

## 14-15 膵がんの特性に基づいた診断・治療法開発に関する研究

主任研究者 国立がんセンター 青木 一 教

### 研究成果の要旨

膵がん外科切除標本や細胞株を用いて、膵がんの塩酸ゲムシタピン感受性に BNIP3 遺伝子が関与していることや、PEDF の発現低下が膵がんの生物学的悪性度と関連していることを明らかとし、新たな治療標的となる可能性を示した。新規治療法の基礎開発としては、腫瘍局所へのインターフェロン $\alpha$ 遺伝子導入が直接的な細胞死誘導と全身性の特異的抗腫瘍免疫反応をもたらすこと、制限増殖型アデノウイルス(CRAds)と抗がん剤を併用することにより相乗的抗腫瘍効果を示すこと、変異型VAIを有するCRAdsが*ras*遺伝子異常を標的として殺細胞効果を示すこと、CEA発現細胞において増殖するCRAdsがCEA産生腫瘍に対して特異的抗腫瘍効果をもたらすこと、PEDF遺伝子発現レンチウイルスを腫瘍内に投与することにより血管新生を抑制し腫瘍増殖を抑制できること、を明らかとした。新規ベクター開発としては、キャプシド蛋白質に多種多様なペプチドを提示するアデノウイルス・ライブラリーを用いて効率良く標的細胞に感染するベクターを探索するシステムを確立した。

### 研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
青木 一 教	国立がんセンター研究所 室長	サイトカインを用いた膵がんに対する遺伝子治療法の開発
内田 英二	日本医科大学 助教授	動物モデルを用いた膵がんの治療実験
砂村 真琴	東北大学大学院医学系研究科 助教授	ファイバーを改変した制限増殖型アデノウイルスを用いた膵癌の治療
佐々木 勝則	東京大学大学院医学系研究科 特任助教授	膵がんの治療を目指したRas依存性制限増殖型アデノウイルスベクターの開発
宮本 正樹	北海道大学大学院医学系研究科 助手	遺伝子診断に基づく膵癌遺伝子治療法の開発
上野 秀樹	国立がんセンター中央病院 医員	進行膵癌に対する新しい治療法の開発 (ゲムシタピンとS-1の併用化学療法)
(班友)		
柏崎 正樹	大阪医療センター 医員	膵がんの特性に基づいた診断・治療法開発に関する研究

### 総合研究報告

#### 1 研究目的

膵がんは消化器がんの中でも最も予後不良ながんである。早期発見は未だ困難であり、進行膵がんに対する既

存の治療法の効果は限られている。当研究の目的は、1) ヒト臨床検体等を用いて、膵がんの特性を分子生物学的に解析して、膵がんの診療に有用な新たな標的分子を探索し、2) 同定された新規分子を標的として、あるいは既に進行している研究成果に基づいて、膵がんに対する有効な遺伝子治療法の開発を行うことである。

## 2 研究方法

### 2.1 膵がん診療に有用な新たな標的の探索

(1) ゲムシタピンは、患者間での治療効果に差がある。そこで、ゲムシタピン感受性を遺伝子発現情報から予測することを目的に、膵がん細胞株19種のゲムシタピンに対する感受性を、感受性群、耐性群および中間群に分類し、9464個のヒト由来遺伝子がスポットされたcDNAマイクロアレイにて解析した(砂村)。

(2) PEDF (Pigment epithelium-derived factor) は正常膵管上皮の異常増殖を抑制しているが、一方で、血管新生を強く抑制する機能も有している。膵がん外科切除標本を用いて免疫染色法により、PEDFの発現と膵がんの発生や悪性度との関連を検討した(宮本)。

### 2.2 膵がんに対する遺伝子治療法の開発

#### 2.2.1 治療戦略の開発

##### (1) サイトカイン遺伝子治療

インターフェロン(IFN)は細胞増殖抑制効果や免疫賦活等の種々の抗腫瘍作用を有する。我々は、以前より、インターフェロン $\alpha$ 遺伝子を膵がん細胞に導入すると、正常細胞や他のがん細胞と比較して、効率よく細胞増殖抑制や細胞死を誘導できることを報告してきた。今回は、IFN- $\alpha$ の種特異性を利用して、ヒト型、マウス型、ハムスター型のIFN- $\alpha$ 発現アデノウイルスを使い分けることにより、IFN- $\alpha$ の*in vivo*での種々の抗腫瘍機序を切り分けて検討した(青木)。

