

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19948

研究課題名(和文) 不活化ウイルス粒子による脳腫瘍幹細胞を標的とした新規核酸医薬療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel nucleic acid therapy for brain tumor stem cells using inactivated viral particle

研究代表者

松田 真秀 (MATSUDA, MASAHIDE)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30614333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：HVJ-E (HVJ envelope) はセンダイウイルス (HVJ: hemagglutinating virus of Japan) のゲノムRNAを破壊し複製能力を失わせた不活化粒子である。HVJ-Eはグリオーマ腫瘍幹細胞に対しても非常に強力な融合能を有しており、治療分子としての核酸を高効率で導入することが可能である。microRNAのうち腫瘍幹細胞性維持に関連するmiR-218およびmiR-34aを、HVJ-Eをベクターとしてグリオーマ腫瘍幹細胞に導入することは、悪性グリオーマに対する新規核酸医薬療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E) derived from inactivated replication-defective Sendai virus was originally developed as a versatile drug delivery system. We have shown the ability of HVJ-E to highly introduce oligonucleotide as a therapeutic molecule into glioma stem-like cells. In the present study, we have shown that introduction of stemness inhibitory microRNAs such as miR-218 or miR-34a using HVJ-E vector may become a novel nucleic acid therapy for malignant gliomas.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：不活化ウイルス粒子 microRNA 脳腫瘍幹細胞 核酸医薬療法

1. 研究開始当初の背景

(1)悪性神経膠腫治療における最大の課題は、放射線治療や化学療法に対する抵抗性を有し、再発を免れないことにある。近年、自己複製能および多分化能を有する腫瘍幹細胞がこの治療抵抗性の原因であるという報告が相次いでおり、これまでの治療法に加えてこの腫瘍幹細胞を標的とした治療法の開発が求められている。悪性神経膠腫における腫瘍幹細胞を対象とした研究が数多く行われ、いくつかの有望な治療標的分子が同定された。これらの治療標的を直接抑制する核酸を腫瘍幹細胞に導入することができれば、腫瘍幹細胞を標的とした理想的な治療法となりうる。また、核酸医薬として microRNA を用いることにより、場合によってはこれらの治療標的を複数同時に抑制することも可能となる。しかしながら、腫瘍幹細胞は正常幹細胞と同様に治療分子の導入が困難である特性を有しており、効率のよいベクターがないことがそれらの分子標的核酸医薬療法開発における大きな課題であった。

(2) HVJ-E とは、HVJ(hemagglutinating virus of Japan ; Sendai virus) に紫外線照射を加えることにより内部のゲノム RNA を破壊し複製能力を失わせた不活化粒子であり、安全かつ高効率な遺伝子治療用ベクターとして開発された。また近年、HVJ-E 自身の有する抗腫瘍効果が明らかとなっており、タイプ I インターフェロンの誘導による腫瘍細胞に対する直接的抗腫瘍効果が解明されている。HVJ-E の大きな特徴として、ウイルス粒子表面の糖蛋白質 F、HN による膜融合能を有す

ることから、内部に封入した RNA、DNA、蛋白質、薬物などを、標的細胞のエンドサイトーシスに頼ることなく、悪性神経膠腫細胞に高効率に導入できることが挙げられる。

2. 研究の目的

HVJ-E という高効率なベクターを用いて腫瘍幹細胞の治療標的分子に対する microRNA を導入することにより、腫瘍幹細胞を制御したうえで HVJ-E 自身による直接的抗腫瘍効果を発揮することが可能となり、悪性神経膠腫に対する新たな治療戦略となる可能性がある。HVJ-E ベクターの腫瘍幹細胞に対する治療分子導入効率の検討および腫瘍幹細胞を用いた細胞実験による腫瘍幹細胞制御 microRNA の同定を行う。最終的に、HVJ-E を用いて同定された microRNA を導入することによる治療効果を明らかにする。

3. 研究の方法

- HVJ-E は HVJ に 99 mJ/cm^2 の紫外線を照射して作製する。
- 悪性神経膠腫臨床検体から樹立した腫瘍幹細胞株およびマウス人工腫瘍幹細胞を用いて、HVJ-E ベクターの腫瘍幹細胞に対する治療分子導入効率を検討する。
- 本研究では下記の microRNA を治療分子の候補とする。
 - ✓ CXCL12/CXCR4 pathway (腫瘍幹細胞の増殖、血管ニッチの形成) に作用
 - ・ CXCL12 抑制的に機能する miR-27b
 - ・ CXCR4 抑制的に機能する miR-302-367

cluster

✓ epigenetic な制御（自己複製能等の stemness 維持）を行うポリコーム蛋白複合体に作用

・BMI1, SUZ1 抑制的に機能する miR-128

・BMI1 抑制的に機能する miR-218

✓ Notch pathway（自己複製能や腫瘍増殖）に作用

・NOTCH1, NOTCH2 抑制的に機能する miR-34a

- 腫瘍幹細胞株と腫瘍細胞株との間および人工腫瘍幹細胞とそれを分化誘導した細胞との間で microRNA 発現パターンの比較を行う。
- 皮下腫瘍モデルおよび脳腫瘍モデルにおける、HVJ-E 投与タイミング・回数、microRNA 至適封入量に関する条件検討を行う。
- 上記腫瘍モデルにおける治療効果解析を行う。

