

令和元年6月10日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10484

研究課題名(和文) 悪性中皮腫に対する増殖型レトロウイルスを用いた自殺遺伝子療法の開発

研究課題名(英文) Development of retroviral replicating vector-mediated suicide gene therapy for malignant mesothelioma

研究代表者

久保 秀司 (KUBO, Shuji)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10441320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：増殖型レトロウイルス(RRV)は、癌細胞特異的に感染・増殖し、腫瘍内で効率よく拡散・伝播する。このRRVに自殺遺伝子を搭載させることによって、薬物前駆体投与で腫瘍細胞死を誘導することができる。本研究では、RRVの感染力を高め、治療効果を増強させる工夫として、我々が開発した受容体を異にする2種類のRRV (AMLVとGALV)を用いて、受容体発現に基づいた個別化ウイルス療法および重感染による自殺遺伝子併用療法が可能性を示した。さらに間葉系幹細胞が癌に集積する特性を利用し、この細胞をキャリアとしてRRVを癌に効率良く到達・分配させる方法の原理証明を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、RRVを用いた自殺遺伝子療法の効果増強及び適応拡大が期待され、臨床応用可能な実用性の高いウイルス療法開発につながることを期待される。悪性中皮腫のみならず、播種性癌の患者の予後やQuality of Lifeを大きく改善する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Retroviral replicating vectors (RRV) have demonstrated efficient tumor transduction and dramatic survival benefit when employed for suicide gene in a variety of cancer models. In order to increase transduction efficiency and enhance therapeutic effect, we have created two different RRVs (AMLV and GALV) that use different receptors. Using these vectors, we showed a potential feasibility of a personalized virotherapy on the basis of the cellular receptor expression profiles, and also a dual-vector suicide gene therapy using two different RRVs carrying different suicide genes. Furthermore, we also showed the potential utility of tumor-homing mesenchymal stem cells to deliver RRV more efficiently and further enhance the efficacy of RRV-mediated gene therapy for systemic and metastatic cancers.

研究分野：細胞・遺伝子治療

キーワード：がんウイルス療法 増殖型レトロウイルス 自殺遺伝子 間葉系幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、増殖型レトロウイルスベクター(RRV: Retroviral Replicating Vector)を開発し、これを用いた癌の自殺遺伝子療法の開発を進めている。RRVは、(1)盛んに分裂する細胞にのみ感染し、体内で通常は分裂停止している正常細胞には感染しない。(2)自然免疫により正常細胞では増殖しないが、免疫特権状態にある腫瘍細胞では増殖する。以上の特質により、RRVは癌細胞特異的に感染・増殖することがこれまでの研究で明らかとなっている(Hum Gene Ther 2001, 12, 921-32, 他多数)。癌ウイルス療法に現在用いられている他の腫瘍溶解性ウイルスとは異なり、RRVは細胞障害性や免疫原性が極めて低く、また染色体組み込みにより安定して癌細胞に留まることができるため、腫瘍内投与後、確実に腫瘍全体に伝播するユニークなベクターである。自殺遺伝子(薬剤代謝酵素遺伝子)を発現するRRVを用いた場合、プロドラッグ(無毒)を投与することで、RRV感染腫瘍細胞内で有毒代謝産物に転換され、腫瘍細胞死を誘導することができる。

我々は、マウスを宿主とする Amphotropic murine leukemia virus (AMLV)を基盤とした RRV (AMLV-RRV)を既に開発し、様々な癌モデルにおいて、高い感染・伝播効率により優れた治療効果を示すことを明らかにしてきた(Mol Ther 2005, 12, 842-51, 他多数)。中でも自殺遺伝子 Cytosine deaminase を発現する AMLV-RRV については、現在、米国において悪性神経腫瘍に対し第3相臨床試験が行われ、生存期間の延長を含む良好な結果が得られている(投稿準備中)。悪性中皮腫に対しても、我々は、これまでに AMLV-RRV の有効性を示してきた(Cancer Gene Ther, 18, 571-8, 2011; Cancer Gene Ther, 20, 671-7, 2013)。

