

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19138

研究課題名(和文) 腫瘍溶解能を増強した選択的抗腫瘍レオウイルスによる癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of viral oncolytic agent using mammalian orthoreovirus with improved infectivity

研究代表者

金井 祐太 (KANAI, YUTA)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：80506501

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)：哺乳類レオウイルス(MRV)は、腫瘍溶解性ウイルスとして、新規癌治療法への開発が期待されている。我々はMRV粒子表面に位置するSigma1タンパク質にインテグリン結合能を有するRGD配列を付加した遺伝子組換えMRVを作製したところ、野生型MRVに抵抗性を示す癌細胞への感染性が向上した。このRGD-MRVを用いて担癌マウスモデルにおける腫瘍溶解能を調べたが、野生型MRVと有意な差は得られなかった。すなわち、in vitroにおいて野生型MRVに抵抗性であった癌細胞が、マウス皮下に移植することで感受性を示すことが明らかとなり、今後の実験を進める上で、有用な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Mammalian Reovirus (MRV) has important capacity that MRV show selective oncolytic activity in cancer cells. Currently, wild type T3D-C strain, which displays significant oncolytic activity, is developed as viral oncolytic agent. We generated recombinant RGD-MRV which has integrin-interactive RGD motif in MRV sigma1 protein to enable infection to MRV-resistant cancer cells via MRV receptor independent manner. This RGD-MRV exhibited enhanced infectivity and oncolysis of reovirus-resistant cancer cell. We generated various RGD-MRV variants which possessed multiple RGD motif, but not positive synergistic effect was observed. We examined the oncolytic activity of RGD-MRV to tumour in mice, but there were no significant differences in the oncolytic effect between RGD-MRV and wild-type MRV. That was, particular cancer cells resistant to infection of wild-type MRV transformed to be sensitive when the cells established tumour under mice skin.

研究分野：ウイルス学

キーワード：レオウイルス 癌 遺伝子治療 腫瘍溶解性ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍溶解性ウイルスによる癌治療法の開発が盛んに行われている。2015年には、ヘルペスウイルスを基盤とした、世界初の抗腫瘍ウイルス製剤である「Talimogene Laherparepvec (T-VEC)」が米国で認可され、その治療効果に大きな注目が集まっている。T-VECは野生型ヘルペスウイルス I 型を基盤とし、病原性に関与する ICP34.5 遺伝子を除去し、さらに宿主の癌免疫反応を促進するための GM-CSF をウイルス遺伝子に組み込むことで、低病原性かつ抗腫瘍溶解能の獲得に成功した。T-VEC の成果次第で、今後の腫瘍溶解性ウイルス療法の開発が盛んになると期待される。

哺乳類オルソレオウイルス (MRV) は 10 分節 2 本鎖 RNA をゲノムとして保持している。野生型 MRV はヒトに対して極めて病原性が低いこと (実験分類クラス 1)、腫瘍の約 80% で活性化している Ras 経路依存的に癌細胞のみで特異的に増殖することが知られている。MRV は選択的腫瘍溶解性ウイルスとして、様々な癌に対する臨床研究が精力的に進められている。頭頸部癌を対象とした臨床研究については第 3 相試験が行われ、良好な成績を収めている。しかし、現在進行中の研究は、野生型 MRV を用いた治療であり、殺腫瘍効果の観点から問題点が指摘されている。そのため、これらの課題を克服するため、遺伝子改変技術による腫瘍溶解性 MRV の開発・改良研究の進展がこれまで切望されてきた。

我々は遺伝子操作系を駆使した遺伝子組換え MRV を利用することで、より有用な腫瘍溶解性 MRV の作製を目指して研究を行っており、これまでに以下の成果を獲得している。

- 申請者達は MRV ならびにコウモリ由来高病原性レオウイルスの遺伝子操作系 (RG 系) を世界に先駆けて開発した (Kobayashi et al., 2007, *Cell Host Microbe*; Kawagishi, Kanai et al., *PLoS Pathogens*)。これらの技術を応用し、多様な MRV 株が存在する中で、癌臨床研究に最も有用な癌治療用の MRV 株 (T3D-C 株) における RG 系を確立した (第 61 回日本ウイルス学会)。本成果は腫瘍溶解性 MRV の開発研究において基

