

# 論文要旨

## ***Survivin*-responsive conditionally replicating adenovirus exhibits cancer-specific and efficient viral replication**

Survivin 反応性増殖型アデノウイルスは癌特異的、  
効率のよいウイルス増殖を示す

神 園 純 一

### 【序論および目的】

癌遺伝子治療の最大の問題は、体内の全ての癌細胞への治療遺伝子導入は不可能、つまり遺伝子「未」導入の癌細胞からの再発という問題であり、近年、その解決法として期待されているのは、癌特異的にウイルス増殖が起こるように改変した増殖型アデノウイルス (CRA; Conditionally replicating adenovirus) の開発である。CRA はそれ自身が、癌細胞内で増幅されたウイルス蛋白により癌細胞を特異的に殺す「腫瘍溶解性ウイルス」となる利点も併せ持つため、第二世代の癌遺伝子治療として開発が期待されている。CRA は二つのタイプに分けられるが、その一つはアデノウイルス (ADV) のウイルス増殖制御に関わる E1 遺伝子の内因性プロモーターを、癌特異的に発現している遺伝子のプロモーターに置換することで、ADV 増殖をその分子の発現依存性に改変する方法である。もう一つは、ADV の E1 遺伝子内の P53 結合領域、Rb 結合領域を部分改変し、癌と正常細胞での ADV 増殖に選択性を生じさせる方法である。そのメカニズムには議論も多いが、現象としては両タイプの CRA とも、基礎研究と臨床試験で良好な結果が報告されている。

### 【材料および方法】

今回、我々は癌特異的に高発現する survivin 分子に注目した。survivin は 97 年に IAP (Inhibitor of apoptosis gene family) の一種として同定され、その後の研究で細胞周期依存的な発現 (G2/M 期に最大発現) を示し、その過剰な発現が有糸分裂を異常に導くことが明らかにされ、また、臨床的にその発現レベルが予後と相関するとされ、癌治療のターゲットとして大変注目されている。これまでも survivin promoter で癌特異的に遺伝子発現させる試みはあるが、CRA に応用した報告はない。そこで、この survivin 分子の promoter で ADV の E1A 遺伝子を発現調節する survivin 依存性 CRA (Surv. CRAs) を新

規開発した。E1A 遺伝子は野生型の E1A 遺伝子、あるいは野生型 E1A 遺伝子 (Rb 結合領域欠損) のいずれかとした。また E1B 遺伝子は 55kD 欠損 (p53 結合蛋白欠損) とし、さらにマーカー遺伝子として EGFP 遺伝子を挿入した。この二種類の新規 CRA (Surv. CRAwt、Surv. CRAmt) についてその機能と治療効果を詳細に検討した。

### 【結 果】

1. 各種癌、正常細胞で survivin の内因性発現をみると、survivin は種々の癌細胞株で高発現する一方、正常細胞ではほとんど発現を認めなかった。
2. survivin promoter は、ADV の導入効率が極端に低い細胞をのぞき、癌細胞では恒常的に強発現している CMV promoter, RSV promoter と同等の極めて高い活性を示す一方、正常細胞では活性を示さなかった。
3. 各種癌、正常細胞に Surv. CRAwt、Surv. CRAmt を感染させ、マーカー遺伝子として挿入した EGFP 陽性細胞の出現、ウイルス増殖の結果としての細胞融解 (CPE) の出現を経時的に観察すると、いずれの Surv. CRA も、種々の癌細胞では旺盛かつ内因性 survivin の発現量に依存したウイルス増殖能を示す一方、正常細胞ではウイルス増殖能は著しく抑制されていた。
4. Surv. CRAwt、Surv. CRAmt の細胞死誘導効果を cell viability assay で評価すると、癌細胞では時間、ウイルス濃度依存性に効率よく細胞死を誘導したが、正常細胞では明らかな細胞傷害を示さなかった。
5. ノードマウスに骨肉腫の皮下腫瘍モデルを作製し、Surv. CRAwt、Surv. CRAmt の抗腫瘍効果を腫瘍体積、さらに肉眼的、組織学的評価で検討すると、Surv. CRAwt、Surv. CRAmt は一回の腫瘍内注入で著明な腫瘍退縮、治療効果を示した。
6. さらに、これまでの報告でベストの CRA である Telomerase 依存性 CRA (Tert. CRAwt) との比較実験で、Surv. CRAwt は癌特異的なウイルス増殖の達成、治療効果の高さの両面で Tert. CRAwt を凌ぐという有望な結果が得られた。

