

令和 2 年 11 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20991

研究課題名（和文）腫瘍溶解性麻疹ウイルスの抗腫瘍効果発揮に関わる分子基盤の解析

研究課題名（英文）Molecular basis underlying anti-tumor activity of an oncolytic measles virus

研究代表者

藤幸 知子 (Fujiyuki, Tomoko)

東京大学・生産技術研究所・特任准教授

研究者番号：50610630

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、癌治療用組換え麻疹ウイルスの抗腫瘍効果を評価するとともに、癌細胞側の本組換え麻疹ウイルスに対する応答機構を明らかにすることを目的とした。難治性癌の一つであるトリプルネガティブ乳癌を中心に、マウス異種移植モデルを用いて解析した結果、本組換え麻疹ウイルスの顕著な抗腫瘍効果が認められた。一方、ウイルス受容体を発現しながらも抗腫瘍効果が見られにくい細胞株が見出された。こうした細胞株でのウイルス感染後の応答性の違いを分子レベルで解析した。以上の結果から、本組換え麻疹療法の適用性および分子基盤の理解につながる知見を得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌は国内外問わず死亡者数の多い疾患であり、様々な治療法が開発されてきた。しかしながら、既存の治療法を適用できないケースも多々あるため、新たな治療法の開発が求められている。そこで近年提唱されているのが腫瘍溶解性ウイルス療法である。我々が開発中の腫瘍溶解性組換え麻疹ウイルスの難治性癌に対する抗腫瘍効果が明らかになったことは、本ウイルス療法への臨床応用への有望性を支持する。さらに、本ウイルス療法に対する細胞側の応答性に着目してより効果の発揮しやすい癌の特性を明らかとすることで、基礎ウイルス学的知見を得られるだけでなく、臨床応用時の奏効率を上げることにもつながると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to evaluate anti-tumor activity of an oncolytic recombinant measles virus, rMV-SLAMblind, and to analyze molecular mechanisms of cancer cells to respond to rMV-SLAMblind therapy. By using mouse xenograft models of triple negative breast cancer cell lines, obvious anti-tumor activities of rMV-SLAMblind were observed. On the other hand, we found resistant cell lines to rMV-SLAMblind, whereas those cells express the virus receptor molecule. These cell lines have different molecular mechanisms in response to the virus infection. These results demonstrate the basis of applicability and molecular mechanisms of rMV-SLAMblind therapy.

研究分野：ウイルス学

キーワード：腫瘍溶解性ウイルス 麻疹ウイルス がん 難治性乳癌 細胞死

1. 研究開始当初の背景

癌は国内外問わず死亡者数の多い疾患であり、様々な治療法が開発されてきた。しかしながら、耐性や副作用が問題となるために既存の治療法を適用できないケースも多々ある。また、所謂難治性癌については、再発率が高いことや、発見時にはすでに治療不適応なものもある。したがって、既存の治療法とは異なる方法の開発が求められている。これに対し、全く異なる作用機序を持つ療法として提唱されているのがウイルス療法である。

我々はこれまでに、組換え麻疹ウイルス(MV)を用いたウイルス療法の研究を行ってきた。MVは人に対して病原性を示すウイルスであるが、その病原性は免疫細胞に発現するMV受容体(SLAM)を介した免疫細胞への感染による体内伝播や免疫不全などによってもたらされる。SLAMとの結合に必要なアミノ酸を変異させた組換えウイルス(rMV-SLAMblind)は、免疫細胞には感染できず病原性を失う一方で、もう一つのMV受容体であるNectin-4/poliovirus receptor related-4を介して乳癌細胞へ感染して抗腫瘍効果を発揮する(Sugiyama, et al, 2013, *Gene Therapy*)。Nectin-4は成体内では発現がごく一部の細胞に局限しているが、癌細胞では発現増強することが判っており、新たな腫瘍マーカーとして期待されている分子である。したがって、Nectin-4をターゲットとするrMV-SLAMblindは腫瘍への特異性が高く、安全性も高い抗腫瘍物質として期待できる。そこで我々はrMV-SLAMblindの抗腫瘍効果が他の癌種にも発揮されるかを調べ、一部の肺癌細胞株や大腸癌細胞株にNectin-4が発現すること、および、rMV-SLAMblindの抗腫瘍効果が見られることを明らかにした(Fujiyuki, et al, 2015, *Oncotarget*; Amagai et al, 2016, *Sci. Rep.*)。しかしながら、rMV-SLAMblindが有効性を発揮しうる癌種や癌細胞の特性の特定には至っていなかった。

難治性癌の一つに、トリプルネガティブ乳癌(TN乳癌)がある。TN乳癌は、乳癌のマーカー分子であるエストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、HER2のいずれも発現しておらず、そのために乳癌治療において有効性の高いホルモン療法やHER2ターゲット療法は適用できない。TN乳癌の乳癌全体に占める割合は10-20%と決して高くないが、他の乳癌と比べると術後の早期再発が起こりやすく、転移後の生存期間は約1年程度と、他の乳癌と比べて短い。そこで、TN乳癌を中心に、難治性癌に対するrMV-SLAMblindの抗腫瘍効果を検討することにした。