盤となる技術である。

- T3D-C 株由来の RG 系を用いて、ウイルス粒子表面に存在し、吸着・侵入の必須因子である  $\sigma 1$  のループ構造内 (3 箇所) にインテグリン結合 (RGD) 配列を付加した組換え MRV (RGD-MRV) を作製した。RGD-MRV は MRV 感染受容体である JAM-A の発現を欠き、感染抵抗性を示す癌細胞に対して高い殺腫瘍効果を示した (第 21 回日本遺伝子治療学会)。これは MRV の遺伝子改変により、癌細胞への感染増強を可能にした初めての報告である。
- 自己切断活性を有する 2A 配列を介して、バイシストロン性発現 MRV L1 遺伝子を構築し、L1 遺伝子産物およびレポーター遺伝子 (Luciferase) を発現する MRV を作出した。癌移植ヌードマウスに Luciferase 発現 MRV を癌細胞内投与または静脈投与した結果、癌細胞でのみ特異的な Luciferase 発現が認められた。 (第 62 回日本ウイルス学会)。本研究は *in vivo* における癌細胞のバイオイメージング・検出に有用なだけでなく、癌免疫遺伝子等の外来遺伝子発現 MRV を作製する上で極めて重要な成果である。

## 2. 研究の目的

本研究では、先行開発に成功した MRV 癌治療株 (T3D-C 株) にインテグリン結合能を持つ RGD 配列を付加することで抗腫瘍活性を増強した MRV-RGD を元に、さらなる改良を加えた MRV 株の作製を試みた。得られた MRV-RGD 株を用いて、野生型 MRV に対して抵抗性を示す癌細胞に対する抗腫瘍効果を測定し、さらに担癌マウスモデルを用いて、*in vivo* における抗腫瘍活性について検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) RGD 配列付加ウイルスの作製

MRV T3D-C の S1 遺伝子分節にコードされている  $\sigma 1$  タンパクに RGD (アルギニン (R), グリシン (G), アスパラギン酸 (D)) を PCR mutagenesis 法により付加した。RGD 配列は  $\sigma 1$  の結晶構造を参考に、分子表面に位置する複数のループ領域 (AB, CD, EF, GH ループ) および  $\sigma 1$  タンパクの C 末端側の 1 か

所もしくは任意の2か所に挿入した。RGDを挿入したS1遺伝子のcDNAを他9分節の野生型cDNAと共にL929細胞にトランスフェクションすることで、sigma1の様々な箇所にRGD配列を付加した組換えMRV (RGD-MRV-AB, -CD, -EF, -GHおよび-c-term)を作製した。

### (2) Crispr-Cas9 システムによる JAM-A ノックアウト細胞の作製

さらにRGD配列とJAM-Aの有無を明確にするため、JAM-A ノックアウト細胞の確立を試みた。野生型MRV感染に高感受性であるDLD1細胞(ヒト結腸腺癌)およびHCT15細胞(ヒト結腸腺癌)に、JAM-A遺伝子の部分配列(ガイドRNA)とCas9遺伝子をコードしたプラスミドをトランスフェクションにより導入し、細胞クローニングにより、JAM-A ノックアウト細胞のスクリーニングと細胞株樹立を行った。

### (3) 担癌マウスを用いた in vivo での抗腫瘍活性の検討

JAM-A ノックアウトDLD-1細胞をヌードマウスの皮下に接種し、担癌マウスを作製した。腫瘍サイズが直径5mm以上になった後に、野生型MRVおよびMRV RGD-EFを腫瘍内に直接投与した。一度の投与で $1.0 \times 10^7$  pfuを投与し2-3日に一度の割合で投与を繰り返した。腫瘍サイズはウイルス投与時に測定し、以下の計算式により腫瘍体積を推定した。

$$\text{体積} = 4/3 \times 3.14 \times \text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径}$$

## 4. 研究成果

(1) 我々はこれまでの研究で、MRVの中でも腫瘍溶解活性が強いMRV T3D-c株の遺伝子操作系を確立した。遺伝子組換えによって得られた組換えT3D-c株(rsT3D-c)は野生型と同程度の強い腫瘍溶解活性を示した(図1)。さらにT3D-c株を用いて、MRVに感染抵抗性で

