

令和 5 年 3 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07291

研究課題名(和文) 癌治療用組換え麻疹ウイルスによる細胞死誘導機構の解析

研究課題名(英文) Cell death mechanisms induced by infection with 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：癌治療用に開発された遺伝子組換え麻疹ウイルスrMV-SLAMblindの感染によって癌細胞に引き起こされる細胞死の様式を調べた。rMV-SLAMblindの抗腫瘍効果が顕著に発揮される各種がん細胞株にウイルスを感染させ、各種細胞死様式のマーカー分子の挙動を解析した。その結果、これらの細胞株では、これまでに麻疹ウイルス感染において提唱されてきたアポトーシス以外の様式のマーカー分子の活性化が検出された。また、ウイルス感染後にはサイトカインの産生誘導が認められた細胞株も存在した。したがって、rMV-SLAMblindは癌細胞への感染後に免疫誘導性細胞死を起こすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Oncolytic virus (OV) は癌細胞に感染して増殖することで癌細胞を殺傷することから、次世代癌治療ツールとして開発が進められているが、OVが抗腫瘍効果を発揮する機序については不明な点が多い。我々が開発した癌治療用組換え麻疹ウイルス(rMV-SLAMblind)は、癌細胞に感染して直接殺傷するだけでなく、抗腫瘍免疫を誘導する可能性があり、ウイルス感染後の細胞死様式が治療時の免疫応答に影響すると推測される。本研究の成果は、rMV-SLAMblind療法による免疫誘導のメカニズムを解く端緒となり、ウイルス療法のさらなる改良のヒントも与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Oncolytic viruses (OV) is a rising tools for cancer therapy, because OV infects and replicates in cancer cells to kill. However, molecular and cellular mechanisms by which OV exerts anti-tumor effect remain to be clarified. An oncolytic recombinant measles virus (rMV-SLAMblind) which we have developed infects and kills cancer cells. To understand cell death mechanism induced by rMV-SLAMblind infection, modes of cell death were analyzed. Several cancer cell lines were infected with rMV-SLAMblind, and activation of molecular markers of cell death were tested. Whereas it was believed that measles virus infection causes apoptosis, these cells showed activation of non-apoptosis marker molecules. In addition, induction of cytokine production was detected after rMV-SLAMblind infection. These results suggest that rMV-SLAMblind infection to cancer cells induces immunogenic cell death, which may contribute to establish anti-tumor immunity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：麻疹ウイルス 癌治療 Nectin-4 細胞死

1. 研究開始当初の背景

がんは、長年にわたり様々な療法が開発されてきたにも関わらず、未だに国内外問わず死亡者数の多い疾患である。この状況に対し、次世代のがん治療法として腫瘍溶解性ウイルスを利用する方法 (= ウイルス療法) に期待が寄せられている。ウイルス療法は、腫瘍細胞へのウイルス感染によって細胞死を引き起こして腫瘍縮小を導く療法である。近年ではウイルス感染に伴う細胞死後に惹起される免疫応答による腫瘍免疫との相乗的な効果も期待されている。したがって、ウイルスによる細胞死誘導と免疫誘導の両面で強い効果が見られることがウイルス療法の成功に重要と考えられる。

我々が開発中のがん治療用組換え麻疹ウイルス rMV-SLAMblind は、腫瘍で発現亢進する膜タンパク質、Nectin-4 を受容体として利用して Nectin-4 陽性がん細胞に感染し、さまざまながん種に由来するがん細胞に対して殺細胞効果を発揮する (図1、図2、Sugiyama et al *Gene Therapy* 2013; Fujiyuki et al *Oncotarget* 2015; Amagai et al *Scientific Reports* 2016; Awano et al *Cancer Science* 2016; Fujiyuki et al *Molecular Therapy-Oncolytics* 2020)。Nectin-4 は複数のがん種でその発現亢進が報告されており、腫瘍マーカーおよび治療標的として期待されていることから、Nectin-4 をターゲットとする rMV-SLAMblind を用いる治療法は、次世代がん治療法として有望性が高い。しかしながら、rMV-SLAMblind が感染後がん細胞がどのような細胞死を起こすのかは不明である。