4 . 研究成果

・悪性神経膠腫臨床検体から樹立した腫瘍幹細胞株およびマウス人工腫瘍幹細胞を用いて、HVJ-E ベクターに FITC 標識核酸分子を封入して腫瘍幹細胞に対する治療分子導入効率を検討した結果、HVJ-E は両腫瘍幹細胞に対して非常に強力な融合能を有しており、その結果核酸分子を高効率で導入できることを明らかにした。

・臨床検体樹立腫瘍幹細胞株と複数の悪性神経膠腫細胞株とにおいて total RNA を回収し、両者で micro RNA 発現の差異を検討した。

複数の候補 microRNA を中心に解析を行ったところ、miR-218 の発現において両細胞間に著明な差異が存在することを見出した。複数の悪性神経膠腫細胞株では候補 microRNA のなかで miR-218 の発現が著明に亢進しており、一方腫瘍幹細胞では mir-218 発現は他の microRNA 同等に抑えられていた。このことから、腫瘍幹細胞においては、mir-218 発現抑制を通じてその標的分子である幹細胞性維持能を有する BMI1 の発現を高めている可能性があると考えられた。

・人工腫瘍幹細胞と人工腫瘍幹細胞を分化誘導した細胞との microRNA 発現パターンを比較解析したところ、分化誘導前の人工腫瘍幹細胞では miR-218 の発現が最も抑制されており、次いで miR-128a の発現が抑制されていた。その他、miR-34a の発現が人工腫瘍幹細胞では抑制されており、NOTCH pathway の発現亢進を通じて幹細胞性を維持している可能性が示唆された。

・HVJ-E を用いて miR-34a を導入したところ、人工腫瘍幹細胞自体の PD-L1 発現抑制が誘導された。このことから miR-34a を治療分子として用いることにより、幹細胞性維持抑制のみならず免疫チェックポイント阻害にも寄与する可能性が示唆された。

・すでに人工腫瘍幹細胞移植モデルに対する HVJ-E 投与タイミング・回数、microRNA 至適封入量に関する検討を終えており、皮下腫瘍モデルと脳腫瘍モデルを用いた治療実験を行い、効果解析を継続中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Matsuda M, Kohzuki H, Ishikawa E, Yamamoto T, Akutsu H, Takano S, Mizumoto M, Tsuboi K, Matsumura A. Prognostic analysis of patients who underwent gross total resection of newly diagnosed glioblastoma. J Clin Neurosci. 2018 Apr;50:172-176. (査読あり) doi: 10.1016/j.jocn.2018.01.009. Epub 2018 Feb 1.
2. Matsuda M, Ishikawa E, Yamamoto T, Akutsu H, Takano S, Matsumura A. Efficacy of bevacizumab therapy in recurrent malignant gliomas in relation to the prior recurrence pattern or tumor location. J Clin Neurosci. 40:115-119, 2017 (査読あり)
3. Matsuda M, Yamamoto T, Ishikawa E, Akutsu H, Takano S, Matsumura A. Combination of Palonosetron, Aprepitant, and Dexamethasone Effectively Controls Chemotherapy-induced Nausea and Vomiting in Patients Treated with Concomitant Temozolomide and Radiotherapy: Results of a Prospective Study. Neurol Med Chir (Tokyo). 56(11):698-703, 2016 (査読あり)
4. Matsuda M, Yamamoto T, Ishikawa E, Nakai K, Akutsu H, Onuma K, Matsumura A. Profile Analysis of Chemotherapy-induced Nausea and Vomiting in Patients Treated with Concomitant Temozolomide and Radiotherapy: Results of a Prospective Study. Neurol Med Chir (Tokyo). 55(9):749-55, 2015 (査読あり)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 松田真秀、石川栄一、山本哲哉、増田洋亮、

松村明：悪性脳腫瘍における新規腫瘍血管内皮細胞マーカーの発現評価と PET イメージング、日本脳神経外科学会第 76 回学術総会、2017.10.12-14 (名古屋)

2. 松田真秀、上月暎浩、石川栄一、山本哲哉、高野晋吾、松村明：全身状態不良 70 歳以上の高齢者膠芽腫における治療法選択とその限界、第 29 回日本老年脳神経外科学会、2016.4.23 (奈良)

3. 松田真秀、山本哲哉、石川栄一、高野晋吾、松村明：再発悪性神経膠腫に対する Bevacizumab の適応症例選択、第 21 回日本脳腫瘍の外科学会、2016.9.9-10 (東京)

4. 松田真秀、上月暎浩、石川栄一、高野晋吾、山本哲哉、松村明：膠芽腫肉眼的全摘出症例における治療戦略、第 34 回日本脳腫瘍学会学術集会、2016.12.4-6 (甲府)

5. 松田真秀、小沼邦之、石川栄一、山本哲哉、中井啓、高野晋吾、松村明：神経膠腫における MGMT 解析法 -各種解析法の比較および cut off 値の設定-、日本脳神経外科学会第 74 回学術総会、2015.10.14 (札幌)

6. 松田真秀、山本哲哉、石川栄一、高野晋吾、松村明：悪性神経膠腫における Bevacizumab 反応性に関する検討、第 33 回日本脳腫瘍学会学術集会、2015.12.7 (京都)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松田 真秀 (MATSUDA MASAHIDE)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30614333

(4)研究協力者

杉井 成志 (SUGII NARUSHI)

筑波大学・人間総合科学研究科・疾患制御

医学専攻・博士課程