### 【結論及び考察】

我々が開発した Surv. CRAs は正常組織への傷害なしに、各種癌を特異的にかつ効率よく治療することができ、各種癌の画期的な治療法になると期待される。

# 論文審査の要旨

報告番号	医研第	612	号	氏名	神園純一
審査委員	主査	秋山伸一			
	副査	愛甲 孝		納 光弘	

## Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus exhibits cancer-specific and efficient viral replication

(Survivin 反応性増殖型アデノウイルスは癌特異的、効率のよいウイルス増殖を示す)

**Cancer Research 2005 ; 65(12) : 5284-5291 掲載**

癌遺伝子治療の最大の問題点は体内の全ての癌細胞への治療遺伝子導入は不可能であり、従って遺伝子「未」導入の癌細胞からの再発が避けられないことである。このことを克服すべく著者らは、癌特異的にウイルス増殖する増殖型アデノウイルス(CRA; Conditionally replicating adenovirus)による癌遺伝子治療の開発に取り組んでいる。CRAは二つのタイプに分けられるが、その一つはアデノウイルス(ADV)のウイルス増殖制御に関わるE1遺伝子の内因性プロモーターを、癌特異的に発現している遺伝子のプロモーターに置換することで、ADV増殖をその分子の発現依存性に改変する方法である。もう一つは、ADVのE1遺伝子内のP53結合領域、Rb結合領域を部分改変し、癌と正常細胞でのADV増殖に選択性を生じさせる方法である。申請者らは従来確立していなかったこのCRAの効率的作製法を独自に開発、システム化し、さらに、ADVの増殖を制御するE1Aのプロモーターとして新規分子survivinのプロモーターを取り入れた全く新規の2種類のsurvivin依存性CRA(Surv.CRA(wild type)、Surv.CRA(mutant type))を作製した。E1遺伝子内のP53結合領域、Rb結合領域の部分改変も組み合わせ、3種類の癌特異的因子で癌特異的なウイルス増殖を達成しようとする試みである。

1) survivinは各種癌細胞特異的な発現を示し、さらには、survivinのプロモーターは癌細胞特異的に強力な転写活性を有しており、ウイルス増殖を制御するプロモーターとして、理想的であった。

2) 各種癌、正常細胞を用いた *in vitro* の実験系では、Surv.CRAsは、種々の癌細胞では旺盛かつ内因性survivinの発現量に依存したウイルス増殖、細胞死誘導を示す一方、正常細胞でのウイルス増殖、細胞傷害は著しく抑制されていた。

3) ヒト骨肉腫のHOS-MNNGを用いたヌードマウスの皮下腫瘍モデルでの抗腫瘍効果の検討では、Surv.CRAsは一回の腫瘍内注入で著明な腫瘍退縮、治療効果を示した。

4) これまでの報告で最良のCRAとされるTelomerase依存性CRA(Tert.CRAwt)との比較実験で、Surv.CRAwtは癌特異的なウイルス増殖の達成、治療効果の高さの両面でTert.CRAwtを凌ぐ結果が得られた。

