

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：腫瘍血管を選択的に破壊する新しい遺伝子治療法の開発

2. 研究代表者：高橋 克仁（大阪府立成人病センター 部長）

3. 研究内容及び成果：

がんによる血管新生の誘導を抑制するか、あるいは形成されつつある血管を破壊することができれば、画期的ながん治療法になる。これまでのがん血管新生抑制療法に関する国内外の研究は、すべて血管内皮細胞を標的としているため、血管新生の初期段階を抑制する効果はあるものの、実際の臨床の場で治療対象となる、ある程度の大きさをもったがんを退縮させる効果には乏しい。持続的で強力な抗がん作用を得るためには、内皮細胞の抑制に加えて、平滑筋細胞の遊走や増殖を抑制することにより血管の成熟をも抑制する必要がある。研究代表者らは、血管平滑筋のマーカであるカルポニン遺伝子を発見し、分子生物学的な研究を行ってきた。本研究の目的は、がん血管に選択性をもつ新しい1型単純ヘルペスウイルス（HSV-1）変異体を開発し、多様な固形がんに応用可能ながん治療法を開発することである。このウイルスは、平滑筋細胞特異的なカルポニンプロモーターによって制御される複製能をもち、増殖しつつある血管平滑筋細胞を選択的に破壊する。さらにカルポニンプロモーターの制御下に種々の治療遺伝子を搭載することが可能である。本研究は、全く新しい概念に基づくがん血管抑制遺伝子療法であり、世界的にみてもこれまで試みられたことのない極めて独創的なアプローチである。

ヒトカルポニン遺伝子の平滑筋特異的なプロモーター領域を、HSV-1ウイルスの複製開始に必須な転写因子をコードするICP4遺伝子の上流に挿入し、さらにその上流に標識遺伝子lacZを、ICP4の下流にInternal Ribosomal Entry Site (IRES)-EGFPを連結した相同組換えベクターpKX2 G3を構築した。このDNA断片をICP4欠失HSV変異体d120のRibonucleotide reductase (RR, UL39)-locusに相同組み換え法を用いて挿入し、ICP4とRRの二重欠失変異体を作製した(d12.CALP $\Delta$ RR)。このHSV変異体が、カルポニン遺伝子を発現しかつ活発に増殖している細胞すなわち増殖平滑筋に感染すると細胞由来のRRを利用して増殖可能で、細胞溶解活性を示すことを検証した。また、この内在性のTKをもつ新規HSV-1変異体のganciclovir感受性を確認した。ヌードマウス静脈内投与後の生体内分布の解析では、24時間でほぼ血中から消失し、脳、肝、肺、脾組織からは複製可能なウイルスは回収できなかった。また、血液生化学検査で

は、d 1 2 . C A L P ΔRR の静脈内投与は肝・腎機能、糖・脂質代謝に影響を及ぼさなかった。続いて、ヌードマウスの両側背部皮下にヒト平滑筋肉腫細胞を異種移植し、その片側（右側）に d 1 2 . C A L P ΔRR を注入したところ、投与後 8 日目に反対側（左側）の異種移植片に出血がおこり、腫瘍が縮小した（n=4）。この実験で用いた平滑筋肉腫は、d 1 2 . C A L P ΔRR が腫瘍細胞自体を破壊しないことを *in vitro* の感染実験で確認しているため、腫瘍の退縮は対側の腫瘍に血行性に到達した d 1 2 . C A L P ΔRR が腫瘍内血管を傷害したものと考えられた。一方、腫瘍と接する正常血管の平滑筋細胞には、細胞傷害を認めなかった。また、ヌードマウスの皮下に移植したマウス Lewis 肺がんに対して d 1 2 . C A L P ΔRR を 1 回尾静脈内に注入したところ、広範な腫瘍細胞の壊死を認めた。

腫瘍血管破壊作用をもつ次世代のがん治療薬 d12. CALP ΔRR を開発した。現在 P C T 出願中であるが、知的所有権を取得できる見込がある。今後、腫瘍血管破壊作用の有効性と安全性をさらに検討し、d12. CALP ΔRR の G M P (Good Manufacturing Practices) レベル精製を経て臨床応用を目指したい。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果

研究代表者はニワトリの砂嚢平滑筋から初めてカルポニン抽出して以来、平滑筋に特異的に活性を示す本タンパク質について研究を進め、その性状を明らかにしてきた。さらに哺乳動物個体の発生・分化とがん細胞におけるカルポニン遺伝子の発現特性に着目し、その機能を機敏にがんの遺伝子治療への研究に展開しつつあることは見事である。ウイルス増殖因子の HSV-1 を分離することに成功し、また腫瘍血管の平滑筋で特異的にウイルスを増殖させて腫瘍抑制を行える点がすぐれている。しかし何故ヘルペスウイルスがよいのかというところはまだ不明である。また免疫系との関わりについても今後の課題となっている。

