

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32604

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23701103

研究課題名(和文) 超微粒子DNA複合体による抗腫瘍免疫の惹起とその抗癌効果およびメカニズムの解析

研究課題名(英文) PREPARATION OF SMALL PLASMID COMPLEX FOR CANCER THERAPY AND APPLICATION TO MEDIUM ANIMAL CLINICAL STUDY

研究代表者

芳原 智恵子 (YOSHIHARA, Chieko)

大妻女子大学・家政学部・助手

研究者番号：40597093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：我々は生体内で、特に腫瘍組織で高発現する、プラスミド三元複合体の調製に成功した。高い抗腫瘍免疫を惹起するためには、腫瘍細胞膜上に免疫原性の高いタンパクを提示させることが有効であると考え、種々の微生物タンパクをコードしたプラスミドを作成し、その効果を調べたところ、結核菌抗原タンパクの遺伝子が高い抗腫瘍活性を持つことを見出した。結核菌抗原タンパク遺伝子は、CTLや抗原提示細胞の腫瘍内への集積を高めること、また、腫瘍内のINF、IFN- $\gamma$ 、MCR1の濃度を大きく向上させることが確認できた。中型動物における原発性腫瘍においても高い抗腫瘍効果が見られた。

研究成果の概要(英文)：We have established a DNA/PEI/chondroitin sulfate ternary complex system which mediates highly efficient tumor transfection in the living body. In this study, we found that transfection of the tumor cells with a pathogenic gene could effectively enhance the anti-tumor immunity. Those antigen expressed on the tumor cell surface would be recognized by APCs as a danger signal to provoke the immune response. We prepared the plasmid encoding pathogenic genes. Tumor-bearing mice were prepared, and transfected with those plasmids to examine the anti-tumor therapeutic effects. Transfection of the viral or bacterial antigenic protein genes showed highly effective anti-tumor activity. Co-transfection of the cytokine-genes with the pathogenic antigen-gene showed much higher anti-tumor therapeutic effect than pathogenic- or cytokine-genes alone. Transfection of the pathogenic gene was effective also on the primary tumor in dog, and apparent suppression of the tumor growth was observed.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

これまで遺伝子治療には様々なウイルス・ベクターが試みられ、2003年にp53遺伝子挿入ウイルス製剤が、また2005年には腫瘍溶解性ウイルス製剤が中国FDAに承認された。一方、1999年米国のアデノウイルス製剤による死亡事故をはじめ、2002年以降、仏、英でのレトロウイルス製剤による白血病様症状の発症、2007年には米国でアデノ随伴ウイルスの投与直後の被験者の死亡など、重大な副作用が報告され、ウイルス・ベクターの安全性が問題となっている。

そこでこれらにかわる安全な「非ウイルス型ベクター」が求められ、広く研究されてきた。中でもDNAと静電的に接着するポリカチオンやカチオン性脂質を用いた合成ベクターシステムが多く開発された(Gene Ther. 8,181 (2004))。しかし、これらの複合体は培養細胞では高い遺伝子発現を既に実現しているものもあるが、*in vivo*の実験では発現は極めて低く、人への臨床応用可能な非ウイルス・ベクターは未だに挑戦の域を出ていない。

## 2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、ヒトへの臨床応用可能な、治癒効果の高い非ウイルス型の遺伝子治療システムを開発することにある。本システムは、通常のプラスミド/ポリカチオン複合体にさらにポリアニオンを加えた三元複合体を用いることを特徴とし、これらは生体成分との副作用が無く、さらにこれまで不可能とされてきた超微細な粒子の凍結乾燥製剤であり、生体内に投与後腫瘍組織内で遺伝子を高発現する。

本研究では、免疫活性化サイトカインであるGM-CSF、および免疫原性の高いアデノウイルス抗原をコードしたプラスミドを用いてこのような三元微小複合体を調製し、担癌マウスにおける抗腫瘍免疫治療効果およびそのメカニズムを詳しく調べ、臨床研究に適応可能な癌遺伝子治療システムの設計を行う。

## 3. 研究の方法

高い治癒効果を持つ製剤を創成するために、GM-CSF、およびアデノウイルス抗原(ADP)、または結核菌抗原(ESAT-6、Ag85-B)遺伝子の遺伝子を腫瘍細胞に導入して抗腫瘍免疫を強く惹起させるシステムを構築する。