しかし腫瘍細胞株によっては、十分な感染力と効果が得られない細胞株が存在することも明らかになってきた。この原因を検討した結果、これらの細胞株では、AMLV受容体であるリン酸トランスポーター2 (PiT-2)の発現が低く、別のリン酸トランスポーターである PiT-1 の発現が高いことを見出した。この結果に基づき、我々は、最近、PiT-1 を受容体として感染することが知られている、テナガザルを宿主とする Gibbon ape leukemia virus (GALV)を基盤とした RRV を開発した(GALV-RRV)。この GALV-RRV は AMLV-RRV に比べ、PiT-2 低発現腫瘍細胞株における感染・伝播効率と抗腫瘍効果が格段に増強した(Cancer Gene Ther. 2013, 20, 671-677)。これは将来的に、受容体の発現を調べることによりウイルスを選択し投与する個別化ウイルス療法の可能性を示唆する。

RRVを用いた自殺遺伝子療法は、プロドラッグの有毒代謝産物への代謝がウイルス感染細胞すなわち腫瘍細胞内に限局される「細胞内化学療法」である。これにより、全身化学療法に見られる有害な副作用を回避しつつ、腫瘍細胞内において有毒代謝産物の高濃度曝露が可能となり、腫瘍特異的な殺細胞効果による安全で強力な抗腫瘍効果が得られる。しかし化学療法の一つであることから、いずれ薬剤耐性が生じる可能性があり、他との併用療法が現実的である。一つの方法として異なる自殺遺伝子同士の併用が考えられるが、増殖型ウイルスを用いた場合、感染細胞内で産生されるエンベロープ蛋白がこの受容体と細胞内で結合してしまうため、同じ受容体を介して感染するウイルスは最早感染しない(受容体干渉)。しかし異なる受容体を介して感染するウイルスなら感染しうる。予備実験において、AMLV感染細胞に AMLV は感染しないが GALV は感染する、また GALV 感染細胞に GALV は感染しないが AMLV は感染することは既に確認済みである。すなわち異なる受容体を介してそれぞれ感染する AMLV と GALV の2つの RRV が揃ったことで重感染による自殺遺伝子の併用療法が可能となり、その応用により抗腫瘍効果の増強が期待される。

悪性胸膜中皮腫は胸膜に沿って薄く進展するものが多く、遺伝子治療の際にはウイルスベクターを腫瘍内に直接投与することが困難であるため、胸腔内投与が一般的に行われている。しかし同所移植マウスモデルを用いた予備実験の結果、RRV 胸腔内投与では十分な感染効率と安定した抗腫瘍効果が認められなかった(未発表)。この原因として、アデノウイルスやヘルペスウイルスに比べ、RRVはウイルスタイター(濃度)が低く、また補体や中和抗体で容易に不活化されることが挙げられ、そもそも胸腔内や血管内投与では効果を期待し難い。そこで間葉系幹細胞が癌に集積する特性を利用し、この細胞をキャリアとして癌に効率良く RRV を到達・分配させる新しい手法の開発を目指す。

### 2. 研究の目的

RRVを用いた自殺遺伝子療法の効果を最適化するため、以下の3点を明らかにする。

- (1) 腫瘍細胞株における RRV の受容体発現と感染・増殖効率を比較検討する。
- (2) RRV 単独及び併用による自殺遺伝子療法の効果を比較検討する。
- (3) 間葉系幹細胞を RRV キャリアとする自殺遺伝子療法の有用性と安全性を評価する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 腫瘍細胞における RRV 受容体の発現と RRV 感染・増殖効率を比較検討

