

令和 2 年 11 月 30 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04310

研究課題名（和文）MAPK/ERK経路の異常を指標にして難治性がんを標的破壊するウイルス療法の開発

研究課題名（英文）Tumor-targeted MAPK-dependent recombinant vaccinia virus for oncolytic virotherapy

研究代表者

中村 貴史（NAKAMURA, Takafumi）

鳥取大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：70432911

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,000,000円

研究成果の概要（和文）：膵臓癌細胞の肝転移モデルマウスにおいて、静脈内投与された遺伝子組換えワクシニアウイルス（MDRVV）は腫瘍特異的に増殖し、腫瘍のみを標的破壊することによって、生存を延長させた。さらに、癌患者由来の臨床検体を用いた組織培養系にて、MDRVVはMAPK/ERK経路の活性化異常を指標にして、癌細胞特異的に増殖した。一方、卵巣癌細胞におけるUCA1の発現は、MDRVVの増殖伝播を増強する因子として同定され、バイオマーカーとしての有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行の治療法に対して極めて高い抵抗性を示し、容易に他臓器に転移する難治性進行癌に対する新規治療法の確立が望まれている。学術的意義は、癌特異的に増殖し破壊する遺伝子組換えワクシニアウイルス（MDRVV）が実際の臨床像を反映したマウスモデルにおいても高い抗癌効果を発揮することを実証する、MDRVVの抗癌効果を予測するためのバイオマーカーを同定する、さらに癌免疫療法との併用による抗癌効果の最適化を達成することにある。社会的意義は、現行の治療法に極めて高い抵抗性を示す難治性悪性腫瘍に対するMDRVVによる革新的なウイルス療法の確立に直結することにある。

研究成果の概要（英文）：In clinically relevant mouse models of liver metastasis of human pancreatic cancer cells, single intravenous injection of MAPK-Dependent Recombinant Vaccinia Virus (MDRVV) significantly prolonged survival following tumor-specific viral replication and oncolysis. Furthermore, the MAPK-dependent tumor-specific replication of MDRVV was confirmed in ex vivo infection of live tissues from six pancreatic cancer patients. On the other hand, UCA1 promotes cell-to-cell spread of MDRVV in ovarian cancer, showing the possibility of applying UCA1 expression as a predictive biomarker to predict the therapeutic effect of MDRVV.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：腫瘍治療学 遺伝子治療 バイオマーカー 免疫活性化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌ウイルス療法の研究は、1900年代の初めころから始まり、日本でもムンプスウイルスを使っている臨床研究が試みられていた。しかし当時は、野生型に近いウイルスを投与していたので、安全性の点から問題があり、新しい治療法として確立・定着するには至らなかった。ところが最近では、遺伝子工学技術や、ウイルス及び癌の分子病態解析が発展し、ウイルスが元来持っている正常組織に対する病原性を排除し、ウイルスを癌細胞だけで増殖させることが可能になった。これより、欧米を中心に現在世界中において、生きたウイルスを利用して癌を治療する癌ウイルス療法に関する前臨床研究、及び臨床試験が積極的に行われている。

ワクシニアウイルスは、様々な種類の腫瘍細胞に効率よく感染でき、非常に早い増殖・溶解サイクルを持つため、強い腫瘍溶解性を発揮し、血中を介して転移した全身のがんに到達できる特性を持っている。これらのがんウイルス療法における利点に注目し、遺伝子組換え技術によりさらなる改良を加えることによって、がん細胞特異的に増殖し破壊する遺伝子組換えワクシニアウイルス (MDRVV) の独自開発に成功した。

2. 研究の目的

癌は日本における死亡原因でもっとも多い病気である。特に現行の治療法に対して極めて高い抵抗性を示し、容易に他臓器に転移する難治性進行癌に対しては新規治療法の確立が望まれている。

癌ウイルス療法は、感染した細胞・組織内で増殖伝播しながらそれらを死滅させるウイルス本来の性質 (腫瘍溶解性) を癌治療に利用する方法である。その作用機序は、第一に感染したがん細胞・組織内で増殖伝播しながら、それらをアポトーシスやネクローシスを介して溶解死滅させる。第二にウイルス増殖による腫瘍溶解のみならず、それに伴う抗腫瘍免疫の誘導など多様な作用機序によって抗腫瘍効果を発揮する。

本研究の目的は、抗癌ウイルス製剤 MDRVV としての臨床応用を視野に入れ、(1) 膵臓癌幹細胞の肝臓転移モデルマウスにおける MDRVV の抗腫瘍効果と安全性の評価、(2) 癌患者の血清・腹水中における抗ワクシニアウイルス抗体価と MDRVV に対する中和活性の解析、(3) 癌細胞における MDRVV の増殖性と MAPK/ERK 経路や p53・RB1 経路における遺伝子異常との関係の解明、(4) MDRVV の増殖・伝播に関わる宿主因子の同定とバイオマーカーとしての有用性、(5) 癌免疫療法との併用による MDRVV の抗腫瘍効果の増強の可能性を検証することである。