##### (2) 制限増殖型アデノウイルス

AxdAdB-3は、E1AとE1B双方に変異を有し、p53やRb経路の異常を有するがん細胞を標的として増殖する。AxdAdB-3に感染した膵がん細胞は、24時間後にはS期の増加を認め、48時間後には細胞内のウイルスの増殖と細胞破壊が始まる。そこで、ウイルス増殖が活発に行われているタイミングに、S期に作用するゲムシタピンを投与することにより、相乗的抗腫瘍効果が得られるか検討した。ついで、AxdAdB-3のファイバー部分を改変し、腫瘍細胞や腫瘍新生血管に多く発現するインテグリンを介して感染するAxdAdB3-F/RGDを構築し、膵がん細胞に対する殺細

胞効果を検討した。さらに、このAxdAdB3-F/RGDに、5-FUの感受性を高める遺伝子Uracil phosphoribosyl transferase (UPRT)を組み込んだAxdAdB3CAUP-F/RGDを構築し、5-FUとの併用療法についても検討した(砂村)。

膵がんの特性の一つであるCEA蛋白質の高発現に着目し、CEA産生腫瘍において特異的に増殖するアデノウイルスAdCEAp/Repを構築した。AdCEAp/Repは、CEAプロモーターによりE1A13Sを制御し、CMVプロモーターによりE1B19Kの発現を誘導し、かつ正常細胞の保護を目的にE1B55Kを欠失させて、CEA産生腫瘍特異的な増殖を可能としたものである。このAdCEAp/RepのCEA産生膵がんに対する抗腫瘍効果について検討した(佐々木)。

アデノウイルスが感染した細胞内では、dsRNA-activated protein kinase (PKR)の活性が上昇し、ウイルスの増殖を抑制しようとする。これに対抗するために、アデノウイルスは、PKRを不活化するsmall RNAの一種であるVAIを発現し、宿主のウイルス排除機構から逃れようとする。一方、Ras下流の経路は、PKRの発現を抑制することが知られている。従って、VAIに変異を挿入し不活化したアデノウイルスは、正常細胞では増殖できず、Rasが活性化した細胞においては増殖することが可能となる。この変異型VAIアデノウイルスを構築し、*ras*遺伝子異常を標的とするウイルス療法が可能であるか検討した(佐々木)。

##### (3) 血管新生抑制

PEDFを過剰発現した膵がん細胞株の上清を、膵がん細胞株および血管内皮細胞(HUVEC)に暴露し、増殖能と遊走能の変化を検討した。さらに、PEDF発現レンチウイルスベクターを、膵がん細胞マウス移植腫瘍に投与し、その血管新生抑制効果と抗腫瘍効果について検討した(宮本)。

##### (4) COX-2阻害剤

ヒト膵がんや膵管内乳頭粘液腫瘍においては、COX-2が高率に発現しており、膵腫瘍の発生・進展に深く関与していると考えられている。選択的なCOX-2阻害剤であるNimesulideやJTE-522の膵がん細胞株に対する作用を検討した(内田)(柏崎)。

##### (5) *in vivo*イメージングモデル

前臨床試験では、動物を屠殺・剖検することなく経過を追って腫瘍の状態を観察できるシステムが有用である。ハムスター膵がん細胞株PGHAM-1に、ルシフェラーゼ遺伝子を導入したPGHAM-1-Lucを作製し、同系ハムスターの膵内や皮下に移植した動物モデルの有用性を検討した(内田)。

### 2.2.2 遺伝子治療に有用なベクターの開発

アデノウイルスのキャプシド蛋白質を遺伝子工学的に改変することにより、細胞・組織特異的に感染する標的アデノウイルスベクターの開発が可能と考えられている。しかし、多くの細胞・組織でアデノウイルスベクターに利用できる特異的なリガンド・レセプター系が分かっていない。そこで、キャプシド蛋白質に多種多様なペプチドを提示するアデノウイルス・ライブラリーを構築し、がん細胞においてスクリーニングを行った(青木)。