カルポニン遺伝子のプロモーター部分をがんの遺伝子治療にと着目した当初は、平滑筋肉腫に限定されていた感があったが、最近ではそのアイデアはさらに広くその他のがんに対して応用可能と考えられるまでに発展させている。がん細胞に栄養を供給する分裂中の血管細胞を特異的に破壊するウイルスベクターの開発および余分のウイルスベクターを抗ウイルス剤で除去できるという安全性の確立は評価できる。

研究体制については、決して社会的に知名度の高いグループとは思わないが、よく機能し着実に実験を遂行していると思う。しかし、動物実験のグループをもっと充実すべきであった。研究費の使い方についても、短期間であるにも関わらず立派な成果が出て

いるので、適当であったと判断する。

活発に、また、適切に成果の発表を行っている。国内外の関連学会で絶え間なく発表しており評価できる。海外学会からの招聘があればなおよい。

まず国内特許を出して1年以内に追加特許を出し、それから海外出願ということで妥当な出願方法である。発明の内容が新規で効果も大いに期待できるので、特許性は高いと思う。

#### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

国際的に高い水準に有ると思われるが、臨床に向けて倫理に対応可能な周辺の検討を済ませ、また治療ウイルスの大量調製法などの問題を克服するならば、さらに高い注目と評価を受けるだろう。制限増殖型ウイルスによる癌治療はすでに多くの報告があるが、新生血管の平滑筋をターゲットにして腫瘍血管を破壊して癌抑制を起こすことは従来なかった視点である。揺るぎないデータも蓄積されているようで、研究レベルは高い。しかし、制限増殖型ウイルスによる癌治療で最も問題なのは宿主免疫系との関わりである。すなわちウイルスに対する免疫がはたらいてすぐに不活性化される可能性がある。多くの報告はこの点を克服しておらず、この研究においても未解決である。

本研究で示されたがん細胞特異的に壊死をもたらすウイルスの構築についての原理は大変重要である。今後、このアイデアの基で、さまざまながんに対するウイルスが構築されるであろう。ある種の白血病やリンパ肉腫に対しては化学抗がん剤がかなりの効果をもつが、固形がん（特に転移がん）に著効を示す抗がん剤はほとんどないと言ってよい。

新しいヘルペスウイルス変異体の分離法を確立し、従来の制限増殖型ウイルスは癌細胞を攻撃していたが、新生血管の平滑筋を攻撃できるウイルスを開発した点でインパクトは高い。血管破壊によるがん抑制ウイルスベクターとしては、理論的にも、技術的にも過去最高のものであろう。「血管抑制による抗がん」というアイデアは古くからあるが、効果の特異性と安全性を兼ね備えたものはない。本法は大いに期待できる。がんに対する遺伝子治療法の発展において大きな貢献と考えられる。ヒトに対する臨床的応用にまで至っていないのが残念である。

ここで示された増殖細胞に特異的に発現特異性を示すカルボニン遺伝子プロモーターをI型単純ヘルペスウイルスの複製開始制御遺伝子の ICP4 に結合し、これと Ribonucleotide reductase 欠損および（または） thymidin kinase 欠損を組み合わせた改変ヘルペスウイルスをがん治療に用いるアイデアはまことに明解であり、この考え方を基に同様なアイデアでさまざまながん治療のウイルスの開発がなされるものと期待される。

新生血管の平滑筋をターゲットにした治療法は新規性があり評価できる。今後は免疫系の正常な動物での実験、有効な癌腫の決定、安全性の更なる検討などが必要であるが、臨床応用に向けた体制作りも進んでおり期待できる。開発されたベクターに抗がん作用のある遺伝子を挿入するとより効果が期待できるであろう。ヒトのがんに効果があるかどうか最大の問題である。ロジックと基礎研究がしっかりしているので臨床試験が待ちどろしい。

#### 4-3. 総合的評価および特記事項

特記事項；

本研究は平滑筋分化マーカーとしてのカルポニンの研究であった。その研究成果を機敏にがん治療用ウイルスの構築に向けたアイデアが素晴らしい。他の器官の分化器官組織マーカーにも注目して同様な開発ができないかと考えさせられる。

制限増殖型のヘルペスウイルスはすでに海外で臨床応用もなされている。今回の研究内容はカルポニンプロモーターで増殖を制御し、かつ血管平滑筋を対象とすることで従来法とは差別化できるが、特許の上で、既存の制限増殖型ウイルス特許に含まれてしまわないかということが懸念される。

総合的評価；

基本的な問題に広く通暁することを怠り、また個々の当面の問題にこだわり、社会的に貢献する機敏さに欠けるところが、多くのわが国研究者の欠点のように思う。また、従来の基本原理による技術を磨き上げるには長じているが、新原理の創出に不得手である。常々臨床医学を考えることにより、これら通弊を克服した本研究の成果はわが国では稀な例と思う。

着実にデータを蓄積し、癌治療における新しいコンセプトも打ち立てたことを評価したい。がん治療法としての基本的概念は古くから出されているが、固形がんの抑制効果・安全性の保障という観点から従来法と比べて格段の進歩が見られる。