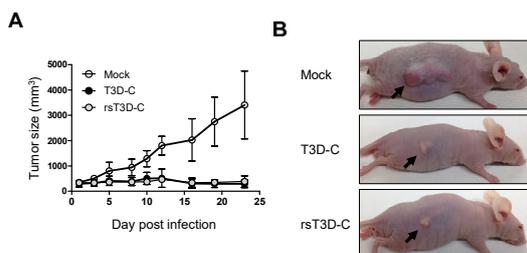


図1 組換えMRV T3D-c株(rsT3D-c)による腫瘍溶解活性。A253細胞(頭頸部癌由来)を皮下移植したヌードマウスを用いて、腫瘍内に野生型MRV T3D-c型およびrsT3D-c型ウイルスを2-3日間隔で投与し、腫瘍のサイズを計測した(A)。(B) 感染24日後における腫瘍の外観。

ある癌細胞に対する感染性を向上した組換えMRV株の作製を試みた。野生型MRVは細胞表面に発現するJAM-A分子を感染受容体として利用するが、JAM-Aの発現が低下した癌細胞はMRVに対し感染抵抗性となっていることが知られている。MRVのsigma1タンパク質に、特定のインテグリン( $\alpha_v\beta_3$ 型もしくは $\alpha_v\beta_5$ 型)に対して結合能を示すRGDペプチド配列を付加したRGD-MRVの作製を行った。MRV T3D-C株のsigma1に複数あるループ構造(AB, CD, EF, GHループ)もしくはC末端領域にRGD配列を付加したMRV(それぞれRGD-AB, RGD-CD, RGD-EF, RGD-GHおよびRGD-Cterm)を作製したところ、JAM-A発現低下癌細胞において、感染性と腫瘍溶解活性の向上が認められた(図2, 3)。RGD配列の付加効果は、挿入位置に大きく依存し、試験に供した4種の癌細胞においていずれもEFループに挿入したRGD-EFは効果が大きく、反対にRGD-CDではほとんど効果が得られないことが明らかとなった。この結果からRGD-EFを以下の実験に用いた。

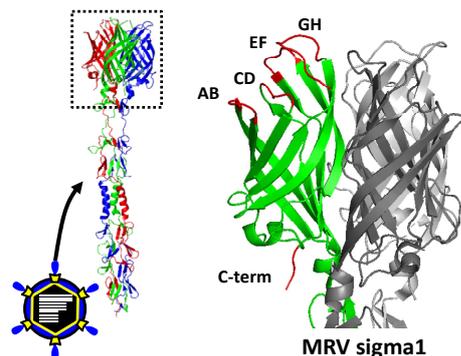


図2 MRV sigma1タンパク質表面のループ構造。

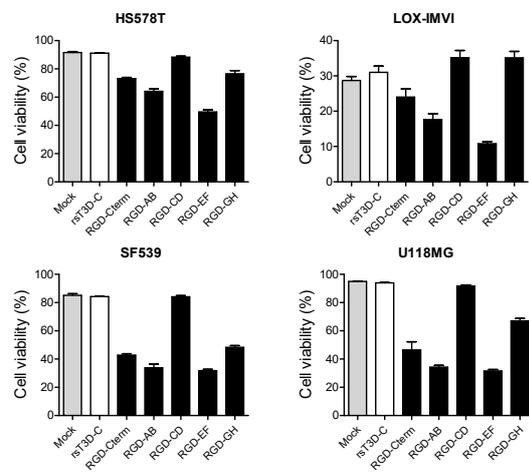


図3 RGD-MRVによる抗腫瘍活性の亢進。JAM-A発現低下癌細胞に対するRGD配列を付加したRGD-MRVの腫瘍溶解活性。

(2) 次に RGD の付加効果をより詳細に調べる目的で、JAM-A ノックアウト癌細胞の作製を試みた。Crispr-Cas9 系を利用して JAM-A 遺伝子をノックアウトした DLD1 細胞株 (大腸癌細胞) および HCT15 細胞株 (大腸癌細胞) を樹立し、ウェスタンブロッティングにより JAM-A のノックアウトが確認された (図 4)。