### 2.2.3 膵がんに対する全身化学療法の検討

膵がんは高い浸潤・転移能を有しているため、将来的には、局所制御に優れる遺伝子治療法と有効な全身化学療法の併用が有望な治療戦略となる可能性がある。ゲムシタピンは、進行膵がんに対する化学療法の第一選択薬であるが、無効例に対する化学療法は確立していない。S-1は、膵がんを含む様々ながん種に対する有効性と安全性が報告されている。そこで、ゲムシタピン耐性膵がんに対するS-1の有効性と安全性を評価することを目的として、臨床第II相試験を実施した(上野)。

## 3 研究成果

### 3.1 膵がん診療に有用な新たな標的の探索

(1)膵がん細胞株のゲムシタピンに対する感受性を、感受性群、耐性群および中間群に分類し、cDNAマイクロアレイにて解析したところ、群ごとに膵がん細胞株で共通に高発現もしくは発現低下している遺伝子を抽出することができた。この中で、感受性群において高発現していた Adenovirus E1B-19K/BCL-2 interacting protein (BNIP3) 遺伝子に着目し、siRNA法を用いて膵がん細胞株におけるBNIP3の発現を阻害したところ、ゲムシタピンに対する感受性は有意に低下し、BNIP3は膵がんの薬剤耐性機構における重要な因子であると考えられた(砂村)。

(2) PEDF発現陰性の膵がん症例は、発現陽性症例と比較して有意に肝転移再発が多く、予後不良であった。また、PEDF発現陽性の腫瘍では微小血管密度(MVD)が有意に低値であった。PEDFの発現低下が膵がんの血管新生を促して悪性を増大させることが示唆された(宮本)。

### 3.2 膵がんに対する遺伝子治療法の開発

#### 3.2.1 治療戦略の開発

##### (1) サイトカイン遺伝子治療

ヌードマウスのヒト膵がん皮下移植腫瘍にヒト型IFN- $\alpha$ アデノウイルスを注入すると、IFN- $\alpha$ の直接的な細

胞死誘導により、ウイルス量依存的に腫瘍の増殖は抑制された。この腫瘍にマウス型IFN- $\alpha$ を導入すると、ナチュラルキラー細胞を介した抗腫瘍機序に基づく著明な増殖抑制効果が認められた。さらに、ハムスターの同系膵がん移植腫瘍モデルにおいて、皮下腫瘍にハムスター型のIFN- $\alpha$ 遺伝子を導入すると、導入した腫瘍の増殖を顕著に抑制するだけでなく、細胞傷害性T細胞を活性化して、腹腔内に移植した腫瘍の増殖も抑制し、生存率を有意に延長した。IFN- $\alpha$ 蛋白質は腫瘍内において10日間にわたり発現し続けるものの、血中にはほとんど漏れせず、安全性が示された。実際の臨床病態に類似した膵がん動物モデルにおいて、インターフェロン $\alpha$ 遺伝子局注は、有害事象を示すことなく遠隔転移にも抗腫瘍効果をもたらし、本治療法が早期に転移を起こす膵がんに対する有望な治療戦略となりうることを示した(青木)。

#### (2) 制限増殖型アデノウイルス

AxdAdB-3の増殖が活発に行われているタイミングに、S期に作用するゲムシタピンを併用すると、細胞内でのウイルス増殖による細胞死に加えて、ゲムシタピンによるDNA合成阻害により、効率よく細胞を死滅させた。また、AsPC-1皮下腫瘍モデルにおいて、AxdAdB-3腫瘍局注およびゲムシタピン腹腔内投与の併用群は、それぞれの単独群に比べて有意に強い抗腫瘍効果を示した。ついで、AxdAdB3のファイバー部分を改変したAxdAdB3-F/RGDの膵がん細胞に対する効果を検討すると、*in vitro*及び*in vivo*において従来のAxdAdB3と比較して、強い腫瘍選択性と殺細胞効果を示した。このAxdAdB3-F/RGDにUPRTを組み込んだAxdAdB3CAUP-F/RGDを、5-FUとの併用したところ、単独投与群より強力な腫瘍抑制効果を示した(砂村)。

CEAを産生するBxPC-3細胞をマウスの腹腔内に注入し、 $10^9$ pfuのAdCEAp/Repを腹腔内投与すると、対照群に比べて有意にマウスの生存期間を延長し、CEA産生膵がんに対して明らかな抗腫瘍効果を発揮することを明らかとした(佐々木)。

