

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10970

研究課題名(和文) microRNAエンコーディング腫瘍溶解性ウイルスによる多段階的悪性腫瘍治療戦略

研究課題名(英文) Multimodal therapy by microRNA-encoding oncolytic virus

研究代表者

久保 忠彦 (Kubo, Tadahiko)

広島大学・医系科学研究科(医)・准教授

研究者番号：70397959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：組換えウイルスVSV-miRNA29a, VSV-miRNA34a, VSV-miRNA143を作成し、骨肉腫細胞に対する抗腫瘍効果がVSVより増強するか検討した。骨肉腫細胞及びMSC中のmiRNA29a, 34a, 143発現量をRT-PCRにて測定したところ、MSCと比較して骨肉腫細胞中の各種miRNA発現量は有意に低下していた。in vitroにて各種組み換えウイルスを骨肉腫細胞に感染させるとmiRNA発現量は増加し、さらにVSV-miRNA143についてはVSVと比較し抗腫瘍効果の増強を認めた。本研究より新たに開発したVSV-miRNAは骨肉腫治療に有効であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗癌剤を用いた悪性腫瘍全身治療では、抵抗性や重篤な副作用など課題も多く、第三の治療法が切望されている。これまで腫瘍溶解性ウイルスである水泡性口内炎ウイルス(VSV)を骨肉腫治療に用いる研究を行ってきたが遠隔転移の完全制御と長期生存は実現できていなかった。VSVとmiRNAを組み合わせることで抗腫瘍効果を増強させた本研究結果は、悪性骨・軟部腫瘍治療に革新をもたらすのみにとどまらず、多くの癌治療に広く応用可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recombinant VSV expressing miRNA29a or miRNA34a or miRNA143 were generated using the established method of reverse genetics. It was examined whether the oncolytic effect on osteosarcoma cells is stronger than that of VSV. By evaluating the expression of miRNA29a, 34a, 143 in osteosarcoma cells and MSCs by RT-PCR, the expression of each miRNAs in osteosarcoma cells were significantly lower than those in MSCs. When osteosarcoma cells were infected with each recombinant viruses in vitro, miRNA expression was increased, and VSV-miRNA143 was found to have an enhanced oncolytic effect as compared with VSV. This study suggests that the newly developed VSV-miRNA is effective for the treatment of osteosarcoma.

研究分野：骨軟部腫瘍学

キーワード：骨肉腫 腫瘍溶解性ウイルス マイクロRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで四肢悪性腫瘍への薬剤、遺伝子、ウイルス・デリバリーシステムや磁気ターゲティングのための多くのデバイスを開発してきた。その一つである腫瘍細胞のみで選択的に複製、増殖する腫瘍特異的ウイルス Vesicular stomatitis virus (VSV)を用いた研究では、Isolated regional perfusion 法による四肢悪性腫瘍への理想的なウイルス・デリバリーシステムを開発した。一方、癌治療で応用が期待されている microRNA のなかには tumor-suppressor microRNA と呼ばれ、抗腫瘍効果を有する microRNA が存在する。そのなかで我々は MicroRNA29a (miRNA29a), MicroRNA34a(miRNA34a), MicroRNA143(miRNA143)に注目して VSV に遺伝子導入させ、より抗腫瘍効果の高いウイルスを作成することを計画した。

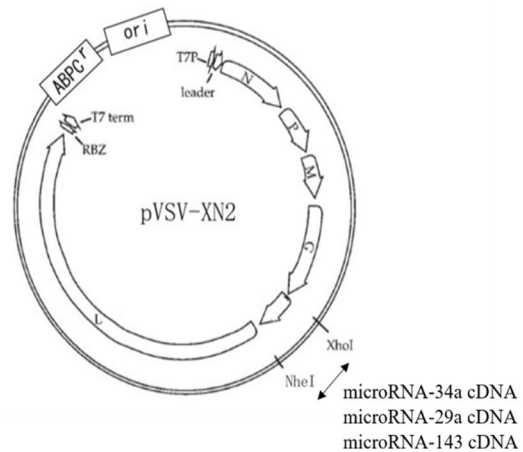
### 2. 研究の目的

tumor-suppressor miRNA を遺伝子導入した VSV (rVSV-miRNA29a, rVSV-miRNA34a, rVSV-miRNA143) の骨肉腫に対する抗腫瘍効果を評価すること。

### 3. 研究の方法

#### (1) 組換えウイルス rVSV-miRNA の作成

大腸菌を用いて VSV ゲノム DNA (pVSV-NX2、アクセッション・ナンバー:NC001560) に miRNA29a, miRNA34a, miRNA143 の cDNA (アクセッション・ナンバー:KF419293) を制限酵素部位 (NheI, XhoI) を介して挿入し、全長の DNA プラスミドを作成した。これをヘルパープラスミドである pIRES-L, pIRES-N, pIRES-P と共に T7 RNA polymerase を発現する Hamster 腎由来 BHK21 細胞に導入して、組換えウイルス



rVSV-miRNA29a, rVSV-miRNA34a, rVSV-miRNA143 を作成した。段階的に希釈したそれぞれの rVSV-miRNA を BHK 細胞に感染させ、TCID<sub>50</sub> 法で力価を測定した。

