

平成30年6月6日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15183

研究課題名(和文) 癌細胞と癌関連線維芽細胞の両方に殺細胞効果を示すウイルス療法の開発

研究課題名(英文) Development of oncolytic virotherapy against both cancer cells and cancer-associated fibroblasts

研究代表者

櫻井 文教 (SAKURAI, FUMINORI)

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：70370939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：癌関連線維芽細胞(Cancer-associated fibroblasts; CAF)は、癌の増殖・生存・悪性化に関与することから、癌治療における重要な標的である。本研究では、腫瘍溶解性ウイルスであるレオウイルスが、CAFに対し殺細胞効果を示すか検討した。マウス皮下腫瘍より単離したCAFの生存率は、レオウイルス作用後、50-60%まで減少したことから、レオウイルスはマウスCAFに対し殺細胞効果を有することが明らかとなった。一方で、レオウイルスは通常の線維芽細胞に対しては殺細胞効果を示さなかった。さらに、担癌マウスにレオウイルスを静脈内投与したところ、アポトーシスを起こしたCAFが検出された。

研究成果の概要(英文)：Cancer-associated fibroblasts (CAF) are an important target for cancer therapy because CAF are involved in growth, survival, and malignant alteration of cancer cells. In this study, we examined whether reovirus kills CAF. Reovirus reduced the viabilities of mouse CAF isolated from subcutaneous tumors to 50-60%, indicating that reovirus mediates cell killing effects on mouse CAF. On the other hand, viabilities of normal mouse CAF were not significantly altered by reovirus. In addition, apoptotic CAF were detected in the tumor following intravenous administration of reovirus.

研究分野：遺伝子治療学

キーワード：腫瘍溶解性ウイルス 癌関連線維芽細胞 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍細胞特異的に増殖し、細胞死を誘導する腫瘍溶解性ウイルスが、新規抗癌剤として大きな注目を集めている。なかでも、10本の2本鎖RNAゲノムを持つ非エンベロプウイルスである Reovirus は、遺伝子改変せずとも腫瘍細胞特異的な感染・増殖を示すことや、成人にて病原性を示さないことなど、腫瘍溶解性ウイルスとして多くの長所を有している。Reovirus 製剤である「REOLYSIN」は、欧米では既に第3相臨床試験が行われるなど、最も開発が進められている腫瘍溶解性ウイルスの一つである。

一方で近年、腫瘍組織内で腫瘍細胞の増殖や生存を支持する間葉系の細胞である癌関連繊維芽細胞である Cancer-associated fibroblast (CAF) が注目されている。CAF は、線維芽細胞などが腫瘍組織内において Transforming Growth Factor (TGF)- β などのサイトカイン刺激により形質転換した細胞であり、種々の液性因子や細胞間接着、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生などを介して、腫瘍細胞の薬剤耐性能の上昇や生存維持、転移や血管新生の促進などに重要な役割を担っていることが明らかとなっている。従って、CAF は癌治療の重要な標的になると考えられるが、これまでに CAF を標的とした薬剤はほとんど開発されていない。腫瘍細胞への Reovirus 感染に必須の分子であるカテプシン B および L は、腫瘍細胞のみならず CAF においても活性上昇しているという報告があることから、我々は Reovirus が腫瘍細胞のみならず CAF に対しても殺細胞効果を示すのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究では、CAF に対する Reovirus の殺細胞効果ならびに感染機構について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Reovirus 大量調製と精製

Reovirus を 150 mm 培養ディッシュ 15 枚の L929 細胞に感染、複製させ、2 日後に、この細胞を H0 buffer に懸濁し回収した。細胞懸濁液を 4 秒間超音波処理後、30 秒間静置を 3 回繰り返したのち、凍結融解をして細胞膜を破壊した。Vertrel を細胞破砕液の全液量の 2/5 加え、4 秒間超音波処理後、30 秒間静置を 3 回繰り返した。さらに、同量の Vertrel を加えて 4 秒間超音波処理後、30 秒間静置を 3 回繰り返した。これを 9000 g、5 分間遠心機にかけ、上清を新しいチューブに回収した。回収した上清の全液量の 9/10 量の Vertrel を加え、30 秒間超音波処理を行い、9000 g、10 分間遠心した。超遠心機のスウィング・ローター用のチューブに比重 1.44 g/cm³、1.22 g/cm³ の塩化セシウム溶液を順に重層し、その上に Reovirus 懸濁液を加えて超遠心分離機を用いて 27000 rpm、5.5 時間遠心した。

