

## 論 文 要 旨

Assessment of an altered E1B promoter on the specificity and potency of triple-regulated conditionally replicating adenoviruses: implications for the generation of ideal m-CRAs

〔三因子制御の増殖制御型アデノウイルスにおける特異性と効能に対する置換した E1B プロモーターの評価：理想的な m-CRA の創造に対する意味合い〕

堀川 良治

### 【序論および目的】

癌選択的にウイルス増殖が起こり癌細胞死を誘導する増殖制御型アデノウイルス(CRA)は、魅力的な癌治療薬である。アデノウイルス *E1* (*E1A*, *E1B*) 蛋白に変異を入れて正常細胞でのウイルス増殖を抑制する、あるいは *E1* 蛋白を癌特異的に発現制御するという、2種類の CRA 戦略があるが、いずれの戦略でも単一因子での癌特異性は完全ではなかった。この解決のため(申請者の指導者の)小賤研究室で、「多因子で癌を特異化できる癌特異的増殖型アデノウイルスベクター」(m-CRAs)の効率的な作製法が初めて開発された(Nagano S, et al. Gene Ther. 12, 1385-93, 2005)。この技術による第一弾の m-CRA 医薬として、癌特異性の高い *survivin* 遺伝子のプロモーターでアデノウイルスの増殖制御に関わる *E1A* (野生型ならびに  $\Delta 24$  欠損変異型)を発現制御し、恒常的強発現プロモーターの *CMV* プロモーターで変異型 *E1B* (*E1B*  $\Delta 55K$ )を発現する m-CRA (Surv.m-CRA-CMVp)を開発した。この第一弾 Surv.m-CRA でも既存の CRA と比較して治療効果と癌特異性(安全性)の両面で優れていることを実証しており(Kamizono J et al. Cancer Res. 65, 5284-5291, 2005)、治験のための非臨床試験を進めるところである。一方で他からの報告で、*E1A* プロモーターに加え、*E1B* プロモーターを癌特異的プロモーターへ置換した CRA は癌特異性が増すという報告もあるが、癌治療効果を減弱することなく癌特異性を向上する正確な方法は未だ分かっておらず、特に *E1B* または変異型 *E1B* の必要な発現量、つまり制御するプロモーターの活性がどの程度必要なのか、詳細に検討した報告はない。今回この問題を解決して臨床応用に理想的な m-CRA を開発するため、*E1B* を制御するプロモーターについて検討した。

### 【材料および方法】

腫瘍細胞として、*osteocalcin* を様々なレベルで発現する骨肉腫と前立腺癌の複数の細胞株を用い、正常細胞として線維芽細胞株と骨芽細胞を用いた。まずこれらの細胞種で、RT-PCR にて *osteocalcin* の内因性 mRNA 発現を vitamin  $D_3$  の存在有無で評価した。次に *osteocalcin* プロモーターで *LacZ* 遺伝子を発現する Ad.OC-*LacZ* を感染後に、同様に vitamin  $D_3$  の存在有無の条件で *osteocalcin* プロモーターの活性を解析した。これらの結果を踏まえ、今回新たに *osteocalcin* プロモーターにて変異型 *E1B* を制御する Surv.m-CRA-OCp を我々の m-CRA 技術により作製し、上記の Surv.m-CRA-CMVp と比較実験を

行った。Surv.m-CRA-OCp は、*survivin* プロモーターにより E1A が癌特異的に発現制御、E1B の変異 (p53 結合部位である E1B 55kD 領域を欠損) に加え、変異 E1B を *osteocalcin* プロモーターで発現制御というように、独立した 3 つの腫瘍特異的な制御因子を持つ。まず Surv.m-CRA-CMVp、Surv.m-CRA-OCp を骨肉腫細胞に感染させ、変異型 E1B の発現量を western blot 法にて解析した。また、*osteocalcin* 産生腫瘍に対して vitamin D<sub>3</sub> が及ぼす Surv.m-CRA-OCp の抗腫瘍効果や、Surv.m-CRA-CMVp と Surv.m-CRA-OCp の抗腫瘍効果の経時的な比較を、*in vitro* 生存細胞数を評価する WST-8 assay にて解析した。最終的に *in vivo* 治療効果の評価として、骨肉腫細胞の皮下移植による *in vivo* 腫瘍動物モデルにて、両ウイルスを腫瘍内に直接注入した後の、腫瘍体積の経日的な変化と最終的な病理組織を検証した。