##### ① RRV 受容体発現の検討

ヒト悪性中皮腫の市販細胞株6種(ACC-MESO-1, ACC-MESO-4, MSTO-211H, NCI-H28, NCI-H2052, NCI-H2452)、ヒト骨肉腫の市販細胞株5種(HOS, MNNG-HOS, MG-63, Saos-2, U2OS)及び正常細胞(正常中皮細胞、正常骨芽細胞、及び線維芽細胞)を用いて、RRVの細

胞受容体であるPiT-1及びPiT-2の発現をqPCRで検討する。

## ② in vitroでのRRV感染、増殖、伝播の効率検討

これまでに作製済みである蛍光蛋白のGFP(緑)や mCherry(赤)を発現するRRVを用いて、上記の初代培養腫瘍細胞及び市販細胞株における感染、増殖、伝播の効率をフローサイトメーターを用いて経時的に解析し、受容体発現とRRVの感染・伝播効率を比較評価する。PiT-1及びPiT-2両受容体が発現し、GALV及びAMLVが効率良く感染・伝播する細胞株を選別し、以下の併用療法の実験に用いる。どちらか一方の受容体しか発現せず、一方のRRVしか感染・伝播しない腫瘍細胞株に関しては、受容体の発現によりAMLV/GALVを使い分ける個別化ウイルス療法につながるデータ収集のため、それぞれ単独で感染・増殖効率及び殺細胞効果を比較検討する。

## (2) RRV自殺遺伝子単独及び併用療法による抗腫瘍効果の比較検討

### ① in vitroでの検討

自殺遺伝子としてCytosine deaminase (CD) 及び Herpes simplex virus thymidine kinase (TK)をそれぞれ発現するRRV (AMLV-CD, AMLV-TK, GALV-CD, GALV-TK)を単独及び併用で、悪性中皮腫細胞株及び正常細胞に感染させ、プロドラッグである5-フルオロシチン(5-FC)及びガンシクロビル(GCV)存在下で各ウイルスによる殺細胞効果をクリスタルバイオレット法及びアラマーブルー法にて比較検討する。

### ② 皮下腫瘍モデルでの検討

ヌードマウスの皮下に悪性中皮腫細胞株を移植し、腫瘍径が5mmになった時点で、AMLV-CD, AMLV-TK, GALV-CD, GALV-TKを単独及び併用で腫瘍内投与する。その10日目から5-FC及びGCVを腹腔内に2週間隔日投与する。定期的に腫瘍径を測定し、抗腫瘍効果を比較検討する。観察期間終了時点でマウスを安楽死させ、病理組織学的検討を行う。

## (3) 間葉系幹細胞をRRVキャリアとする自殺遺伝子療法の有用性と安全性の評価

### ① 間葉系幹細胞へのRRV感染、増殖、伝播の効率と感染許容量の検討

ヒト間葉系幹細胞(骨髄由来、脂肪由来、臍帯由来)のRRV感染効率及び増殖・伝播効率を検討する。また、間葉系幹細胞がどの程度の量のRRV感染に耐えられるかを評価し、キャリアとしてのRRV許容量を決定する。

### ② 間葉系幹細胞の悪性中皮腫への集積、RRV伝達、腫瘍内RRV伝播の評価

レンチウイルスベクターを用いてmCherry標識した悪性中皮腫細胞株をヌードマウスの皮下、腹腔内にそれぞれ移植した担癌モデルを作製する。その2週間後、ルシフェラーゼ発現RRV(AMLV及びGALV)をそれぞれ感染させたヒト間葉系幹細胞を静脈内投与し、in vivo imaging system (IVIS)を用い経時的に解析することで、RRVを内包する間葉系幹細胞(発光)が腫瘍(赤色蛍光)に集積するか否かを観察する。また上記マウスを安楽死させ、病理組織学的検討を併せて行い、腫瘍内へのマウス間葉系幹細胞の集積、RRV伝達、腫瘍内RRV伝播を評価する。この時、腫瘍内にRRVが十分に伝播するのに要する時間を決めておく。