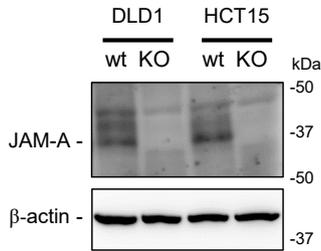


図4 JAM-Aノックアウト癌細胞株の樹立

樹立した 2 種の JAM-A ノックアウト細胞を用いて MRV の抗腫瘍活性を調べたところ、JAM-A をノックアウトすることで野生型 MRV (rsT3D-C) の感染性が低下することが確認された。さらに RGD を付加することで感染性の向上が認められた (図 5)。RGD 挿入箇所に

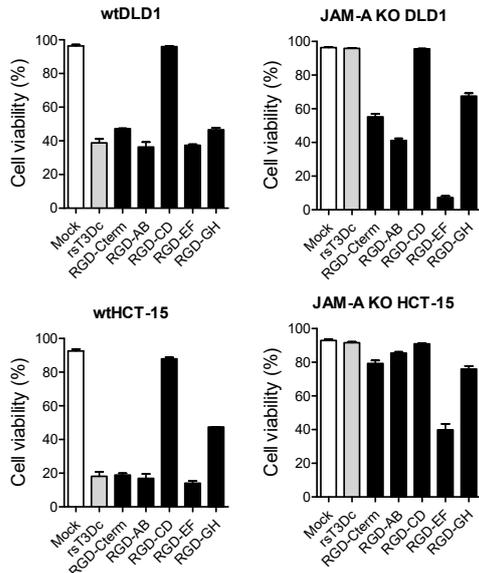


図5 野生型およびJAM-Aノックアウト癌細胞に対するRGD-MRVの腫瘍溶解活性

よる効果については JAM-A 発現低下癌細胞株と同様に RGD-EF が最も効果が高く、RGD-CD ではほとんど効果が得られなかった。

また JAM-A ノックアウト DLD1 細胞に対する RGD-EF の感染は、抗インテグリン抗体により阻害されたことから、RGD-MRV の感染が RGD-インテグリン結合に依存していることが確認された (図 6)。

さらに、RGD 配列を複数箇所に挿入する

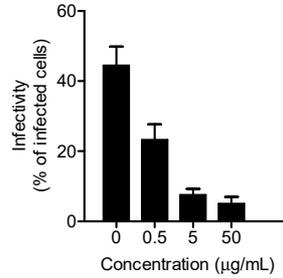
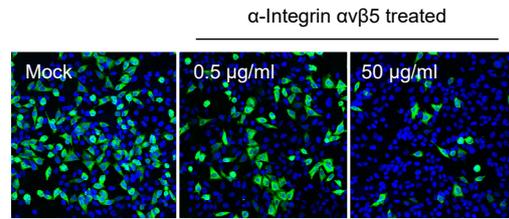


図6 抗 $\alpha\beta 5$ インテグリン抗体によるRGD-MRV (RGD-EF)の感染阻害

ことでより高い感染性の向上効果を得る目的で、AB, EF, GH ループに加え、C 末端領域にも RGD 配列を挿入した 3 種の RGD-MRV 株 (RGD-AB-Cterm, RGD-CD-Cterm, RGD-GH-Cterm) を作製し、JAM-A ノックアウト癌細胞 (DLD1 および HCT15) に対する感染性を調べた。RGD-AB-Cterm 株に関しては、RGD-AB および RGD-Cterm 株より若干腫瘍溶解活性が向上したものの、RGD-EF-Cterm および RGD-GH-Cterm 株では明確な相乗効果は認められなかった (図 7)。その為、次のマウスを用いた実験では RGD-EF を用いて行った。

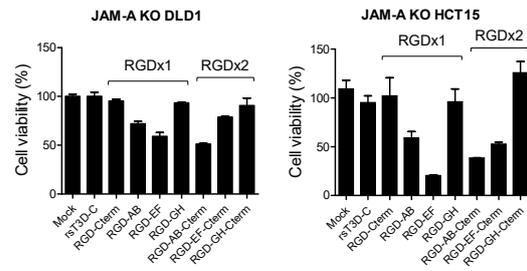


図7 複数箇所へRGDを挿入したRGD-MRVによる腫瘍溶解活性の検討。RGD配列を2か所に挿入したRGD-MRV株 (RGD-AB/EF/GH-Cterm) を作製し、JAM-A ノックアウト癌細胞に対する腫瘍溶解活性を調べたが、明確な相乗効果は認められなかった。