## 【結 果】

*osteocalcin* の内因性 mRNA の発現は、骨肉腫、前立腺癌細胞及び正常骨芽細胞にて認められ (正常線維芽細胞で認められない)、さらに vitamin D<sub>3</sub> の存在下で飛躍的に上昇した。一方、*osteocalcin* プロモーターは骨肉腫、前立腺癌細胞にて vitamin D<sub>3</sub> により活性の増強がみられたものの、これらの *osteocalcin* 発現細胞で vitamin D<sub>3</sub> の存在下でさえもその活性は弱く、よって Surv.m-CRA-OCp 感染後の骨肉腫細胞でも E1B Δ55K の発現は低かった。しかしながら、このように E1B Δ55K の発現は低いにも関わらず、Surv.m-CRA-OCp は *in vitro* の細胞障害実験で腫瘍細胞に対しては抗腫瘍効果を減弱することなく強い殺傷作用を示し、しかし正常細胞へは細胞障害性を減弱し、つまり「Surv.m-CRA-OCp は抗腫瘍効果を減弱することなく、腫瘍特異性の劇的な向上」を示した。*in vivo* 腫瘍動物モデルでの治療実験でも同様に、Surv.m-CRA-CMVp と Surv.m-CRA-OCp の両群とも著明な腫瘍減縮効果を示し、両群の治療効果に有意差はみられなかった。

## 【結論及び考察】

E1A の発現制御に加えて、E1B プロモーターを別の癌特異的なプロモーターに置換することで、高い抗腫瘍効果と向上した安全性を備える、さらに効果の高い m-CRA が開発できることが今回明らかになった。m-CRA において、E1B プロモーターを置換する戦略の有効性は想像できた一方で、「強力な活性を持つプロモーターである必要はない」という結果は予想外で驚くものだったが、しかしこれは「大部分の癌／組織特異的なプロモーターを用いて理想的な m-CRA が開発できる」という事を示唆しており、好ましい結果である。今回の結果は効果的な m-CRA を開発していくためには重要な情報であり、今後の m-CRA による極めて効果的な癌治療法の開発に非常に大きく貢献する成果である。

## 論文審査の要旨

報 告 番 号	総 研 第 232 号		学 位 申 請 者	堀 川 良 治
審 査 委 員	主 査	夏 越 祥 次	学 位	博 士 (医学・歯学・学術)
	副 査	古 川 龍 彦	副 査	坂 本 泰 二
	副 査	井 上 博 雅	副 査	三 井 薫

**Assessment of an altered E1B promoter on the specificity and potency of triple-regulated conditionally replicating adenoviruses: implications for the generation of ideal m-CRA**

(三因子制御の増殖型アデノウイルスにおける特異性と効能に対する置換した E1B プロモーターの評価 -m-CRA の創造に対する意味合い-)

CRA(conditionally replicating adenovirus)は、*E1A* や *E1B* 遺伝子の変異化あるいは発現制御により腫瘍細胞特異的にウイルス増殖し、細胞死を誘導する遺伝子組換えアデノウイルス (ADV) である。学位申請者らのグループはさらに腫瘍特異性を向上できる m-CRA(多因子制御型 CRA)の効率的作製法を独自に開発した。*E1B* promoter の置換に関しては、癌治療効果を減弱することなく癌特異性を向上させる *E1B* の至適発現量や *E1B* 至適活性レベルは未だ検討されていない。今回、*Survivin* promoter で *E1A* を発現制御する Surv.m-CRA-CMVp 内の *E1B* 上流 Cytomegalovirus (CMV) promoter を、骨肉腫や前立腺癌等で特異活性を示す *Osteocalcin* 遺伝子の promoter にさらに置換した Surv.m-CRA-OCp を作製した。両 Surv.m-CRA の性能比較実験やウイルス学的解析を行い、以下の知見が得られた。