麻疹ウイルス感染時の細胞死については、従来、免疫誘導性の低いアポトーシスであると考えられてきたが、麻疹ウイルスワクチン株が肺がん細胞株に感染すると免疫誘導性の高いネクローシスが起きる例が報告された (Xia et al *Oncotarget* 2014)。細胞死後の免疫誘導の際には、カルレチキュリンや HSP70 の細胞表面への移行、ミトコンドリア ATP や核内 HMGB1 の細胞外への放出などの特徴的な事象が見られると報告されている。この様式の細胞死は、よく知られたアポトーシスやネクローシスとは別に「免疫誘導性細胞死 (Immunogenic cell death)」と呼ばれ、MV ワクチン株やヘルペスウイルスが特定の腫瘍細胞へ感染する際にも観察された (Takasu et al *Cancer Gene Therapy* 2016; Donnelly et al *Gene Therapy* 2013)。これらの知見から、麻疹ウイルスの感染が、がん細胞の種類によっては免疫誘導性の高い細胞死を引き起こし、腫瘍免疫の成立に関与する可能性が考えられる。

以上の背景から代表者は、rMV-SLAMblind の感染が免疫誘導性細胞死を誘導するか、免疫誘導性細胞死を誘発するならば機能する分子は何か、またその分子の働きによって実際に個体で強い抗腫瘍免疫応答が成立するか、という問いを持った。これらの問いの解明は、本ウイルス療法の有効性を示し、臨床応用に向けた理論的裏付けを与え、また治療に置ける補助因子の利用等のさらなる治療法を考える上で重要な情報を与える。

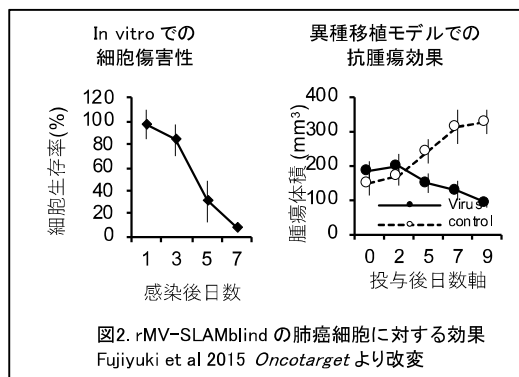
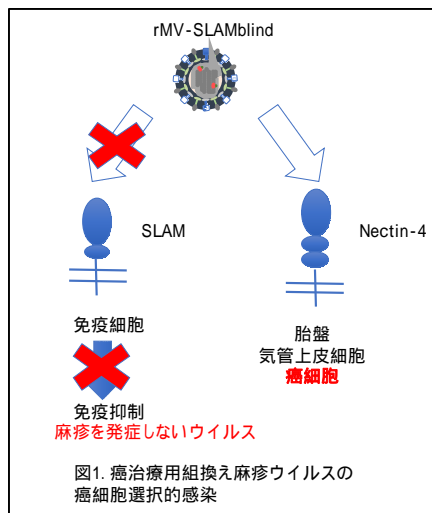
2. 研究の目的

本研究では、rMV-SLAMblind 感染後の細胞死の様式を解析し、がん細胞の種類によるその多様性、および、その後に誘導される免疫応答との関連性を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各種がん細胞株に対する rMV-SLAMblind 感染後の細胞死様式の決定

我々はこれまでに、rMV-SLAMblind が感染するがん細胞株を数多く同定してきた。それらは、乳がん、肺がん、大腸がん、膵臓がん、と、由来するがん種も様々である。これらのがん細胞株



に rMV-SLAMblind を感染させ、caspase ファミリー分子群の活性化を western blot により検討し、細胞死の様式を大まかに分類した。また、caspase 以外にも、免疫誘導性細胞死に特徴的なマーカーの挙動を解析し、ウイルス感染による変化を調べた。