(3) 最後に癌細胞を皮下に移植した担癌マウスを用いて、in vivo における RGD-MRV の抗腫瘍活性を測定した。JAM-A ノックアウト DLD-1 細胞を皮下に移植した Balb/c スードマウスを用意し、腫瘍内に  $1.0 \times 10^7$  pfu の野生型 MRV もしくは RGD-MRV (RGD-EF) を 2-3 日間隔で投与した。腫瘍サイズを経時的に測定したところ、野生型 MRV (rsT3D-c) および RGD-EF 投与マウス群で腫瘍サイズの低下が認められたが、両群間に有意な差は認められなかった (図 8A)。また野生型 DLD1 細胞および JAM-A ノックアウト DLD1 細胞を移植したヌードマウス

に野生型 MRV もしくは RGD-EF を経静脈投与し、感染 3 日後の腫瘍内におけるウイルス量を測定したところ、いずれの細胞においても、野生型 MRV および RGD-EF 投与群間で差は認められなかった (図 8B)。

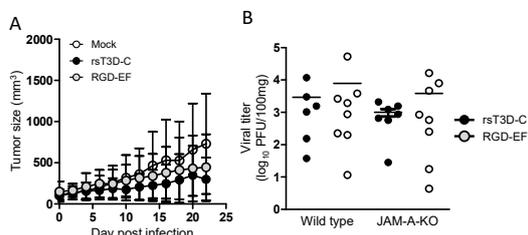


図8 (A) JAM-A KO DLD1細胞を皮下移植した担癌マウスに対するRGD-MRV (RGD-EF)の増殖能と腫瘍溶解活性。腫瘍サイズの経時変化を測定した。(B)野生型DLD1細胞およびJAM-AノックアウトDLD1細胞を移植したヌードマウスに野生型MRVもしくはRGD-EFを経静脈投与し、感染3日後の腫瘍内におけるウイルス量を測定した。

本研究成果により、RGD 配列を MRV T3D-c 株の sigmaC タンパク質に挿入することで、in vitro においては、野生型 MRV の感染受容体である JAM-A を欠損した MRV 感染抵抗性細胞に対して、顕著な感染性と腫瘍溶解活性の向上が認められることが明らかとなった。しかしながら、in vivo では野生型 MRV と RGD-MRV の間に、明確な腫瘍溶解活性の差は認められなかった。すなわち、in vitro において野生型 MRV に抵抗性であった癌細胞がマウス皮下に移植することで感受性を示した。癌細胞は 2 次元培養と 3 次元培養とで細胞の状態が変化し、抗癌剤に対する感受性が変化することが知られている。本研究結果は、癌細胞が in vitro (2次元) と in vivo (3次元) で MRV に対する感受性が異なることを示しており、今後の腫瘍溶解性 MRV の研究に大きく影響することと思われる。一方、MRV と同様に癌治療への応用研究がされているアデノウイルスにおいては、RGD 配列を付加した組換えウイルスが担癌マウスおよびヒト自然発生癌に対して顕著な効果を挙げていることから、RGD 付加 MRV においても引き続き検討を行いたいと考えている。

## 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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 金井祐太、川岸崇裕、松浦善治、小林 剛、ルシフェラーゼ発現哺乳類レオウイルスによる腫瘍の生体イメージング、第 64 回日本ウイルス学会学術集会 (札幌) 2016 年 10 月 25 日

- ② 金井祐太、川岸崇裕、松浦善治、小林 剛、レポーター遺伝子発現哺乳類オルソレオウイルスによる腫瘍の生体イメージング、第 159 回日本獣医学会学術集会 (藤沢) 2016 年 9 月 6 日

[その他]

ホームページ等

研究室ホームページ  
(<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/viral-replication/>)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金井 祐太 (Kanai, Yuta)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：80506501

### (2) 連携研究者

小林 剛 (Kobayashi, Takeshi)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：90324847

川岸 崇裕 (Kawagishi, Takahiro)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員 (常勤)

研究者番号：90800029

### (3) 研究協力者

松浦 善治 (Matsuura, Yoshiharu)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：50157252