はじめに様々な組成の遺伝子導入製剤を調製し、凍結乾燥後も高い遺伝子導入・発現活性を有する複合体調製の最適条件を追求する。続いて、発現の高かった複合体について、その安全性を確認し、担癌マウスを用いてこれらの複合体の抗腫瘍効果とそのメカニズムを詳しく調べる。

さらにこの反応が免疫によるものだとしたら、サイトカインとの相乗効果がみとめられるはずである。最も効果が高かった遺伝子とサイトカインの遺伝子を異なる割合で混合したものの担癌マウス

デルマウスに腫瘍局所内投与し、抗腫瘍効果を評価するとともに、血清、腫瘍サンプルを詳細に調べ、これらのサイトカイン/異種タンパク複合製剤の免疫誘導機構を検討する。

最も効果が高い治癒効果の得られた組み合わせのものについては、パートナー動物による臨床研究を並行しておこない、原発性腫瘍に対する効果を確認する。これらの結果を総合的に検討し、最適な製剤・プロトコール設計を行い、癌治療の新しいストラテジーを構築する。

## 4. 研究成果

### (1) 合成ベクターの問題点の解決方法

生体成分との副作用の回避:通常、プラスミドDNA/ポリカチオン性高分子(脂質)複合体は表面がプラスに帯電しているため血中タンパクや細胞と非特異的に相互作用し、好ましくない生理反応をおこす。(Hum.Gene Ther.12,1437(1996))。申請者は、プラスミドDNA複合体をコンドロイチン硫酸(CS)などのポリアニオンでコーティングし表面電位をマイナスにすることで、生体成分との非特異的な相互作用を回避することに成功した。

複合体のサイズ:複合体のサイズには、複合体の血管内輸送、血管からの漏出、標的組織内での拡散において非常に重要な問題であるにもかかわらず、これまで解決法が無かった。一方、我々が開発したポリアニオン・コーティングは凍結乾燥・再水和後も凝集することなくサイズや活性が保たれる事を見出した。そこで、高希釈下で三元複合体を調製し分散を安定にした後、凍結乾燥し、水分を全部とばしたあと、そこに少しの水で再水和し濃縮することで、生体内で使用するような高濃度で、しかも極微小な複合体を得ることに成功した。(Biomaterials,31,2912(2010))。さらに、三元複合体調製後にデキストランを加えることで、再水和が容易になり、長期保存が可能になった。

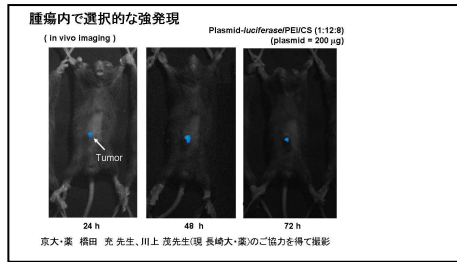
複合体の毒性:PEIは毒性があることからDNA/PEI複合体は高い細胞毒性をしめす。しかし、二元複合体をCSでコーティングすることによって、高濃度においても、毒性が低下する事が分かった。

さらに生体における毒性を調べた。プラスミド複合体(プラスミドにして0.5mg)をマウスに3回皮下投与し、最終投与から24時間後の血清を調べた。二元複合体ではBUNやWBCで基準値をやや超える値がでたが、CS三元複合体では調製直後、凍結乾燥・再水和後ともに、すべての測定値がほぼ標準値以内であり、CSでコーティングされた複合体には生体への毒性がほとんどないことも確認された。

### (2) 腫瘍内における高い遺伝子発現効率

上記のように調製した複合体の生体内における発現を調べた。マウスの皮下に移植した腫瘍内に、ルシフェラーゼをコードしたプラスミドDNAからなる複合体(プラスミド=200ug)を一回投与し、1~3日後の発光を*in vivo*イメージン

グで観察した。二元複合体は全く発光しなかったのに対し、三元複合体を投与したものでは腫瘍内でのみ、強い発光がみられ、3日後まで高い遺伝子発現が観察された。



### (3)マウスにおける GM-CSF 遺伝子の治癒効果

マウスの固形腫瘍における治癒効果を調べた。メラノーマ(悪性黒色腫:B16)細胞を C57/BL 6J マウスの皮下に移植し、腫瘍のサイズが 15 mm<sup>3</sup> 以上になったところで GM-CSF 遺伝子をコードしたプラスミド DNA 三元複合体を一日おきに5回投与し、腫瘍サイズの変化を連日測定した。するとコントロールに比べて明らかな腫瘍の増殖抑制が観察された。