3. 研究の方法

(1) ウミシイタケルシフェラーゼ発現ヒト膵臓癌細胞株 AsPC-1 から抗 CD44v9 抗体により濃縮した癌幹細胞分画を用いて、肝転移モデルを構築し、MDRVV の腹腔内投与、又は静脈内投与にて抗腫瘍効果を検証した。

(2) 種痘接種歴があるがん患者 21 人の血清中における抗ワクシニアウイルス抗体価を測定するとともに、各血清の MDRVV に対する中和活性を解析した。

(3) 臨床検体を用いた試験物 MDRVV の有効性の検証では、6 人の膵臓がん患者の手術検体より採取した腫瘍を用いて確立した組織片培養において、MDRVV の増殖性と MAPK 経路の活性化異常を解析した。

(4) ヒト卵巣癌細胞株 (MDRVV の感受性が低い) と、そのパクリタキセル耐性株 (MDRVV の感受性が高い) において、マイクロアレイによる網羅的解析結果より発現変動が見られた遺伝子の発現、又はノックダウンによって、各遺伝子がウイルス増殖伝播に重要な役割を果たすかを評価した。

(5) マウス大腸癌 CT26 細胞を同系 BALB/c マウスの両側の皮下に移植した担癌マウスにおいて、生理食塩水、MDRVV、インターロイキン 12 を発現するように組込んだ MDRVV-IL12、又は IL-12 に加えて CD/UPRT (酵母シトシンデアミナーゼ/ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ融合遺伝子) を発現する MDRVV-IL12/CD/UPRT を右側の腫瘍内のみ投与し、腫瘍の増殖を観察した。

4. 研究成果

(1) MDRVV の腹腔内投与に比べ静脈内投与において腫瘍内での高いウイルス増殖が確認され、MDRVV の静脈内投与治療群では生理食塩水群に比べ生存率が延長した。又、全モデルマウスにおけるウイルスの生体内分布試験では、MDRVV の腫瘍特異的増殖が確認された。

(2) がん患者 21 人において、16 人は抗ワクシニアウイルス抗体価が検出限界以下、2 人は 4 以上 16 未満であり、3 人は 50 以上の強陽性であった。この中で、中和活性が認められたのは強陽性を示した 3 人のみであり、MDRVV の静脈内投与の妥当性を示唆する結果となった。

(3) MDRVV のウイルス増殖は、MAPK/ERK 経路が活性化されている Ki67 陽性腫瘍細胞においてのみ検出された。臨床検体を用いた組織培養系にて MAPK/ERK 経路の活性化異常を指標にして、がん細胞特異的に増殖し破壊する MDRVV による治療戦略の妥当性を確認した。

(4) MDRVV の増殖伝播を増強する宿主因子として、Long non-coding RNA として知られているUCA1 を同定し、その有用性をヒト卵巣癌細胞株や卵巣癌患者の初代培養癌細胞において実証した。

(5) ウイルスを投与した右側の腫瘍増殖抑制効果は、ウイルス間で差がないため、ウイルス増殖による腫瘍破壊に因るものと考えられた。一方、投与しない左側の腫瘍増殖は、MDRVV-IL12によって最も有意に抑制されているため、NK細胞を活性化する・Tリンパ球に作用しTh1タイプの免疫反応を誘導し腫瘍に対する細胞性免疫を増強するIL-12に因るものと考えられた。さらに、MDRVV-IL12/CD/UPRTでは、プロドラッグ5-FCとの併用において、CDにより5-FCが抗がん剤5-FUに変換され、さらにUPRTにより5-FUが5-fluoroUMPへ変換されることで、最も高い抗がん効果を発揮した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Horita K, Kurosaki H, Nakatake M, Kuwano N, Oishi T, Itamochi H, Sato S, Kono H, Ito M, Hasegawa K, Harada T, Nakamura T. LncRNA UCA1-mediated Cdc42 signaling promotes oncolytic vaccinia virus cell-to-cell spread in ovarian cancer. *Mol Ther Oncolytics* 13: 35-48, 2019. 査読有 DOI: 10.1016/j.omto.2019.03.003
2. Futami M, Sato K, Miyazaki K, Suzuki K, Nakamura T, Tojo A. Efficacy and Safety of Doubly-Regulated Vaccinia Virus in a Mouse Xenograft Model of Multiple Myeloma. *Mol Ther Oncolytics* 6: 57-68, 2017. 査読有 DOI: 10.1016/j.omto.2017.07.001

〔学会発表〕(計24件)

