



Title	Development of adenovirus vector for cancer gene therapy with the control of transgene expression and biodistribution
Author(s)	姚, 醒蕾
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/57951">https://hdl.handle.net/11094/57951</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【20】				
氏 名	イェオ 姚	シン 醒	レイ 蕾	
博士の専攻分野の名称	博 士（薬 学）			
学 位 記 番 号	第 2 3 7 6 3 号			
学 位 授 与 年 月 日	平成 22 年 3 月 23 日			
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻			
学 位 論 文 名	Development of adenovirus vector for cancer gene therapy with the control of transgene expression and biodistribution (遺伝子発現及び体内動態制御に基づいた癌遺伝子治療用アデノウイルスベクターの開発)			
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 中川 晋作 (副査) 教 授 水口 裕之 教 授 八木 清仁 教 授 岡部 勝			

論 文 内 容 の 要 旨

三大療法など癌治療法の進展に関わらず、癌は、未だ世界的に死亡原因の上位を占めている。特に、転移癌に対する有効かつ安全な治療法は皆無である。そのため、従来の治療法により根治不能な進行癌や転移癌などの幅広い症例に対する新規治療戦略の開発が望まれている。このような期待に応えるべく、遺伝子を細胞に導入し治療を行う遺伝子療法が夢の治療法として注目され、癌をはじめとする多くの疾患に対して適用されている。癌遺伝子治療は、従来の治療では根治不能な局所性進行癌を対象に多くの臨床研究がなされ良好な成績を挙げるなど、次世代型治療法として、その需要、必要性は今後益々増大すると考えられる。

遺伝子治療では、より良い遺伝子導入技術、すなわちベクターの開発が必要不可欠である。数ある遺伝子治療用ベクターの中でも、アデノウイルスベクター(Adv)は、遺伝子導入・発現効率の高さなどから、

癌遺伝子治療において最も多用されているベクターである。既に、臨床でも癌病巣への局所投与において多用されており、良好な成果が多数得られている。一方で、現在の Adv を用いた治療プロトコルは、肉眼で確認できる病巣への局所投与に限局されている。そのため、微小癌病巣や全身での転移癌をも治療可能とする方法論の確立は必須であり、特に全身投与による治療戦略が期待されている。

しかし、Adv は細胞、組織特異性に乏しい上、血液中に入った Adv は約 95% が肝臓に集積してしまう。そのため、Adv を全身投与した場合、治療標的である腫瘍組織への遺伝子導入効率は乏しいうえ、Adv の高い肝集積性に伴う肝臓での遺伝子発現により、重篤な副作用を招いてしまう。従って、21 世紀の癌遺伝子治療戦略における最重要課題は、全身投与において腫瘍での遺伝子発現を保持しつつ、肝臓をはじめとする正常組織での発現を抑制可能な Adv の開発にほかならない。そこで本研究では、転移癌などをも治療可能な全身投与型新規アデノウイルスベクターの開発を最終目標に、遺伝子発現制御、体内動態制御及び標的指向性の観点から、これらの問題点を克服可能なベクターの創製を試みた。

まず、腫瘍特異的なプロモーターを用い遺伝子発現制御型 Adv の創製を試みた。真核細胞のあらゆる細胞種で遺伝子発現可能な Cytomegalovirus(CMV)プロモーターは、腫瘍のみならず、正常組織など多くの細胞・組織で高い遺伝子発現を誘導する。一方、Telomere reverse transcriptase(TERT)プロモーターは腫瘍細胞特異的な遺伝子発現誘導能を有しており、正常細胞での発現活性が低いことが知られている。本研究では、TERT プロモーター制御型 Adv の、全身投与における癌遺伝子治療用ベクターとしての有効性・安全性評価を試み、腫瘍特異的 TERT プロモーターにより、全身投与後の正常組織での遺伝子発現を抑制することで、癌を治療し得る可能性を示した。しかし、副作用の克服は、未だ不十分であることが判明し、腫瘍集積性に優れ、且つ肝臓への移行を抑制する必要性が示唆された。

そこで次に、上記問題点を克服するため、ポリエチレングリコール(PEG)で Adv 表面を化学修飾することで、腫瘍集積性に優れた体内動態制御型 Adv の創製を試み、TERT プロモーター制御型 Adv との融合を図った。我々はこれまでに、PEG で Adv を修飾することで、PEG 鎖の立体障害による貪食細胞からの取り込み回避などにより、血中滞留性が向上することを明らかにしてきた。また腫瘍組織では、正常組織に比べ血管の透過性が亢進していることから、長時間血中に滞留している PEG 修飾 Adv(PEG-Ad)は、腫瘍組織に効果的に蓄積する、いわゆる EPR 効果を発揮することを明らかにしてきた。特に、分子量 5000 の PEG を用い、修飾率を最適化した Adv は、全身投与により腫瘍組織に効率的に集積し、高い遺伝子発現を示すことを明らかにしてきた。しかし、Adv 全身投与による最大の問題点である肝臓への高い集積性に伴う遺伝子発現は未だ十分に克服できておらず、強い副作用を誘発してしまう。そこで本研究では、PEG の分子量や修飾率などの作製条件を最適化した結果、分子量 20000、修飾率 45% の PEG-Ad では、未修飾 Adv と比較して腫瘍での発現は 5 倍以上に向上し、肝臓での遺伝子発現を約 1/200 にまで抑制可能であり、腫瘍選択的な遺伝子発現を示すことが判明した。さらに、腫瘍細胞特異的 TERT プロモーターによる遺伝子発現制御と PEG 修飾による体内動態制御を組み合わせることで、より安全性に優れた全身投与型 Adv(PEG-Ad-TERT)を創製し、転移癌に対する本ベクターの有用性を検討した。その結果、PEG-Ad-TERT 投与群では顕著な肺転移コロニー数の減少が見られると共に、副作用を全く示さないことを明らかにし、PEG-Ad-TERT が転移癌をも標的とした全身投与型ベクターの有望な候補であることを実証した。