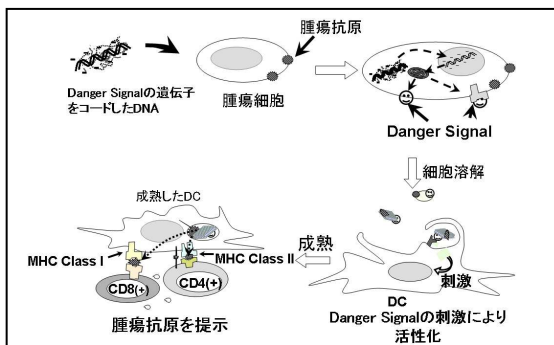
### (4)微生物抗原タンパク遺伝子による治癒効果

上記のように、GM-CSF 遺伝子を用いたマウスの移植ガン治療では著しい腫瘍縮小効果が得られた。しかし、動物臨床研究において、原発性のガンには効果が見られない例もしばしばみられた。

一方、ヒトの臨床治験において、同じサイトカインを組み込んだウイルスを用いた遺伝子治療では、非常に高い効果が確認されている。我々はこのウイルス・ベクターと合成ベクターの機能の違いを比較検討し、ベクター自体が持つ免疫を惹起する能力の違いに着目した。

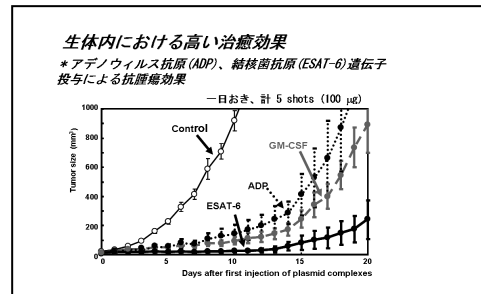
ウイルスを用いた遺伝子治療において腫瘍細胞にウイルスが感染すると、ウイルスの遺伝子が細胞内で転写・翻訳され、その微生物抗原が細胞膜上に提示される。これが Danger signal となり、貪食した APC 細胞が成熟し、微生物抗原とともに腫瘍抗原も併せて抗原提示すると考えた。

つまり、ウイルスそのものは必要ではなく、細胞膜に微生物抗原が提示されることが重要である。ならばウイルスを用いなくても抗原性微生物タンパクの遺伝子をコードしたプラスミド DNA を用いて、腫瘍細胞に抗原タンパクを導入できれば、同様のメカニズムが働くものと期待される。



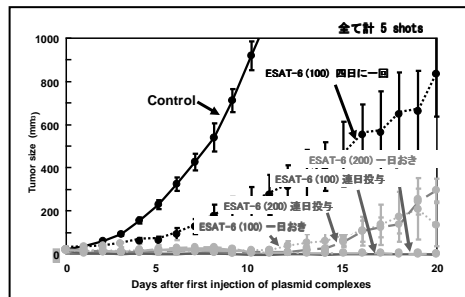
そこで、アデノ・ウイルス抗原(ADP)遺伝子、または結核菌抗原(ESAT-6、Ag85-B)遺伝子をコードしたプラスミド DNA 三元複合体を調製し、各々のマウス固形ガンにおける治癒効果を調べた。

すると、どちらの遺伝子も GM-CSF 遺伝子同等以上の明らかな腫瘍の増殖抑制効果を示した。また、抗原の種類によりその治癒効果は異なり、ESAT-6 遺伝子を投与したものは ADP 遺伝子、GM-CSF 遺伝子より有意に高い治癒効果がみられた。



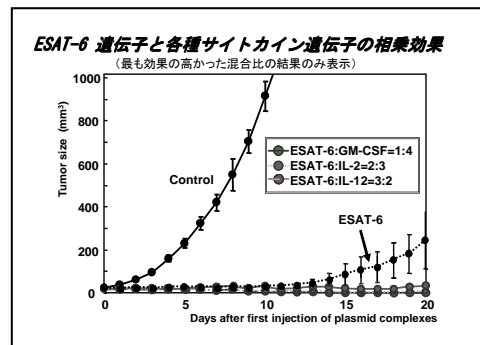
### (4)最適投与条件の検討

ESAT-6 遺伝子を投与したもので高い治癒効果がみられたので、ESAT-6 遺伝子における最適投与条件を検討した。すると、投与量プラスミドにして 200 mg では一日おき、プラスミド 100 mg では連日の投与で最も高い治癒効果がみられた。



また、これらの効果が免疫活性化によるものであれば、サイトカインとの同時投与による相乗効果が期待されはすである。

ESAT-6 遺伝子と GM-CSF、IL2、IL12 各サイトカインの遺伝子との併用による相乗効果を調べたところ、全ての組み合わせにおいて、それぞれのサイトカインと適切な比率で組み合わせることで、非常に高い治癒効果が得られた。