(2) rMV-SLAMblind 投与に伴う免疫反応の評価

rMV-SLAMblind 感染後の免疫応答を調べるため、マウスにがん細胞を移植して作出した担がんマウスに rMV-SLAMblind を投与した。その後、腫瘍塊を摘出して細胞を単離し、血球細胞の表面抗原に対する抗体で染色後、フローサイトメトリーによって定量し、腫瘍にリクルートされた免疫細胞の数や活性化状態を解析した。また、腫瘍細胞が発現するサイトカインや、リクルートされた免疫細胞が発現するサイトカインについて、定量的 RT-PCR 法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 各種癌細胞株に対する rMV-SLAMblind 感染後の細胞死様式の決定

rMV-SLAMblind が顕著な抗腫瘍効果を示す大腸がん細胞株にウイルスを感染させ、細胞死のマーカー分子の挙動を western blot 法で解析した。その結果、特定の caspase ファミリー分子の活性化が検出された。従来、麻疹ウイルスの感染した細胞はアポトーシスを起こすと考えられてきたが、アポトーシス以外の細胞死が起きていると考えられた。そこで、アポトーシス以外の細胞死のマーカーとして知られている複数のタンパク質について解析を行った。その結果、これらのマーカーからもアポトーシスではない細胞死、特に免疫誘導性細胞死として知られている細胞死のマーカー分子の活性化が検出された。そこで、がん種の異なる細胞株でも共通に見られる現象かを調べるため、乳がん細胞株、および、肺がん細胞株を用いてこの細胞死のマーカー分子の挙動を解析した。その結果、これらの細胞株でも同じマーカー分子の活性化が検出された。

これらのがん細胞株が rMV-SLAMblind 感染後に引き起こす細胞死による免疫誘導性をさらに検証するため、細胞培養上清に放出される物質を定量し、ウイルス感染の有無による違いがあるかを調べた。その結果、大腸がん細胞株と乳がん細胞株について、特定のサイトカインの放出量がウイルス感染によって増加した。このサイトカインをコードする遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR 法によって測定した結果、サイトカインの放出が見られなかった肺がん細胞株については、他の細胞株よりも顕著に低いことが分かった。

以上の結果から、rMV-SLAMblind が感染したがん細胞においてアポトーシス以外の細胞死が起きていることが示唆された。また、サイトカインの放出を介して宿主の免疫応答を誘導する可能性が提示された。

(2) rMV-SLAMblind 投与に伴う免疫反応の評価

これまでに rMV-SLAMblind が抗腫瘍効果を示したマウスモデルを用いて、担がんマウスの腫瘍内に rMV-SLAMblind を投与した。腫瘍にリクルートされた免疫細胞の数や活性化状態について調べるため、フローサイトメトリーを用いて血球細胞の表面抗原を解析した結果、特定の細胞群の細胞数、および、活性化状態がともにウイルス投与群で上昇した。また、各種サイトカインの産生を調べるために mRNA 発現量を定量した結果、ウイルス投与群で顕著に発現上昇するサイトカインを見出した。

以上の結果から、rMV-SLAMblind 療法においては、rMV-SLAMblind に感染したがん細胞で特定のサイトカインが産生され、免疫細胞をリクルートすることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fujiyuki T, Amagai Y, Shoji K, Kuraishi T, Sugai A, Awano M, Sato H, Hattori S, Yoneda M, Kai C.	4. 巻 19
2. 論文標題 Recombinant SLAM-blind measles virus is a promising candidate for necctin-4-positive triple negative breast cancer therapy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy Oncolytics	6. 最初と最後の頁 127-135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omto.2020.09.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Iizuka K, Shoji K, Fujiyuki T, Moritoh K, Tamura K, Yoshida A, Sato H, Yoneda M, Asano K, Kai C.	4. 巻 133
2. 論文標題 Antitumor activity of an oncolytic measles virus against canine urinary bladder transitional cell carcinoma cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Research in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 313-317
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rvsc.2020.10.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sato H, Hoshi M, Ikeda F, Fujiyuki T, Yoneda M, Kai C	4. 巻 17
2. 論文標題 Downregulation of mitochondrial biogenesis by virus infection triggers antiviral responded by cyclic GMP-AMP synthase.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1009841
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1009841	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hai-Ying C, Tanaka Y, Hifumi T, Shoji K, Kayesh MEH, Hashem MA, Kitab B, Sanada T, Fujiyuki T, Yoneda M, Hatai H, Yabuki A, Miyoshi N, Kai C, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K.	4. 巻 15
2. 論文標題 Pathological and Genetic Aspects of Spontaneous Mammary Gland Tumor in Tupaia Belangeri (Tree Shrew).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0233232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0233232	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