変異型VAIアデノウイルスを構築し、膵がん細胞株の中でも野性型*ras*を発現するBxPC-3を標的とし、50%細胞傷害活性(IC50)を比較したところ、野生型VAIアデノウイルスの50 MOIに対して、変異型VAIアデノウイルスでは1,000 MOIと、初期感染ウイルス量にして20倍もの開きがあった。一方、活性型*ras*を導入したBxPC-3細胞においてIC50を比較したところ、変異型VAIアデノウイルスにおいては、より少ないウイルス量で殺細胞効果を得ることができ、*ras*遺伝子異常を標的とするウイルス療法が可能であることを示した(佐々木)。

### (3) 血管新生抑制

PEDFを過剰発現した膵がん細胞株の上清は、膵がん細胞株自身の増殖には影響を与えなかったが、HUVECの増殖能と遊走能を有意に低下させた。また、これらの細胞株をマウスに移植したところ、対照群と比較して血管数は少なく腫瘍径は小さかった。さらに、PEDF発現レンチウイルスベクターを、膵がん細胞マウス移植腫瘍に投与すると、対照群と比較して有意に腫瘍の増大が抑制され、PEDF遺伝子治療の有用性が示された(宮本)。

### (4) COX-2阻害剤

PGHAM-1細胞を用いて、COX-2阻害剤(Nimesulide)の効果を検討したところ、100  $\mu$ g/ml未満で濃度依存性に細胞増殖抑制効果がみられ、100  $\mu$ g/mlでは浸潤細胞の明らかな減少を認め、Nimesulideが膵がんの増殖や細胞浸潤の抑制に有用であると考えられた(内田)。また、COX-2阻害剤(JTE-522)の膵がん細胞株に対する作用を検討したところ、COX-2発現株と非発現株双方に対して濃度依存的な増殖抑制効果を示したが、浸潤能、運動性や細胞外基質に対する接着能に関しては、COX-2発現株に対してのみ抑制効果を示した(柏崎)。これらの検討により、COX-2阻害剤は、膵がんの増殖、浸潤・転移を抑制する治療法として有望であることが示唆された。

### (5) *in vivo*イメージングモデル

PGHAM-1-Lucを膵内や皮下に移植した同系ハムスターでは、ルシフェリンを投与することにより、IVISシステムを用いて*in vivo*で腫瘍をリアルタイムにイメージングすることが可能であり、膵がんに対する新規治療法を開発する上で有用な動物モデル系になりうると考えられた(内田)。

## 3.2.2 遺伝子治療に有用なベクターの開発

キャプシド蛋白質に多種多様なペプチドを提示するアデノウイルス・ライブラリーを、U138MGグリオーマ細胞やAsPC-1膵がん細胞を用いてスクリーニングしたところ、特定のアミノ酸配列を有するアデノウイルスが、数種類にまで濃縮され、それらのウイルスがスクリーニングに用いた細胞に効率良く感染することを確認した。本スクリーニング法は、細胞・組織特異的に感染するアデノウイルスベクターを直接同定する上で有用であると考えられた(青木)。

## 3.2.3 膵がんに対する全身化学療法の検討

放射線化学療法を受けた局所進行膵がん患者の予後について検討すると、生存期間中央値は10.0ヶ月であり、

PS、膵周囲リンパ節腫脹、CA19-9の3つが独立した予後因子であった。特に、PSが2以上の例や、膵周囲リンパ節腫脹を認めCA19-9が高値の例は、治療後早期より遠隔転移をきたすことから予後が不良であり、優れた局所制御の治療戦略と、転移を抑制する全身性の有効な治療法の開発が必要であると考えられた。また、ゲムシタピン耐性膵がんに対するS-1の臨床第II相試験では、40人の進行膵がん患者が登録され、有害事象は、骨髄抑制と消化器症状が主に認められたが、多くが軽度で一過性であり、治療関連死など重篤な副作用は認めなかった。抗腫瘍効果に関しては、33人が評価可能であり、部分奏効(PR)が5人に認められ、奏効率は12.5%と比較的良好な結果であった(上野)。

## 4 倫理面への配慮

動物実験に関しては、各研究機関の動物実験倫理規定に基づいて実験を行っている。ヒト臨床検体の研究への応用に当たっては、各研究者の所属する施設の倫理委員会の審査・機関長の承認のもと本研究を進めている。