## (5) 病理組織観察

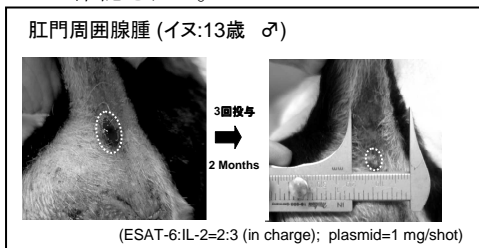
ESAT-6 三元複合体を投与したマウスでは、縮小した腫瘍の周りに多くのリンパ球の集積が観察された。好中球はほとんど見られなかったことから、腫瘍の壊死ではなく、結核菌抗原遺伝子の発現によって免疫が惹起されて、リンパ球の攻撃によって腫瘍が縮小したものと考えられる。

## (6) 中型動物における治療効果

表面が自壊し出血していた肛門周囲腺腫近傍に ESAT-6 をコードした DNA、1 mg を 3 回投与した。

2 ヶ月後には表面皮膚が再生し、腫瘍サイズは大きく縮小した。

微生物抗原タンパク遺伝子の投与は原発性の腫瘍においても非常に高い抗腫瘍効果を示すことが確認された。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Yoshihara C., Hamada K., Kuroda M., Koyama Y. Oncolytic plasmid: A novel strategy for tumor immuno-gene therapy, Oncology Letters,(査読有), ONCOLOGY LETTERS 3: 387-390, 2012.

② Hamada K., Yoshihara C., Ito T., Tani K., Tagawa M., Sakuragawa N., Itoh H., Koyama Y., Antitumor effect of chondroitin sulfate-coated Ternary-granulocytemacrophage-colony-stimulating factor plasmid complex for ovarian cancer, J Gene Med. (査読有) 14: 120-127, 2012.

③ Yoshiyuki Koyama, Chieko Yoshihara, Tomoko Ito, Ph.D.<sup>1,2</sup> and Masazumi Eriguchi. Novel Antitumor Strategy by Transfection of Plasmids Encoding Pathogenic Antigen- and Cytokine-Genes, American Society of Gene & Cell Therapy 15th Annual Meeting, Philadelphia, USA, May 15-19, 2012 (2012)

④ Yoshiyuki Koyama<sup>1</sup>, Chieko Yoshihara<sup>1</sup>, Masahiko Tojyo<sup>2</sup>, Tomoko Ito<sup>1,3</sup>, and Katsuyuki Hamada<sup>4</sup>, Oncolytic Plasmid System, a Novel Antitumor Strategy by Plasmid Encoding Adenovirus Protein, American Society of Gene & Cell Therapy 14th Annual Meeting, Seattle, Washington, USA, 2011.5.

⑤ Yoshiyuki Koyama<sup>1</sup>, Chieko Yoshihara<sup>1</sup>, Highly Effective Non-viral Antitumor Gene Therapy System Comprising Biocompatible Small

Plasmid Complex Particles, American Society of Gene & Cell Therapy 14th Annual Meeting, Seattle, Washington, USA, 2011.5.

[学会発表] (計 20 件)

① 芳原智恵子、小山義之、腫瘍細胞への結核菌抗原遺伝子導入による抗腫瘍免疫治療効果、第 29 回日本 DDS 学会(京都)、2013.7.4-5

② 芳原智恵子、伊藤智子、牛草貴博, Min Chai, 小山義之、結核菌抗原遺伝子をコードしたプラスミド複合体の調製と動物臨床の応用、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012(仙台)、2012.9.24~26

③ 芳原智恵子、黒田美奈子、東條雅彦、小山義之、微生物抗原遺伝子を用いた腫瘍免疫遺伝子治療システムの開発、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2011(大阪)、2011.9.1-2

④ 芳原智恵子、小山義之、伊藤智子、岡野正三、Preparation Of Small Plasmid Complex For Cancer Therapy And Application To Medium Animal Clinical Study, 第 17 回日本遺伝子治療学会年次学術集会 (福岡)、2011.7.15-17

(他16件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

芳原 智恵子 ( YOSHIHARA, Chieko )  
大妻女子大学・家政学部・助手  
研究者番号：40597093

(2)研究分担者  
特になし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
小山 義之 ( KOYAMA, Yoshiyuki )  
大妻女子大学・家政学部・教授  
研究者番号： 00162090