノーマ特異的であり、同じC57Black/6 由来のリンパ腫細胞のEL4 に対してはどの群も反応しなかった。融合細胞を用いないと全てのマウスは約 50 日後に死亡した。融合細胞で免疫した場合の生存率 20%であったが、すべてのマウスに腫瘍生着がおこった。融合細胞と同時CpGオリゴ核酸導入を行った場合は、生存率は 80%であり、8 匹中 6 匹のマウスに腫瘍ができなかった。肺転移については無処理ではマウス 1 匹あたり約 65 個の腫瘍転移巣がみられ、CpGオリゴ核酸のみ、或いは、樹状細胞と癌細胞の混合物の注入でもほとんど減少しなかった。一方、樹状細胞と癌細胞を混合し、CpGオリゴ核酸を併用すると約 35 個まで減少した。融合細胞を用いると約 25 個に減少し、融合細胞とCpGオリゴ核酸の併用でさらに転移巣の数も減少し 10 個以下になった。腫瘍関連抗原が未知の腎癌細胞RENCAと樹状細胞を融合したときにも同様の抗腫瘍免疫の活性化が見られ、高いCTLが得られた。またCpGオリゴ核酸による増強も同様にみられた。このときもRENCA特異的な

CTL活性が得られ、同じBalb/cマウス由来の大腸癌細胞CT26 に対してはCTLは誘導されなかった。メラノーマと樹状細胞の融合細胞とCpGオリゴ核酸併用により腫瘍生着がおこらなかったマウスに対して再度同じメラノーマ細胞を60日後に移植したが、全て拒絶された。しかしEL4はすべてに生着した。RENCAと樹状細胞の融合細胞を移植して得られた腫瘍フリーのマウスにRENCA細胞を移植すると40%が腫瘍を拒絶し60%が生着した。融合細胞とCpGオリゴ核酸を用いて得られた腫瘍フリーマウスにRENCA細胞を移植すると100%のマウスが腫瘍拒絶を示した。CT26を接種するとすべて生着した。

3 倫理面への配慮

本研究における倫理面への配慮については、主として動物愛護の観点から実験動物に与える苦痛を極力除去するようにつとめ、各実験施設における動物実験ガイドラインに沿った動物実験を行った。また患者サンプルの利用については各施設での倫理委員会での承認を受けた後に実施している。