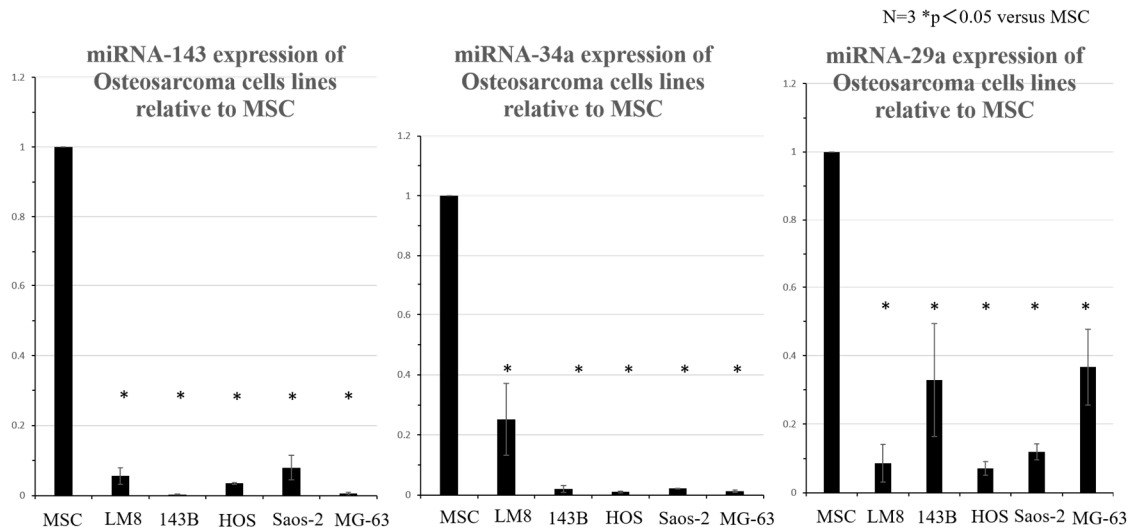
#### (2) 腫瘍細胞への投与

マウス骨肉腫細胞 LM8 に VSV 及び rVSV-miRNA を感染させ、miRNA 発現、細胞毒性、細胞遊走能を評価した。

### 4. 研究成果

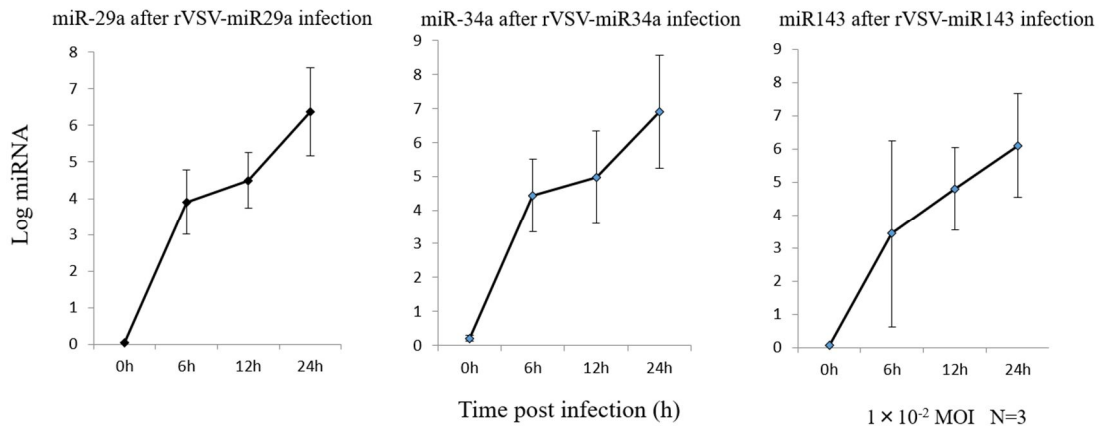
#### (1) 各種骨肉腫細胞中の tumor-suppressor miRNA 発現量の評価

正常細胞 MSC 及び各種骨肉腫細胞 (LM8, 143B, HOS, Saos-2, MG-63) 中の miRNA29a, miRNA34a, miRNA143 発現量を測定すると、それぞれの miRNA 発現量は骨肉腫細胞中で MSC と比較して低下していた。