一方、我々は先行研究において、Nectin-4が発現してrMV-SLAMblindが十分に感染しても、細胞死が起こりにくい細胞株があることを見出しつつあった。このことは、一部の癌細胞にはrMV-SLAMblindに対する抵抗性を生み出す分子機構が備わっていることを示唆している。こうした癌に対するウイルス療法の適合性を判断するため、またウイルス療法の効果増強を目指すため、このウイルス抵抗性に関わる分子基盤を明らかにする必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍溶解性組換え麻疹ウイルスrMV-SLAMblindの難治性癌に対する抗腫瘍効果を評価するとともに、rMV-SLAMblindに対する癌細胞側の応答機構を明らかにし、より抗腫瘍効果の高い組換え麻疹ウイルスの創出につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、大きく2つに分けて研究を進めた。

(1) 難治性癌に対するrMV-SLAMblindの抗腫瘍効果の検討

我々はこれまでにTN乳癌細胞株の一部がNectin-4を発現すること、また発現細胞がrMV-SLAMblindに感染することを見出していたが、rMV-SLAMblindのTN乳癌に対する治療効果が不明であった。そこで、TN乳癌細胞株のマウス異種移植モデルを利用してrMV-SLAMblindの抗腫瘍効果の有無を検討した。また、TN乳癌以外にも難治性癌に由来する各種癌細胞株におけるNectin-4発現、rMV-SLAMblindの感染性、および抗腫瘍効果について比較検討を行った。

(2) rMV-SLAMblind抵抗性癌細胞株における抗ウイルス応答機構の解明

既知のウイルス抵抗性メカニズムや細胞死、また新規メカニズムの関与について検討した。

4. 研究成果

(1) 難治性乳癌に対する組換え麻疹ウイルスの治療効果を検討するため、免疫不全マウスへヒト難治性乳癌細胞を皮下移植したモデルを3種の細胞株について作出し、組換え麻疹ウイルスを腫瘍内投与した。腫瘍体積を指標にその効果を評価した結果、いずれの細胞株に対しても非投与群に比べて腫瘍の増大が有意に抑制された。1種の細胞株については、ルシフェラーゼ発現組換え

麻疹ウイルスを異種移植モデルに血管内投与し、抗腫瘍効果および in vivo イメージングシステムにより体内分布とウイルス増殖を検討した結果、皮下に移植した腫瘍に局限してウイルスが分布し、経時的に増殖、また腫瘍増大の抑制が認められたことから、組換え麻疹ウイルスは全身投与でも腫瘍抑制効果を示すと判った。

rMV-SLAMblind の抗腫瘍効果について、さらに詳細な解析を行った。具体的には以下の点を明らかにした。 Nectin-4 の発現量と rMV-SLAMblind の殺細胞効果の相関関係を検討するため、各癌細胞株における細胞表面上の Nectin-4 の発現レベルとウイルス感染後の細胞生存率との相関性を定量的に解析した結果、Nectin-4 の発現量が高いほど殺細胞効果が高くなる正の相関があることを示した。 異種移植モデルを利用して、rMV-SLAMblind の腫瘍内投与量と抗腫瘍効果との関連性を検討した結果、抗腫瘍効果の rMV-SLAMblind 投与量依存性が示された。以上の結果は、Nectin-4 の重要性を裏付けたとともに、治療効果発揮に必要なウイルス量を予測する上で重要な知見となった。

(2) 難治性癌に由来する複数の細胞株について、組換え麻疹ウイルスの抗腫瘍効果が明らかとなったが、その中にウイルス受容体を発現しながらも抗腫瘍効果が見られにくい株を新たに見出した。組換え麻疹ウイルスを感染させて増殖曲線を比較した結果、組換え麻疹ウイルス療法抵抗性の細胞株のウイルス増殖能は他の細胞株に匹敵していたことから、これらの細胞株ではウイルス増殖後の細胞死が起こりにくい機序が備わっていると考えられる。

MVに対する抵抗性にはインターフェロンカスケードが重要であり、MVはインターフェロンカスケードを抑制するためのアクセサリタンパク質を持つことが知られていることから、ウイルス感染後のインターフェロン応答をrMV-SLAMblind抵抗性癌細胞株と感受性癌細胞株で比較した。いくつかの細胞株で比較した結果、両者において応答性が異なる傾向が見られた。したがって、ウイルス感染・増殖後のインターフェロン応答の違いがrMV-SLAMblind療法の効果に影響する可能性が考えられる。

さらに、rMV-SLAMblindに対する抵抗性に関わる分子基盤をさらに解析するため、ウイルス感受性細胞株と抵抗性癌細胞株にrMV-SLAMblindを感染させ、遺伝子発現変動パターンを比較した。その結果、両者で異なる遺伝子群の候補を見出し、本ウイルス療法による効果との関連性が高い要因を検討するための基礎的な知見を得た。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Fujiyuki T, Amagai Y, Shoji K, Kuraishi T, Sugai A, Awano M, Sato H, Hattori S, Yoneda M, Kai C. (2020) Recombinant SLAM-blind measles virus is a promising candidate for nectin-4-positive triple negative breast cancer therapy. *Molecular Therapy Oncolytics*, 19, 127-135.
2. Awano M, Fujiyuki T, Shoji K, Amagai Y, Murakami Y, Furukawa Y, Sato H, Yoneda M, Kai C. (2016) Measles virus selectively blind to SLAM has oncolytic efficacy against nectin-4-expressing pancreatic cancer cells. *Cancer Science*, 107, 1647-52.