その後、Reovirus のバンドを回収し、10 mM Tris (pH7.5)、1 mM MgCl₂、10% glycerol からなる透析バッファーで 1 時間、4 度で透析し、透析バッファーを交換した後、一晚透析した。回収した溶液を Reovirus 懸濁液として回収した。

(2) 生物学的タイター (PFU ; plaque-forming unit) の測定

Reovirus 懸濁液を Minimum Essential Medium Joklik's Modified で段階希釈した。L929 細胞を 12 well plate に 5x10⁵ cells/well で播種し、細胞が接着したところで、上清を除き、各ウイルス希釈液を 200 μ L/well で添加した。1 時間後、上清を除去し、2xMEM、FBS、penicillin/streptomycin、1% アガロースから成るアガロースゲル溶液を 1 mL/well で添加し、3 日後にアガロースゲルを吸引除去した。4% パラホルムアルデヒドを 1 mL/well で添加し、固定した後、水道水で洗浄し、クリスタルバイオレットを 1 滴加え、生細胞を染色した。さらに、水道水で洗浄し、プラークを計数することで Reovirus 懸濁液の PFU を測定した。PFU/mL = プラーク平均数 x 希釈率 x 5

(3) 活性化したマウス線維芽細胞株 Swiss3T3 細胞に対するレオウイルスの殺細胞効果

Swiss3T3 細胞を培養する際に用いる RPMI1640 medium に TGF- β (10 μ g/ml) を 10ng/ml になるように添加した。72 時間培養後、Swiss3T3 細胞を継代する際に、再度 RPMI1640 medium に TGF- β (10 μ g/ml) を 10ng/ml になるように添加し、再度 72 時間培養した。96well プレートに各細胞を 2.5x10³ cells/100 μ L/well で播種し、24 時間培養後に Reovirus を MOI 20 で感染させ、48 時間後に Alamarblue Cell Viability Reagent を用いて細胞生存率を計測した。

(4) B16-dsRed-TK 担癌マウスの作成とマウス CAF の回収

DsRed ならびに Herpesvirus Thymidine Kinase (TK) を安定発現する B16 細胞である B16-dsRed-TK 細胞を、10% FBS、1% GlutaMAX、Hygromycin (10 μ g/ml) 入りの RPMI1640 medium で、5-15 継代維持した。その細胞株懸濁液 (7.5x10⁵ cells/mouse) を C57B/6N マウスの背部皮下に移植した。移植 2-3 週間後、腫瘍を摘出し、Tumor Dissociation Kit を用いて処理した。Cell strainer (70 μ m) で debris を除き、赤血球溶解を行って細胞を回収した。その後、5% FBS-PBS で 1000 倍希釈した FcR Blocking Reagent を 15 分氷上で反応させたのち、5% FBS-PBS で 200 倍希釈した FITC anti-mouse CD45 抗体を 30 分氷上で反応させた。5 分間遠心した後、Anti-FITC MicroBeads (1.0x10⁸ cells/100 μ l) を添加して 10 分氷上で反応

させ、AutoMACS pro Separator (Miltenyi Biotec)で Non-label cells を回収した。遠心した後、5% FBS-PBS で 50 倍希釈した Biotin anti-mouse CD140a (PDGFR α)抗体を 30 分氷上で反応させた。5 分間遠心した後、Anti-Biotin MicroBeads (1.0 \times 10⁸ cells/100 μ l)を添加して 10 分氷上で反応させ、AutoMACS pro Separator (Miltenyi Biotec)で mCAF を回収した。

(5) マウス CAF の培養

回収した mCAF は、10% FBS、1% P/S 入りの Dulbecco's Modified Eagle medium で培養した。GCV (20 μ g/ml)を加えることで、混入した B16-dsRed-TK 細胞を死滅させるとともに、顕微鏡下観察し B16 細胞のコロニーを取り除いた。計 6 - 8 日間培養後、以下の実験に用いた。

(5) 定量的 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 法

ISOGEN を用いて mCAF から total RNA を回収した。各 total RNA を RNase-free DNase I で処理した後、Superscript VIL0 cDNA synthesis kit を用いて逆転写反応を行い、complementary DNA (cDNA)を合成した。SYBR Green gene expression assays を用いた定量的 RT-PCR を行い、StepOnePlus リアルタイム PCR システムにより定量した。定量的 RT-PCR に用いたプライマーは以下に示した。