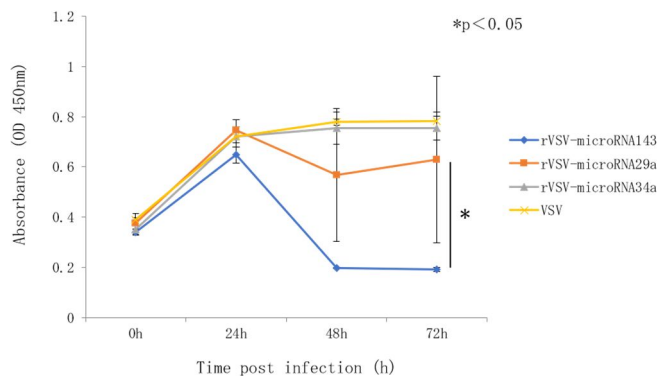
### (2) rVSV-miRNA 感染による miRNA 発現量増加の確認

rVSV-miRNA を感染させた LM8 細胞中の miRNA 発現量を RT-PCR により測定すると経時的に発現量は増加し、rVSV-miRNA 作成が成功していることを確認した。



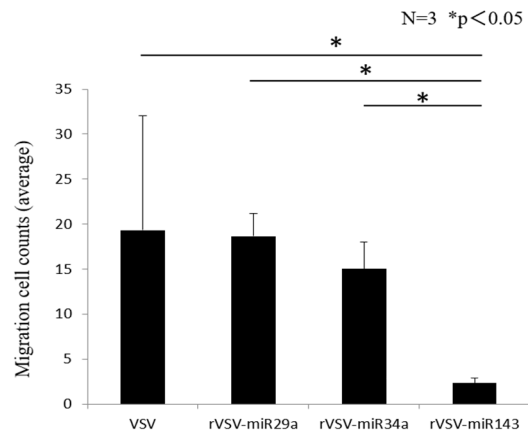
### (3) 細胞毒性の評価

rVSV-miRNA 及び VSV を LM8 に種々の用量で感染させ、WST-8 assay により細胞毒性を測定したところ、 $5 \times 10^{-4}$  MOI で rVSV-miRNA143 を感染させた際に他のウイルスを感染させた場合より有意に強い細胞毒性を示した。



#### (4) 遊走能の評価

rVSV-miRNA 及び VSV を LM8 に種々の用量で感染させ、migration assay により細胞遊走能を測定したところ、 $5 \times 10^{-4}$  MOI で rVSV-miRNA143 を感染させた際に他のウイルスを感染させた場合より有意に細胞遊走能の抑制を示した。



結論として、Tumor suppressor microRNA を組み込んだ VSV は一部の用量では抗腫瘍効果が増強するものの、その用量の幅はせまく、Tumor-suppressor microRNA 組み込みによる相乗効果は、大きくはなかったものの、ある程度の相乗効果を示した。本研究より新たに開発した VSV-miRNA は骨肉腫治療に有効であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakuda T, Kubo T, Johan MP, Furuta T, Sakaguchi T, Nakanishi M, Ochi M, Adachi N.	4. 巻 37
2. 論文標題 Novel Near-Infrared Fluorescence-Guided Surgery With Vesicular Stomatitis Virus for Complete Surgical Resection of Osteosarcomas in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Orthop Res.	6. 最初と最後の頁 1192-1201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.24277	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sakuda T, Kubo T, Johan MP, Furuta T, Sakaguchi T, Nakanishi M, Ochi M, Adachi N.
2. 発表標題 Novel Near-Infrared Fluorescence-Guided Surgery With Vesicular Stomatitis Virus for Complete Surgical Resection of Osteosarcomas in Mice.
3. 学会等名 19th Ground Round of Musculoskeletal Oncology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 作田智彦、久保忠彦、古田太輔、Muhammad Petrus Johan、越智光夫、安達伸生
2. 発表標題 Fluorescent tumor cell detection by tumor-specific virus VSV for precise osteosarcoma resection
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomohiko Sakuda, Tadahiko Kubo, Muhammad Petrus Johan, Taisuke Furuta, Mitsuo Ochi, Nobuo Adachi
2. 発表標題 Fluorescent tumor cell detection by tumor-specific virus VSV for precise osteosarcoma resection
3. 学会等名 ORS (Orthopaedic Research Society) 2018 Annual Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 作田智彦、久保忠彦、古田太輔、安達伸生
2. 発表標題 Development of oncolytic virus VSV encoding Tumor-suppressor microRNA
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 作田智彦、久保忠彦、古田太輔、安達伸生
2. 発表標題 Tumor-suppressor microRNA導入遺伝子組み換え腫瘍溶解性ウイルスの開発
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 作田智彦、久保忠彦、古田太輔、Muhammad Petrus Johan、安達伸生
2. 発表標題 Comprehensive approach of fluorescence-guided resection combined with systemic virotherapy by VSV
3. 学会等名 第52回日本整形外科骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	安達 伸生  (Adachi Nobuo)  (30294383)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授    (15401)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	古田 太輔  (Furuta Taisuke)  (30781645)	広島大学・病院（医）・助教    (15401)	
研究 分 担 者	坂口 剛正  (Sakaguchi Takemasa)  (70196070)	広島大学・医系科学研究科（医）・教授    (15401)	