## 4. 研究成果

### (1) 腫瘍細胞におけるRRV受容体の発現とRRV感染・増殖効率を比較検討

#### ① RRV受容体発現の検討

ヒト悪性中皮腫の市販細胞株6種(ACC-MESO-1, ACC-MESO-4, MSTO-211H, NCI-H28, NCI-H2052, NCI-H2452)については、全ての株で、PiT-1の発現がPiT-2より高値であった(Cancer Gene Ther. 2013, 20, 671-677)。中でもACC-MESO-1については、PiT-2の発現は極めて低値であった。一方で、ヒト骨肉腫の市販細胞株5種(HOS, MNNG-HOS, MG-63, Saos-2, U2OS)については、ほぼ全ての株で、PiT-1の発現がPiT-2より低値であった(Cancer Gene Ther. 2019, 26, 41-47)。正常細胞(正常中皮細胞、正常骨芽細胞、及び線維芽細胞)については、両受容体ともほぼ同等に発現し腫瘍細胞に比べて低値であった。

#### ② in vitroでのRRV感染、増殖、伝播の効率検討

GFPを発現するGALV及びAMLVを用いて検討では、ヒト悪性中皮腫細胞株6種においては、全体的にGALVはAMLVに比べ感染・伝播効率が高かった(Cancer Gene Ther. 2013, 20, 671-677)。中でもPiT-2低発現腫瘍細胞株ACC-MESO-1においては、GALVはAMLVに比べ感染・伝播効率が著しく高かった。一方、ヒト骨肉腫の市販細胞株5種においては、全体的にAMLVはGALVに比べ感染・伝播効率が高かった(Cancer Gene Ther. 2019, 26, 41-47)。中でもPiT-1低発現腫瘍細胞株HOS, MG-63, Saos-2においては、AMLVはGALVに比べ感

染・伝播効率が著しく高かった。以上と上記(1)–①の結果から、AMLV/GALV両ウイルスのin vitroにおける感染、増殖、伝播の効率は、両受容体それぞれの発現レベルと相関することが明らかとなった。また正常細胞においては、いずれも両ウイルスの感染・伝播効率は極めて低かった (Cancer Gene Ther. 2013, 20, 671–677; Cancer Gene Ther. 2019, 26, 41–47)。

PiT-1及びPiT-2高発現株であるHep3Bを用いた検討では、AMLV/GALVについて、I)互いに受容体干渉を受けなかった、II)塩基配列類似性が低く相同組換えのリスクが低かった、III)重感染させても、お互いの複製増殖に干渉しなかった、IV)多くの腫瘍細胞がAMLV/GALV両感受性であった(Cancer Gene Ther. 2019, 26, 128-135)。この結果、多くの腫瘍細胞においてAMLV/GALVは安定した重感染が可能であることが明らかとなった。

## (2) RRV自殺遺伝子単独及び併用療法による抗腫瘍効果の比較検討

### ① in vitroでの検討

自殺遺伝子CD及びTKをそれぞれ発現するRRV (AMLV-CD, AMLV-TK, GALV-CD, GALV-TK)を単独及び併用で、Hep3B腫瘍細胞に感染させ、プロドラッグである5-フルオロシトシン(5-FC)及びガンシクロビル(GCV)存在下で各ウイルスによる殺細胞効果を比較検討したところ、いずれの組み合わせの併用でも単独に比べて殺細胞効果の増強を認めた。同じ自殺遺伝子同士の併用では相加効果、異なる自殺遺伝子同士の組み合わせでは相乗効果が得られた(Cancer Gene Ther. 2019, 26, 128-135)。

### ② 皮下腫瘍モデルでの検討

ヌードマウスの皮下にMG-63腫瘍細胞株(低PiT-1高PiT-2発現)を移植し、腫瘍径が5mmになった時点で、AMLV-CD, GALV-CDを腫瘍内投与し、継時的に抗腫瘍効果を比較検討したところ、AMLVはGALVに比べて5-FC投与開始後に有意な腫瘍増殖抑制効果を示した。(Cancer Gene Ther. 2019, 26, 41–47)。