4 . 研究成果

(1) 活性化した Swiss3T3 細胞の特性解析

TGF- β を作用させた Swiss3T3 細胞において、CAF 様細胞へと誘導できているかについて検討するため、CAF のマーカーとして知られている FSP-1 (fibroblast specific protein-1) や Vimentin、および TGF- β 1 の遺伝子発現の mRNA 量を定量的 RT-PCR により測定した。また CAF 様細胞へと分化させることで、Cathepsin B および L の活性が上昇するか検討した。

CAF マーカーとして知られる FSP-1 (fibroblast specific protein-1) や Vimentin、および TGF- β 1 の遺伝子発現は、Swiss3T3細胞に比べ TGF- β 処理した Swiss3T3 細胞(以下 CAF 様細胞)では、それぞれ約 1.6 倍、約 1.7 倍、約 5.5 倍に上昇していた。また、CAF 様細胞における Vimentin や FSP-1 の発現レベルは、担癌マウスの腫瘍組織より単離し不活化した CAF 細胞と同程度であることが明らかになった。

つづいて、Reovirus の感染に重要であるカテプシン B および L の活性を測定した。その結果、CAF 様細胞において、Swiss3T3 細胞と比較し、カテプシン B では 2.2 倍、カテプシン L では 1.6 倍高い活性が観察された。以上の結果より、Swiss3T3 細胞を TGF- β 存在下培

養することで CAF 様細胞が誘導できていることが示された。

(2) 活性化した Swiss3T3 細胞に対するレオウイルスの殺細胞効果

Swiss3T3 細胞および CAF 様細胞に Reovirus を作用させたところ、Swiss3T3 細胞の生存率は約 80%であった。それに対し CAF 様細胞ではほぼ全ての細胞が死滅していた。また同様に担癌マウス由来の CAF 細胞においても、細胞生存率が約 40%に低下していた。以上の結果より、Reovirus は CAF 様細胞に対して殺細胞効果を示すことが明らかとなった。

Reovirus の感染により CAF 様細胞が死滅するメカニズムを検討するために、誘導した CAF 様細胞に Reovirus を作用させたのち、細胞内でのウイルスゲノム量を検討した。さらに、二本鎖 RNA は自然免疫活性化を介してアポトーシスを誘導することが知られており、ウイルスの二本鎖 RNA を認識して活性化する経路の下流に存在するアポトーシス関連遺伝子 Noxa, TRAIL の遺伝子発現を定量的 RT-PCR により検討した。

Swiss3T3 細胞に比べ、誘導した CAF 様細胞では、Reovirus 作用 48 時間後において約 40 倍強のゲノム量が検出された。また、Swiss3T3 細胞に比べ CAF 様細胞では、Reovirus 作用後、アポトーシス関連遺伝子 Noxa および TRAIL の発現がそれぞれ約 6 倍、約 8 倍有意に上昇していた。以上より、CAF 様細胞に対して Reovirus が殺細胞効果を示すメカニズムとして、Reovirus ゲノムの増幅とそれに伴うアポトーシス遺伝子の発現上昇によることが示唆された。

(3) 担癌マウス由来 CAF の特性解析

担癌マウス由来 CAF (mCAF) は、B16 メラノーマ細胞を移植し形成させた皮下腫瘍より回収した。皮下腫瘍を回収し酵素処理したのち、PDGFR α 陽性/CD45 陰性細胞を mCAF として回収した。回収した細胞の約 80% が PDGFR α 陽性 /CD45 陰性であった。B16-dsRed-TK 細胞の混入率は、CAF 回収時で 2%以下であり、GCV 存在化で約 1 週間培養することで、1%以下に減少した。

CAF 関連遺伝子発現 (α -SMA, FAP, FSP-1) を定量的 RT-PCR 解析により検討した結果、Tail-fibroblast に比べ mCAF では α -SMA で約 2 倍、FAP で約 62 倍、FSP-1 で約 6.2 倍高い遺伝子発現が検出された。以上より、マウス腫瘍から純度よく mCAF を回収することに成功した。また、CAF で活性上昇が報告されている Cathepsin B および L の遺伝子発現を検討したところ、mCAF では Cathepsin B の発現は約 0.6 倍と僅かに減少していた一方で、Cathepsin L は約 10 倍高く発現していた。さらに Flowcytometry を用いて mCAF 上の JAM-A 発現を評価したところ、mCAF では約 45%の細胞が JAM-A を発現していた。