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Kai C, Shoji K, Kwon HJ, Sugai A, Yanagihara K, Yamaguchi H, Sato H, Fujiyuki T, Yoneda M. A recombinant SLAM-blind measles virus is a promising candidate for scirrhous gastric cancer treatment. 11th International Oncolytic Virus Conference 2018, 9-12 April, 2018, Oxford, England.
2. Yoneda M, Fujiyuki T, Sato H, Daigo Y, Kai C. A recombinant SLAMblind measles virus is applicable for breast cancer treatment. 11th International Oncolytic Virus Conference 2018, 9-12 April, 2018, Oxford, England.
3. Kai C, Shoji K, Kwon HJ, Sugai A, Yanagihara K, Yamaguchi H, Sato H, Fujiyuki T, Yoneda M. A recombinant measles virus blind to SLAM is a promising candidate for scirrhous gastric cancer therapy. XIX International meeting on Negative strand viruses, 17-22 June, 2018, Verona, Italy.
4. Fujiyuki T, Amagai Y, Shoji K, Sugai A, Awano M, Sato H, Yoneda M, Kai C. Oncolytic

recombinant measles is a candidate therapeutic agent for refractory breast cancer. XIX International meeting on Negative strand viruses, 17-22 June, 2018, Verona, Italy.

5. Kai C, Shoji K, Kwon HJ, Sugai A, Yanagihara K, Yamaguchi H, Nakanishi T, Sato H, Fujiyuki T, Yoneda M. Anti-tumor activity of a recombinant oncolytic measles virus, rMV-SLAMblind, against scirrhous gastric cancer cells. 第66回日本ウイルス学会、2018年10月28-30日、京都。

6. Fujiyuki T, Amagai Y, Shoji K, Sugai A, Awano M, Sato H, Yoneda M, Kai C. An oncolytic recombinant measles virus is a candidate of a novel therapeutic agent for triple negative breast cancer. (XXVth European Society of Gene & Cell Therapy, Oct 17-21, 2017, Berlin, Germany.

7. Kai C, Fujiyuki T, Shoji K, Sato H, Yoneda M. Development of oncolytic measles virus, rMV-SLAMblind. XXVth European Society of Gene & Cell Therapy, Oct 17-21, 2017, Berlin, Germany.

8. Fujiyuki T, Shoji K, Sugai A, Yamaguchi H, Yanagihara K, Sato H, Yoneda M, Kai C. 組換え麻疹ウイルスのスキルス胃癌細胞株に対する抗腫瘍効果。第76回日本癌学会学術集会。2017年9月30日、横浜。

9. 庄司紘一郎、雨貝陽介、藤幸知子、米田美佐子、甲斐知恵子。正常免疫マウス腫瘍モデルを用いた組換え麻疹ウイルスの抗腫瘍効果に対する抗体の影響。第76回日本癌学会学術集会。2017年9月30日、横浜。

10. 庄司紘一郎、藤幸知子、雨貝陽介、佐藤宏樹、米田美佐子、甲斐知恵子。正常免疫腫瘍移植モデルを用いた組換え麻疹ウイルスの治療効果および免疫の影響。第160回日本獣医学会学術集会、2017年9月13-15日、鹿児島大学。

11. Shoji K., Fujiyuki T., Amagai Y., Sato H., Yoneda M. and Kai C. Immunocompetent animal model to examine influence of immunity on oncolytic virotherapy with a recombinant measles virus. International Veterinary Immunology Symposium, 16-19 Aug, Gold Coast, Australia. 2016.

12. 藤幸知子、雨貝陽介、庄司紘一郎、菅井亮宏、粟野睦美、佐藤宏樹、米田美佐子、甲斐知恵子。腫瘍溶解性組換え麻疹ウイルスの難治性乳癌細胞に対する抗腫瘍効果。第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30日-12月2日、横浜。

13. Fujiyuki T., Amagai Y., Shoji K., Kuraishi T., Sugai A., Awano M., Sato H., Hattori S., Yoneda M. and Kai C. Recombinant SLAM-blind measles virus is a promising candidate for triple negative breast cancer therapy. 第64回日本ウイルス学会。2016年10月23-25日、札幌。

14. Awano M., Fujiyuki T., Shoji K., Yoneda M. and Kai C. Antitumor effect of oncolytic recombinant measles virus against side population of cancer cell lines. 癌幹細胞様サイドポピュレーションに対する腫瘍溶解性組換え麻疹ウイルスの抗腫瘍効果解析。第75回日本癌学会学術集会 2016年10月6-8日、横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：甲斐 知恵子
ローマ字氏名：KAI, Chieko

研究協力者氏名：米田 美佐子
ローマ字氏名：YONEDA, Misako

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。