1. 中村 貴史. 腫瘍溶解性ウイルスによるがんウイルス療法の現状と展望. 口頭発表 第3回日本遺伝子細胞学会若手研究会セミナー(2018 東京)
2. Nakatake M, Kurosaki H, Nakamura T. Novel approach for systemic cancer therapy with oncolytic vaccinia virus through evading the host immune response. 口頭発表 24回日本遺伝子治療学会(2018 東京)
3. Kurosaki H, Okamura T, Ito M, Nakatake M, Kuwano N, Horita K, Ishii K, Kohno H, Yasutomi Y, Nakamura T. Preclinical toxicological evaluation of tumor-targeted and armed oncolytic vaccinia virus in cynomolgus monkey. 口頭発表 24回日本遺伝子治療学会(2018 東京)
4. Horita K, Kurosaki H, Nakatake M, Kuwano N, Ishii K, Kohno H, Ito M, Itamochi H, Oishi T, Harada T, Nakamura T. Predictive biomarkers for cancer virotherapy with oncolytic vaccinia virus. 口頭発表 24回日本遺伝子治療学会(2018 東京)
5. Nakatake M, Kurosaki H, Nakamura T. Novel Approach for Systemic Cancer Therapy with Oncolytic Vaccinia Virus through Evading the Host Immune Response. Poster presentation in 21th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy (2018 Chicago, IL, USA)
6. 中村 貴史. がんのみを標的破壊するワクシニアウイルスベクターの開発. シンポジウム 抗ウイルス感染症のフロンティア-次世代創薬に向けたウイルスベクター開発とペプチド科学-, 日本薬学会 第138年会(2018 金沢)
7. 中村 貴史. 難治性がんを標的破壊する遺伝子組換えワクシニアウイルスによるがんウイルス療法の開発. 口頭発表 第2回日本遺伝子細胞学会若手研究会セミナー(2017 東京)
8. Horita K, Kurosaki H, Nakatake M, Kuwano N, Ishii K, Itamochi H, Oishi T, Harada T, Nakamura T. lncRNA UCA1 has the potential to be a biomarker of therapeutic response to oncolytic vaccinia virus in paclitaxel resistant ovarian cancer. ポスター発表 23回日本遺伝子治療学会(2017 岡山)
9. Nakatake M, Kuwano N, Horita K, Ishii K, Sakamoto T, Kurosaki H, Nakamura T. Tumor-targeting and CD/UPRT-armed oncolytic vaccinia virus enhanced their therapeutic efficacy by combination with prodrug 5-FC. 口頭発表 23回日本遺伝子治療学会(2017 岡山)
10. Kurosaki H, Okamura T, Nakatake M, Kuwano N, Horita K, Ishii K, Yasutomi Y, Nakamura T. Preclinical toxicological evaluation of tumor-targeted and armed oncolytic vaccinia virus in cynomolgus monkey. 口頭発表 23回日本遺伝子治療学会(2017 岡山)
11. 中村 貴史. 分子生物学的アプローチを駆使してウイルスを知り、そしてがん治療に利用する. シンポジウム 遺伝子治療ベクターの技術革新, 第40回日本分子生物学会年会(生命科学系学会合同年次大会)(2017 神戸)
12. 中村 貴史. 難治性がんを標的破壊する武装化遺伝子組換えワクシニアウイルスによる全身性がんウイルス療法の開発. シンポジウム ウイルス療法と遺伝子治療: 実用化目前の革新的技術, 第76回日本癌学会学術総会(2017 横浜)
13. Nakamura T. Tumor-targeted and armed oncolytic vaccinia virus for systemic cancer virotherapy. シンポジウム A bench-to-bedside research targeting intractable cancer with gene and cell medicine, 第23回日本遺伝子細胞治療学会(2017 岡山)
14. Nakatake M, Kurosaki H, Horita K, Kuwano N, Ishii K, Nomura M, Sakamoto T, Okamura