以上のように、申請者らが新規開発したSurv.CRAsは正常組織への傷害なしに、各種癌を特異的にかつ効率よく治療できる、画期的な治療法として応用されることが期待でき、本論文は学位論文に値するものと判断する。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 <b>612</b> 号	氏名	神園 純一
審査委員	主査	秋山伸一	
	副査	愛甲 孝	納 光弘
<p>主査および副査の3名は、平成18年1月30日、学位請求者 神園純一君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、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。</p> <p>質問1) いろいろな遺伝子がある中で、survivin に着目した理由は？                  (回答) Survivin は癌特異的に発現しており、また、癌特異的に非常に高いプロモーター活性を有しているからである。</p> <p>質問2) Survivin は正常細胞でも発現しているか？                  (回答) 細胞種によっては発現があるとされている。</p> <p>質問3) 上皮系細胞では survivin 発現はあるか？                  (回答) Colon 上皮での発現性を指摘した報告がある。</p> <p>質問4) 細胞によってアデノウイルスの導入効率が大きく違うのは何故か？                  (回答) 細胞に存在するアデノウイルスのレセプターである CAR (coxsackie adenovirus receptor) の発現量に応じて導入効率が大きく影響されるからである。</p> <p>質問5) 正常細胞への side effect は全くないか？                  (回答) わずかながら正常細胞でもウイルスの増殖はある。しかし、多くの癌特異的因子を組み合わせることで正常細胞への影響をゼロに近づけることが出来ると考える。</p> <p>質問6) ウイルスの増殖はどれくらいの期間で最大になるか？                  (回答) アデノウイルスには約2週間で中和抗体が出来る。それまでは増殖型ウイルスであれば、癌特異的因子に反応して増殖していく。</p> <p>質問7) ノードマウスの実験で生存率はみていないのか？                  (回答) 今回は生存率の評価は行っていない。</p> <p>質問8) ノードマウスでは免疫がないので、ウイルスは無限に増殖するのか？                  (回答) Survivin の発現に依存してウイルスは増殖していく。癌細胞がなくなれば当然 survivin の発現もなくなるので、ウイルスの増殖は止まると考える。</p> <p>質問9) この増殖型ベクターの短所は？                  (回答) あえて言えば、現時点では完全なる癌特異標的化を達成できていない点である。しかし、これも多くの癌特異的因子を組み合わせることで改善していくと考える。</p>			

質問 1 0) WI-38 で survivin の発現は認められるのに、プロモーター活性がゼロなのはなぜか？

(回答) 発現とプロモーター活性は必ずしも関連するものではない。プロモーターは使用する領域、長さで活性が変わってくる。我々が今回クローニングしたプロモーター領域が適当であったためと考える。

質問 1 1) WI-38 は導入効率が 47%だが、もっと導入効率の高い正常細胞は使っていないのか？

(回答) この実験系では使用していないが、現在はさまざまな正常細胞を入手し、実験している。

質問 1 2) アデノウイルスは感染細胞をアポトーシスで殺すのか？

(回答) アポトーシスである。

質問 1 3) アポトーシスをおこす機序は？

(回答) アデノウイルスの E1A が p53 依存性にアポトーシスを誘導する経路、あるいは、E1A が E4orf4 の活性化を介し、p53 非依存性にアポトーシスを誘導する経路が知られている。

質問 1 4) *In vivo* での腫瘍抑制効果は劇的でないが、今後どう改善していくのか？

(回答) 治療遺伝子を挿入して治療効果を増強する試みを既に行っている。具体的には、p53 や単純ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼを使用している。

質問 1 5) 抗癌剤との併用実験は行っていないのか？

(回答) 我々には経験ないが、抗癌剤耐性を示す癌に CRA を併用することにより、治療効果が上がったという臨床試験報告がある。今後は抗癌剤を含めた他の治療法との併用効果も試してみたい。

質問 1 6) CRA の phase III study 報告はあるか？

(回答) 化学療法を併用した頭頸部癌の Phase III 研究が進行中である。

質問 1 7) 増殖していない癌細胞 (G0 期) に対する効果は？

(回答) アデノウイルスは一般的に分裂していない細胞にも遺伝子導入出来る。従って効果は期待できると考える。

質問 1 8) 今回の実験で最も苦勞したことは？

(回答) ウイルス増殖の評価方法である。今回はウイルス増殖をマーカー遺伝子として入れた EGFP 遺伝子で主に評価した。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。