(4) 担癌マウス由来 CAF に対するレオウイルスの殺細胞効果

正常線維芽細胞である Tail-tip fibroblast に対し Reovirus を作用させたところ、細胞生存率は約 95%と殆どの細胞が死滅しなかった。それに対し、mCAF では MOI 5 で約 65%まで細胞生存率が低下した。また、Reovirus の濃度依存的に細胞生存率が低下した。以上より、Reovirus は癌細胞だけでなく CAF に対しても殺細胞効果を示すことが明らかになった。

さらに、Reovirus の mCAF に対する殺細胞効果において Reovirus の感染複製が重要かどうか検討するため、UV 照射により不活化させた Reovirus を mCAF に作用させ細胞生存率を検討した。その結果、UV-Reo 作用群では Reovirus 作用群と比較し、細胞生存率はほぼ完全に回復した。以上より、mCAF における Reovirus の殺細胞効果には Reovirus の複製が重要であることが示された。

(4) 担癌マウス由来 CAF に対するレオウイルスの感染機構の解明

mCAF に対してカテプシン B および L 阻害剤を添加したところ、Reovirus 作用後の細胞生存率は阻害剤非添加群では約 65%であったのに対し、統計的な有意差はなかったものの、カテプシン B 阻害剤添加群では約 71%まで上昇した。さらに、カテプシン L 阻害剤添加群では細胞生存率が完全に回復した。したがって、mCAF においても Reovirus が殺細胞効果を示すためには、特にカテプシン L が重要であることが示された。

一方で、TGF- β 阻害剤添加時における Reovirus 作用後の細胞生存率は、阻害剤非添加群では約 50%であったのに対し、統計的な有意差はなかったものの、TGF- β 阻害剤添加群では約 62%と回復した。以上より、mCAF においても Reovirus が殺細胞効果を示すためには、カテプシンおよび TGF- β が重要であることが示唆された。

Reovirus の s3 タンパク質に対する抗体を用いて mCAF 細胞内 Reovirus 感染複製について検討したところ、Reovirus 非作用群では Reovirus タンパク質は検出されなかった。一方で、Reovirus 作用群では Reovirus タンパク質陽性の CAF が検出された。以上より、Reovirus は mCAF に感染し複製していることが示された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

- 1) Kaminade T, Sakurai F, Tachibana M, Mizuguchi H. Reovirus-mediated lysis

of cancer-associated fibroblasts. The 21th annual meeting of Japanese Society of Gene Therapy. 2015.7.24-26. (大阪)

- 2) Kaminade T, Sakurai F, Tachibana M, Mizuguchi H. Reovirus-mediated lysis of cancer-associated fibroblasts. 第 74 回日本癌学会学術総会. 2015.10.8-10. (名古屋)
- 3) 上撫忠孝、立花雅史、水口裕之、櫻井文教. 腫瘍溶解性ウイルスであるレオウイルスの担癌マウス由来癌関連線維芽細胞に対する殺細胞効果に関する検討. 日本薬学会第 136 年会. 2016.3.26-29. (横浜)
- 4) Sakurai F, Kaminade T, Tachibana M, Doi T. Reovirus-mediated efficient killing of mouse cancer-associated fibroblasts. The 24th annual congress of European Society of Gene and Cell Therapy. 2016.10.18-21. (イタリア・フィレンツェ)
- 5) Sakurai F, Kaminade T, Tachibana M, Doi T. Reovirus-mediated efficient killing of mouse cancer-associated fibroblasts. 第 22 回日本遺伝子細胞治療学会. 2016.7.28-30 (東京)
- 6) 上撫忠孝、片山由貴、寶谷拓磨、根来亮介、立花雅史、水口裕之、櫻井文教. レオウイルスを用いたマウス由来癌関連線維芽細胞に対する殺細胞効果. 日本薬学会第 66 回近畿支部総会・大会. 2016.10.16 (大阪)
- 7) 栗栖 望、上撫 忠孝、水口 裕之、櫻井文教. レオウイルスの癌関連線維芽細胞に対する殺細胞効果に関する検討. 遺伝子デリバリー研究会第 17 回シンポジウム. 2017.5.27 (大阪)
- 8) 栗栖 望、上撫 忠孝、水口 裕之、櫻井文教. 腫瘍溶解性ウイルスであるレオウイルスによる癌関連線維芽細胞への殺細胞効果およびそのメカニズムに関する検討. 日本薬学会第 138 回年会. 2018.3.25-28. (金沢)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

組織線維化治療薬. 櫻井文教、水口裕之 (発明者). 特願 2016-27202. 2016.2.18.

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 文教 (SAKURAI FUMINORI)

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号: 70370939

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
藤原 俊義 (FUJIWARA TOSHIYOSHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00304303