- 1) 骨肉腫・前立腺癌細胞では *Survivin*、*Osteocalcin* の両遺伝子の内因性発現がみられ、*Osteocalcin* 遺伝子のみがビタミン D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) で発現上昇した。
- 2) 骨肉腫と前立腺癌細胞で *Osteocalcin* promoter の活性も VD<sub>3</sub> で増強されるが、promoter 活性レベルは著しく低く、実際に骨肉腫と前立腺癌細胞に Surv.m-CRA-OCp を感染させた後の *E1B* 蛋白発現量も Surv.m-CRA-CMVp 感染後に比べて著しく少なかった。
- 3) 予想に反して骨肉腫、前立腺癌細胞に対する Surv.m-CRA-OCp の VD<sub>3</sub> による抗腫瘍効果増強は見られず、さらに *E1B* の発現が極めて高い Surv.m-CRA-CMVp と極めて少ない Surv.m-CRA-OCp との比較でも、抗腫瘍効果に差はみられなかった。
- 4) *in vivo* においても、Surv.m-CRA-CMVp と Surv.m-CRA-OCp の抗腫瘍効果に有意差はなかった。
- 5) 正常細胞に対しては、Surv.m-CRA-CMVp でみられた高ウイルス量での非特異的細胞死が、Surv.m-CRA-OCp では著明に抑制された。

本研究で、*E1B* を腫瘍・組織特異的 promoter に置換すると、治療効果を減弱させることなく安全性を著しく向上するという、m-CRA 戦略の高い有用性が明確となった。さらに、*E1B* の発現量は抗腫瘍効果には影響しないこと、その一方で *E1B* は発現がなければ効率的なウイルス複製は誘導されないが、そのレベルは微量で十分だという、予想に反する重要な結果が得られた。本研究は、ADV 複製に関する *E1B* 遺伝子の発現量という新たな知見を得ており、さらにその成果は m-CRA 戦略における *E1B* の制御 promoter の選択法を初めて確立したものとなる。多くの promoter は、特異性はあっても活性が低いことが多いため、本研究で、理想的な m-CRA の開発に「大部分の癌・組織特異的 promoter が活用できる」という事実を明らかにしたことは、m-CRA による革新的な癌治療実現に大きく貢献する成果である。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報 告 番 号	総 研 第 232 号		学位申請者	堀川 良治
審 査 委 員	主 査	夏越 祥次	学 位	博士 (医学・歯学・学術)
	副 査	古川 龍彦	副 査	坂本 泰二
	副 査	井上 博雅	副 査	三井 薫

主査および副査の5名は、平成24年12月26日、学位申請者 堀川 良治 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) *Osteocalcin* が正常な組織で発現している可能性はないのか。

(回答) *Osteocalcin* は正常な骨・歯の骨芽細胞等においても発現している。

質問2) 導入効率が細胞によって違うが、アデノウイルスのレセプターの発現で説明可能か。

(回答) アデノウイルスは、CAR (コクサッキー-アデノウイルス-レセプター) を最初の接着の受容体とするため、細胞種による CAR の発現レベルの違いがアデノウイルスの感染効率に最も影響している場合が多い。しかし、CAR 非発現細胞でも比較的高い感染効率を示す、つまり CAR 非依存性感染も知られている。例えば、第二段階のウイルス侵入の受容体としてインテグリンの関与が示唆されているが、ウイルス感染様式の全てが解明されているわけではない。

質問3) プロモーターアッセイにおいて、*Osteocalcin* と CMV ではなく RSV のプロモーターを比較しているのは何故か。

(回答) 以前の我々の報告で、ほとんどの細胞種において CMV プロモーターは RSV プロモーターよりも約10倍活性が高いことを示している。今回は *Osteocalcin* のプロモーター活性は CMV に比べて桁違いに低かったため、活性値だけでなくビタミン D<sub>3</sub> の添加による動態変化も *Osteocalcin* と直接比較するにはむしろ近めのスケールのものがないと思い、CMV プロモーターよりも弱めの RSV プロモーターをプロモーターアッセイにだけ取って用いた。