## (3) 間葉系幹細胞をRRVキャリアとする自殺遺伝子療法の有用性と安全性の評価

### ① 間葉系幹細胞へのRRV感染、増殖、伝播の効率と感染許容量の検討

AMLV/GALVはいずれもヒト間葉系幹細胞(骨髄由来、脂肪由来、臍帯由来)にそれぞれ感染するが、in vitroでの増殖・伝播効率は低かった。しかし感染ウイルス量を増やすことでほぼ100%の感染効率が得られ、in vitroにおける腫瘍細胞への遊走能に影響を与えることはなかった。Transwell-plateを用いた検討では、脂肪、骨髄、臍帯由来のヒト間葉系幹細胞全てが腫瘍細胞への遊走性を示したが、その遊走能は由来により異なり、脂肪及び臍帯由来のものが骨髄由来のものより高かった。ヒト間葉系幹細胞から腫瘍細胞へのRRV伝達効率は、共培養下ではTranswell系より高効率であった。

### ② 間葉系幹細胞の悪性中皮腫への集積、RRV伝達、腫瘍内RRV伝播の評価

mCherry標識した悪性中皮腫細胞株MSTO-211Hをヌードマウスの皮下、腹腔内にそれぞれ移植した担癌モデルを作製する。その3～7日後、GFP発現RRV(AMLV及びGALV)をそれぞれ感染させたヒト間葉系幹細胞を静脈内投与(皮下腫瘍モデル)、腹腔内投与(腹腔内播種モデル)し、IVISを用い経時的に解析した。皮下腫瘍及び腹膜播種モデルにおいて、それぞれ静脈投与、腹腔内投与したヒト間葉系幹細胞の腫瘍集積と腫瘍へのRRV伝達を認めたが、骨髄に比べて脂肪と臍帯由来の間葉系幹細胞の効率が高かった。

以上の結果を纏めると、AMLV/GALV 2種類のRRVが揃ったことによって、1) 受容体発現に基づく個別化ウイルス療法、2) RRV重感染による自殺遺伝子併用療法が可能となり、抗腫瘍効果の増強が期待された。また、3) 間葉系幹細胞を運搬体としてRRVを腫瘍に効率よく到達・分配する新技術の原理証明がなされた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3件)

- ① Dual-vector prodrug activator gene therapy using retroviral replicating vectors.  
Kubo S, Takagi-Kimura M, Tagawa M, Kasahara N.  
Cancer Gene Ther. 2019 26:128-135. doi: 10.1038/s41417-018-0051-0. PMID: 30348946, 査読有
- ② Efficient tumor transduction and antitumor efficacy in experimental human osteosarcoma using retroviral replicating vectors.  
Kubo S, Takagi-Kimura M, Kasahara N.

[学会発表] (計 20件)