本ベクターは受動的ターゲティングにより高い腫瘍移行性を有するが、更なる有効性の向上には、能

動的ターゲティングを可能とする新規 PEG-Ad の開発が必須である。本研究では、腫瘍血管ならびに腫瘍組織への選択的移行能を有することが知られている CGKRC ペプチドを用い、本アプローチの有用性を評価した。また、ペプチド付与による影響を評価するため、あらゆる細胞・組織に発現できる CMV プロモーターを用いた。PEG-Ad は、先ほど最適化した分子量 20000 で 45%修飾条件を用い、PEG 先端に CGKRC ペプチドを付与した Adv(CGKRC-PEG-Ad)の有用性を評価した。その結果、CGKRC-PEG-Ad は原発癌及び転移癌に特異的かつ効率的に遺伝子導入可能であることが示され、PEG-Ad の 25 分の 1 の投与量でさえ、顕著な治療効果が見られた。以上の結果から、CGKRC-PEG-Ad は、転移癌を含めた腫瘍組織への能動的ターゲティングを可能とする有効かつ安全な新規ベクターであることが明らかとなった。

以上、本研究では、腫瘍特異的なプロモーターによる遺伝子発現の制御、PEG 化による体内動態の制御、さらに能動的ターゲティングによる標的指向性を付与したベクターシステムを開発した。これらのベクターシステムは、有効性・安全性を兼ね備えた、転移癌をも治療し得る全身投与型ベクターであることを明らかにした。本研究の成果は、多様なベクターに対して応用可能な基盤技術であり、次世代のベクター開発をはじめとする幅広い分野に貢献出来るものと期待している。

## 論文審査の結果の要旨

癌遺伝子治療では、より良い遺伝子導入技術、すなわちベクターの開発が必要不可欠である。数ある遺伝子治療用ベクターの中でも、アデノウイルスベクター (Adv) は、遺伝子導入・発現効率の高さなどから、癌遺伝子治療において最も多用されているベクターである。しかし、Adv は細胞、組織特異性に乏しい上、血液中に入った Adv の 95%以上が肝臓に集積してしまう。そのため、Adv を全身投与した場合、治療標的である腫瘍組織への遺伝子導入効率は乏しいうえ、Adv の高い肝集積性に伴う肝臓での遺伝子発現により、重篤な副作用を招いてしまう。従って、21世紀の癌遺伝子治療戦略における最重要課題は、全身投与において腫瘍での遺伝子発現を保持しつつ、肝臓をはじめとする正常組織での発現を抑制可能なAdvの開発にほかならない。そこで本研究では、転移癌などをも治療可能な全身投与型新規Advの開発を最終目標に、遺伝子発現制御、体内動態制御及び標的指向性の観点から、これらの問題点を克服可能なベクターの創製を試みた。まず、腫瘍特異的Telomere reverse transcriptase(TERT)プロモーターを用い、本プロモーター制御型Advの全身投与における癌遺伝子治療用ベクターとしての有効性・安全性を評価した。その結果、本Advは正常組織では低い遺伝子発現を示したのに対して、腫瘍組織では高い遺伝子発現が得られ、癌治療に有効である可能性が示された。しかし、副作用の克服は、未だ不十分であることが判明したため、ポリエチレングリコール (PEG) でAdv表面を化学修飾することで、腫瘍集積性に優れた体内動態制御型 Advの創製を試みた。PEGの分子量や修飾率などの作製条件を最適化した結果、分子量20000、修飾率45%のPEG-Adでは、未修飾Advと比較して腫瘍での発現は5倍以上に向上し、肝臓での遺伝子発現を約1/200にまで抑制可能であることが判明した。さらに、腫瘍細胞特異的TERT プロモーターによる遺伝子発現制御とPEG修飾による体内動態制御を組み合わせることで、より安全性に優れた全身投与型Adv (PEG-Ad-TERT)を創製し、転移癌に対する本ベクターの有用性を検討した。その結果、PEG-Ad-TERT投与群では顕著な肺転移コロニー数の減少が見られると共に、副作用を全く示さないことを明らかにし、PEG-Ad-TERTが転移癌をも標的とした全身投与型ベクターの有望な候補であることを実証した。さらに能動的ターゲティングを可能とする新規PEG-Adを開発すべく、腫瘍血管ならびに腫瘍組織への選択的移行能を有することが知られているCGKRCペプチドをPEGの先端に付与したターゲティング Advを作製した。その結果、CGKRC-PEG-Adは原発癌及び転移癌に特異的かつ効率的に遺伝子導入可能であることが示され、PEG-Adの25分の1の投与量でさえ、顕著な治療効果が見られた。以上の結果から、CGKRC-PEG-Adは、転移癌を含めた腫瘍組織への能動的ターゲティングを可能とする有効かつ安全な新規ベクターであることが明らかとなった。

以上、本研究では、腫瘍特異的なプロモーターによる遺伝子発現の制御、PEG化による体内動態の制御、さらに能動的ターゲティングによる標的指向性を付与したベクターシステムの開発に成功した。そしてこれらのベクターシステムは、有効性・安全性を兼ね備えた、転移癌をも治療し得る全身投与型ベクターであることを明らかにした。本研究の成果は、多様なベクターに対して応用可能な基盤技術であり、次世代のベクター開発をはじめとする幅広い分野に貢献出来るものと期待され、博士 (薬学) の学位を授与するにふさわしいものとする。