質問4) in vivo の実験で、副作用は起こらなかったか。

(回答) 今回の m-CRA の腫瘍内投与では、全身状態 (活動性、体重増加など) には特に変化はみられず死亡例もなかった。但し m-CRA はヒトアデノウイルス由来であるためウイルス増殖の感受性動物種が限定され、一つの動物モデルで治療効果と安全性は評価できない。つまり感染はするもののウイルス増殖は起こらないマウスでは Proof-of-concept study に主点をおいて調べているものであり、今後感受性があるハムスターを用いて治験のための非臨床試験で毒性試験は行う予定である。

質問5) 弱いプロモーターを使用できるメリットとは。

(回答) 多くの組織/腫瘍特異的プロモーターは、特異性はあってもその活性は弱い場合がある。これまで E1B 制御プロモーターについて治療効果を減じないために必要な強度は分かっていなかったため、どのような組織/腫瘍特異的プロモーターを m-CRA で E1B 制御に用いることができるか分かっていなかった。今回は、少なくとも *Survivin* プロモーターのような腫瘍特異性も活性も高い優れたプロモーターで一番大事な E1A を制御すれば、E1B の制御に関しては極めて弱いプロモーター活性でもウイルス増殖が効率的に起こり、特異性 (安全性) は向上することが分かったため、その活性レベルに大きく依存せず、ほとんどの組織/腫瘍特異的プロモーターを m-CRA に用いることができるということが明らかになった。よって、今後の m-CRA 開発の自由度が劇的に増えた。

質問6) SaOS-2 細胞ではプロモーター活性が弱いようだが、細胞死が誘導できると思うか。

(回答) SaOS-2 細胞は細胞死が誘導されにくい。しかしそれはプロモーター活性や今回の種類の m-CRA に限らず、そもそもアデノウイルス蛋白に抵抗性を示す特殊な細胞株であるが、その機構は分かっていない。今回特殊な SaOS-2 を使用した目的は、感染 (遺伝子導入) 効率とプロモーター活性の動態を複数の骨肉腫細胞で示すためである。また *Osteocalcin* プロモーター活性が SaOS-2 細胞では検出以下のレベルに見えるのは、*Osteocalcin* プロモーターの活性が低いだけでなく、遺伝子導入効率が低い影響も大きい。

## 最終試験の結果の要旨

質問7) 臨床応用を考えた場合、この治療法の効果を予測することは可能か。

(回答) ほとんどの癌細胞で *Survivin* は高発現しており、また *Osteocalcin* は骨肉腫と前立腺癌で高発現しているため、今回の改良型 *Survivin* 反応性 m-CRA はこれらの癌腫の患者さん全てを治療対象とできる。申請者のグループの以前の報告での比較実験で、オリジナルの *Survivin* 反応性 m-CRA はこれまで最良とされていたテロメラーゼ反応性 m-CRA を治療効果と安全性の両面で既に凌いでおり、今回の研究成果で、この改良型 *Survivin* 反応性 m-CRA は、治療効果を減じることなく腫瘍特異性(安全性)を向上させることがわかったわけであり、腫瘍内投与だけでなく、将来は転移を対象とした全身投与の適応と、それによる患者の生命予後改善という明らかな臨床的なベネフィットが期待できる。

質問8) 臨床試験を考えた場合、安全性はどうか。

(回答) 上記のように初期型の *Survivin* 反応性 m-CRA でも既存の CRA の性能を凌いでおり、またこれまでの世界での他の種類の CRA の臨床試験の結果、腫瘍内注入に関しては高い安全性が確立されている。よって治験は初期型の *Survivin* 反応性 m-CRA をベースとした m-CRA の腫瘍内注入でまずは開始予定だが、さらに腫瘍特異性が向上した本改良型はもちろん腫瘍内注入では安全性にはまず問題がないと予想される。