[学会発表] 計13件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Takane K, Yamaguchi K, Ikenoue T, Fujiyuki T, Yoneda M, Kai C, Furukawa Y
2. 発表標題 PVRL4, a receptor for measles virus, is transcriptionally regulated by BACH1.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤幸知子、庄司紘一郎、佐藤宏樹、米田美佐子、甲斐知恵子
2. 発表標題 癌細胞における Raf /MAPK 経路の活性化が腫瘍溶解性組換え麻疹 ウイルスの増殖を促進する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村啓、藤幸知子、森藤可南子、飯塚恵悟、佐藤宏樹、浅野和之、米田美佐子、甲斐知恵子
2. 発表標題 犬の原発性肺腺癌細胞における腫瘍溶解性組換え麻疹ウイルスの抗腫瘍効果
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森藤可南子、庄司紘一郎、雨貝陽介、藤幸知子、佐藤宏樹、米田美佐子、甲斐知恵子
2. 発表標題 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療法における免疫反応の解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森藤可南子、庄司紘一郎、雨貝陽介、藤幸知子、佐藤宏樹、米田美佐子、甲斐知恵子
2. 発表標題 正常免疫腫瘍モデルを用いた腫瘍溶解性組換え麻疹ウイルス療法における免疫反応の評価
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shoji K, Fujiyuki T, Amagai Y, Yoneda M, Sato H, Kai C.
2. 発表標題 Antitumor effects of a recombinant SLAM-blind measles virus in immunocompetent murine model.
3. 学会等名 11th International Oncolytic Virus Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shoji K, Moritoh K, Amagai Y, Fujiyuki T, Sato H, Yoneda M, Kai C.
2. 発表標題 Influence of anti-measles virus immunity on recombinant measles virus therapy for cancer in immunocompetent tumor model.
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 甲斐知恵子、藤幸知子、森藤可南子、長村文孝、古川洋一、高橋俊二、米田美佐子
2. 発表標題 腫瘍溶解性麻疹ウイルスによる新たな治療法の開発
3. 学会等名 第80回日本癌学会シンポジウム「がん研究における女性研究者」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森藤可南子、藤幸知子、佐藤宏樹、米田美佐子、甲斐知恵子.
2. 発表標題 組換え麻疹ウイルス癌治療の遠隔腫瘍に対する効果の検討.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤幸知子、米田美佐子、森藤可南子、佐藤宏樹、甲斐知恵子.
2. 発表標題 腫瘍溶解性麻疹ウイルスの難治性乳がん細胞異種移植モデルにおける治療効果.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chi HY, Tanaka Y, Hifumi T, Shoji K, Kayesh MEH, Hashem MA, Bouchra K, Sanada T, Fujiyuki T, Yoneda M, Hatai H, Yabuki A, Miyoshi N, Kai C, Kohara M, Kohara K.
2. 発表標題 Pathological aspects of spontaneous mammary gland tumor in Tupaia belangeri (Tree shrew).
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高根希世子、山口貴世志、池上恒雄、藤幸知子、米田美佐子、甲斐知恵子、古川洋一
2. 発表標題 麻疹ウイルス受容体PVRL4はがん細胞においてBACH1により調節される.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 庄司紘一郎、藤幸知子、飯塚恵悟、堀切園裕、佐藤宏樹、浅野和之、米田美佐子、甲斐知恵子.
2. 発表標題 イヌ腫瘍に対する組換え麻疹ウイルス療法の適用可能性に関する検討.
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関