- T, Yasutomi Y, Nakamura T. Preclinical Study of Tumor-targeted and Armed Oncolytic Vaccinia Virus for Systemic Cancer Virotherapy. Poster presentation in 20th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy (2017 Washington, DC, USA)
15. Nakamura T, Nakatake M, Horita K, Ishii K, kuwano N, Nomura M and Kurosaki H. Preclinical study for tumor-targeted and armed oncolytic vaccinia virus for systemic cancer virotherapy. Oral presentation in 10th International Conference on Oncolytic Viruses As Cancer Therapeutics (2016 Vancouver, Canada)
 16. Nakamura T, Horita K, Nakatake M, kuwano N, Ishii K, Nomura M and Kurosaki H. Upregulated lncRNA-UCA1 enhances therapeutic effect of oncolytic vaccinia virus in paclitaxel-resistant human malignant tumors. Poster presentation in 10th International Conference on Oncolytic Viruses As Cancer Therapeutics (2016 Vancouver, Canada)
 17. Horita K, Kurosaki H, Nakatake M, kuwano N, Ishii K, Parada R, Nomura M, Itamochi H, Oishi T, Harada T and Nakamura T. Upregulated lncRNA-UCA1 enhances therapeutic effect of oncolytic vaccinia virus in paclitaxel resistant ovarian cancer. 口頭発表 第22回日本遺伝子細胞治療学会 (2016 東京)
 18. Nakatake M, Kurosaki H, Yamane M, Horita K, Ishii K, kuwano N, Hasegawa K, Fujiwara K, Nomura M, Parada R and Nakamura T. Preclinical study for tumor-targeted and armed oncolytic vaccinia virus for systemic cancer virotherapy. 口頭発表 第22回日本遺伝子細胞治療学会 (2016 東京)
 19. 中村 貴史. 難治性がんを標的破壊する遺伝子組換えワクシニアウイルスによる全身性がんウイルス療法の開発, シンポジウム 新たながん治療の扉を開く腫瘍溶解ウイルスの最前線, 第74回日本癌学会学術総会 (2015 名古屋)
 20. Horita K, Nakatake M, Goto I, Yamane M, Okazaki M, Parada R, Kurosaki H, Nakamura T. Identification of host factors required for enhancing replication and spread of oncolytic vaccinia virus. 口頭発表 第21回日本遺伝子細胞治療学会 (2015 東京)
 21. Nakatake M, Yamane M, Parada R, Horita K, Okazaki M, Hasegawa K, Miyara A, Fujiwara K, Kurosaki H, Nakamura T. Enhancing tumor specificity and therapeutic index of oncolytic vaccinia virus through deletions of both VGF and O1 protein genes. 口頭発表 第21回日本遺伝子細胞治療学会 (2015 東京)
 22. Nakamura T. Tumor-specific, replication-competent vaccinia virus for systemic oncolytic virotherapy. シンポジウム Towards clinical translation of virus therapy for malignancies, 第21回日本遺伝子細胞治療学会 (2015 東京)
 23. Nakamura T. Deletions of both vaccinia growth factor and O1 protein genes enhance therapeutic index of oncolytic vaccinia virus. Oral presentation in 9th International Conference on Oncolytic Viruses As Cancer Therapeutics (2015 Boston, USA)
 24. 中村 貴史. 純和製ワクシニアウイルスを用いた難治がんに対するウイルス療法の開発. 招待講演 第23回遺伝子治療推進産学懇話会 (2015 東京)

〔図書〕(計5件)

1. 中村貴史 他、医歯薬出版株式会社、遺伝子治療の新展開、医学のあゆみ 265 巻 5 号、359-365、2018
2. 中村貴史 他、(株)エヌ・ティー・エス、次世代がん治療～発症・転移メカニズムからがん免疫療法・ウイルス療法、診断法まで～、211-217、2017
3. 中村貴史 他、(株)技術情報協会、先端治療技術の実用化と開発戦略(核酸医薬、免疫療法、遺伝子治療、細胞医薬品) 326-333、2017
4. 中村貴史 他、(株)メディカル ドウ、今、着実に実り始めた遺伝子治療 - 最新研究と今後の展開、遺伝子医学 MOOK30 号、99-105、2016
5. 中村貴史 他、(株)羊土社、がんのウイルス療法、実験医学、34: 31-37、2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計3件)

名称：外来遺伝子発現ワクシニアウイルスの製造方法
 発明者：中村貴史、中武 大夢、黒崎 創、堀田 享佑
 権利者：鳥取大学
 種類：特許
 番号：PCT/JP2017/025486
 出願年：2017 年
 国内外の別：国外

名称：ワクシニアウイルスの増殖・伝搬を増強する宿主制御因子

発明者：中村貴史、堀田 享佑、黒崎 創、中武 大夢
権利者：鳥取大学
種類：特許
番号：PCT/JP2016/071538
出願年：2016 年
国内外の別：国外

名称：ワクシニアウイルスの増殖・伝搬を増強する宿主制御因子
発明者：中村貴史、堀田 享佑、黒崎 創、中武 大夢
権利者：鳥取大学
種類：特許
番号：特願 2015-145153
出願年：2015 年
国内外の別：国内

取得状況（計 1 件）

名称：ワクシニアウイルスの増殖・伝搬を増強する宿主制御因子
発明者：中村貴史、堀田 享佑、黒崎 創、中武 大夢
権利者：鳥取大学
種類：特許
番号：特許第 6452266 号
取得年：2018 年
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

1. 研究内容紹介

<https://www.med.tottori-u.ac.jp/introduction/grad/3322/26294.html>

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：長谷川 幸清

ローマ字氏名：(HASEGAWA, kosei)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。