質問9) 静注などの全身投与が可能であるか。

(回答) CRA に関する全身投与の臨床試験は、おそらく安全性の面から諸外国でも未だ行われていない。本研究は、最終的には全身投与可能な安全性(腫瘍特異性)が向上した m-CRA の開発という目標で行ってきたものであり、今回の細胞レベルでの実験では高い腫瘍特異性の向上、正常組織への非特異的な殺傷の著明な抑制を証明できた。前述(質問4)のように一つの動物モデルで治療効果と安全性の評価は困難なため、ハムスターなどで毒性試験を行う予定としているが、もし腫瘍内注入での治験で安全性が確認でき、ハムスターでの全身投与での毒性試験でも安全性が確認できれば、今回の改良型で全身投与の治験が開始できる可能性がある。

質問10) *Osteocalcin* の作用は何か。膵臓や脂肪細胞に対しても働くようだが。

(回答) 近年、骨と膵の内分泌ループが示唆されている。膵のβ細胞から分泌されたインスリンが骨芽細胞のインスリン受容体を刺激し、それが骨芽細胞の分化と *Osteocalcin* の分泌を増加させ、その *Osteocalcin* がまたβ細胞でのインスリンの分泌を調節する、と考えられている。

質問11) 骨肉腫に対する他の遺伝子治療の試みはされているのか。

(回答) Notch シグナル、Hedgehog シグナルの特異的な阻害など、ターゲットとなりうる遺伝子の研究は行われてきているが、遺伝子治療としてはあまり研究が進んでいない。

質問12) *Osteocalcin* プロモーターの特異性が高いといえるのは、どの図で示されているか。

(回答) まず Figure 3 のプロモーター活性で、線維芽細胞の WI-38 細胞ではコントロールの RSV プロモーターでは活性がみられるのに、*Osteocalcin* プロモーターは全く活性がみられていない。最終的には m-CRA で特異性をみているのは Figure 5 で、標的の骨肉腫 HOS-MNNG と前立腺癌 PC-3 では Surv.CMV (初期型) と Surv.OC (改良型) の細胞殺傷効果の差は day5 ではみられないが、非腫瘍細胞である肺線維芽細胞 WI-38 と骨芽細胞 NHOst では、Surv.OC (改良型) は有意に殺傷効果が低い。

質問13) 体内に入った場合、どのくらいの期間 CRA 増殖は可能か。

(回答) 体内からの免疫機序によるウイルス除去の期間は、その投与経路や量に依存する。中和抗体は、一般的には全身投与後、約2週間できるといわれているが、中和抗体は血中でのアデノウイルスを阻害するだけで、局所の腫瘍内投与には影響は少ない。中和抗体は全身のウイルス血漿の可能性を防ぐ高い安全性の担保として、利点として考えられる。また、細胞性免疫は、感染した癌細胞もろとも破壊するわけで、ウイルスの除去にも寄与する。これも臨床的には癌の殺傷の増強という点でむしろ利点である。結論として、局所投与においては少なくとも2週間以内に腫瘍細胞を殺してしまえば、ウイルス増殖の場もなくなり、さらに中和抗体等の免疫機構で血中からも完全に CRA が除去されると予想される。

質問14) *Osteocalcin* プロモーターで E1A、*Survivin* プロモーターで E1B を制御する、逆の構築をした m-CRA についてはどう思うか。

(回答) 直接の比較実験はしていない。E1A は野生型アデノウイルス感染後の最初に転写される遺伝子で、E1A の発現がなければその後の、他のウイルス蛋白の転写も効率よく起こらないため、E1B よりも重要な遺伝子である。よって E1A には腫瘍特異性が高いだけでなく、プロモーター活性も高い *Survivin* プロモーターのようなものを使用の方が治療効果も安全性も高いものになると考え、今回はそれに焦点を絞った。実際に以前、*Osteocalcin* プロモーターで E1A を制御する m-CRA を、*Survivin* 反応性 m-CRA と比較したが、ウイルス増殖速度が低かったので、やはり逆の構築は今回のものより特に治療効果が落ちると予想できる。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。