- ① Shuji Kubo, Misato Takagi-Kimura and Noriyuki Kasahara  
Potential Utility of Mesenchymal Stem Cells as Retroviral Replicating Vector Delivery Vehicles for Gene Therapy of Cancer  
21th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy(国際学会) 2018年
- ② 久保秀司、木村(高木)美智、笠原典之  
骨肉腫に対する細胞死誘導型がんウイルス療法  
第25回日本遺伝子診療学会大会 2018年
- ③ Shuji Kubo, Misato Takagi-Kimura and Noriyuki Kasahara  
Human Mesenchymal Stem Cells as Cellular Vehicles to Deliver Retroviral Replicating Vectors for Cancer Gene Therapy  
第24回日本遺伝子細胞治療学会学術集会 2018年
- ④ 久保秀司、木村(高木)美智、山野智基、田川雅敏、笠原典之  
Mesenchymal Stem Cells Can Be Used As Carriers Of Retroviral Replicating Vectors For Cancer Gene Therapy  
第77回日本癌学会学術総会 2018年
- ⑤ 久保秀司、木村(高木)美智、笠原典之  
幹細胞をキャリアとして利用した増殖型レトロウイルスによる癌自殺遺伝子療法の開発  
日本人類遺伝学会第63回大会 2018年
- ⑥ Shuji Kubo, Misato Takagi-Kimura, Masatoshi Tagawa, Noriyuki Kasahara  
Human Mesenchymal Stem Cells as Cellular Vehicles to Deliver Retroviral Replicating Vectors for Cancer Gene Therapy  
Annual Meeting of the European Society of Gene and Cell Therapy 2018(国際学会) 2018年
- ⑦ Shuji Kubo, Misato Takagi-Kimura, Lisa Isoda, Noriyuki Kasahara  
Retroviral replicating vector-mediated suicide gene therapy for solid tumors  
第41回日本分子生物学会年会 2018年
- ⑧ Misato Takagi-Kimura, Lisa Isoda, Noriyuki Kasahara, Shuji Kubo  
Mesenchymal stem cells as carriers of retroviral replicating vectors for cancer gene therapy  
第41回日本分子生物学会年会 2018年
- ⑨ 久保秀司  
増殖型レトロウイルスを用いた自殺遺伝子療法の開発  
2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会) シンポジウム  
2017年
- ⑩ Kubo S, Takagi-Kimura M, Kasahara N  
Prodrug activator gene therapy using retroviral replicating vectors in an experimental model of human osteosarcoma  
20th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy(国際学会) 2017年
- ⑪ Kubo S, Takagi-Kimura M, Kasahara N  
Retroviral replicating vector-mediated prodrug activator gene therapy in an experimental model of human osteosarcoma  
Annual Meeting of the European Society of Gene and Cell Therapy 2017(国際学会) 2017年
- ⑫ 久保秀司  
増殖型レトロウイルスを用いた細胞死誘導型癌ウイルス療法の開発  
金沢大学薬学シンポジウム 2017 2017年

- ⑬ Kubo S, Takagi-Kimura M, Kasahara N  
Retroviral replicating vector-mediated prodrug activator gene therapy for osteosarcoma  
第 23 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会 2017 年
- ⑭ 久保秀司、木村(高木)美智、山野智基、笠原典之  
Retroviral replicating vector-mediated suicide gene therapy for osteosarcoma  
第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年
- ⑮ Shuji Kubo, Misato Takagi-Kimura, Noriyuki Kasahara  
Suicide gene therapy using retroviral replicating vectors in an experimental model of  
human osteosarcoma  
第 62 回日本人類遺伝学会第 62 回大会 2017 年
- ⑯ Kubo S, Takagi-Kimura M, Logg CR, Hermann K, Kasahara N  
Combinatorial anti-angiogenic gene therapy in a human malignant mesothelioma  
model.  
19th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy(国際学会) 2016 年
- ⑰ Kubo S, Mawatari-Furukawa Y, Kasahara N  
Customization of virotherapy with retroviral replicating vectors on the basis of cellular  
receptor expression profiles.  
Annual Meeting of the European Society of Gene and Cell Therapy 2016(国際学会)  
2016 年
- ⑱ Kubo S, Yamano T, Kasahara N  
A tailor-made virotherapy with retroviral replicating vectors on the basis of the receptor  
expression  
第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年
- ⑲ Kubo S, Mawatari-Furukawa Y, Sakagami R, Kasahara N  
Customization of virotherapy with replicating retroviral replicating vectors on the basis  
of cellular receptor expression profiles.  
第 22 回日本遺伝子細胞治療学会学術総会 2016 年
- ⑳ 久保秀司、山野智基、笠原典之  
増殖型レトロウイルスを用いた個別化ウイルス療法の可能性  
第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

○なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：山野 智基

ローマ字氏名：YAMANO, Tomoki

所属研究機関名：兵庫医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：00599318

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。