

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301
研究種目：若手研究（A）
研究期間：2009～2011
課題番号：21689039
研究課題名（和文） 悪性グリオーマに対するオンコリティック・バイオレスポンス解析とバイオイメージング
研究課題名（英文） Analysis of vaccinia virus induced oncolytic bioresponse and bioimaging in malignant glioma
研究代表者
荒川 芳輝（ARAKAWA YOSHIKI）
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：20378649

研究成果の概要（和文）：

ワクシニアウイルスを用いたオンコリティック・バイオ治療の確立を目指し、悪性グリオーマに対するオンコリティック・バイオレスポンスの解析、バイオイメージング解析システム開発を行った。開発した遺伝子発現制御遺伝子組み換えウイルスを用いて脳腫瘍制御に関する解析を進め、腫瘍内細胞シグナルを制御することでウイルスによる腫瘍細胞死誘導が増強されることを同定した。脳腫瘍モデルの解析結果から、ウイルスによる腫瘍制御にはオンコリティックな作用だけでなく、腫瘍免疫応答の誘導が腫瘍細胞排除に作用している可能性を示唆する知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

To develop the new treatment strategy, I have analyzed vaccinia virus induced oncolytic bioresponse and bioimaging in malignant glioma. We found that modifications of cell signaling enhanced the oncolytic effect in glioma cells. In vivo studies with rat glioma model, the mechanism of viral anti-tumor effect are immunological response as well as oncolytic effect.

	直接経費	間接経費	合計
21年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
22年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
23年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	17,100,000	5,130,000	22,230,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：悪性神経膠腫 ウイルス治療 ワクシニアウイルス バイオイメージング

1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマは、根治困難な疾患である。悪性グリオーマの根治困難な要因は浸潤性、腫瘍免疫寛容、腫瘍幹細胞にある。悪性グリオーマ根本的な治療には腫瘍細胞と腫瘍環境をターゲットとした治療システムの開発が必要である。オンコリティック・バイオレスポンスは、ウイルスのがん細胞殺傷（従来のウイルスがん治療の概念）、それに伴い惹起される抗腫瘍免疫（従来の腫瘍免疫の概念）である。オンコリティック・バイオレスポンスの治療応用は悪性グリオーマを克服できる可能性が示唆される。

2. 研究の目的

悪性グリオーマに対するワクシニアウイルスによるオンコリティック・バイオレスポンスを応用したオンコリティック・バイオ治療の確立を目指し、その基盤研究を目的とした。具体的には、

1. 腫瘍生物学を基盤とする腫瘍殺傷と抗腫瘍免疫を制御したワクシニアウイルスの開発
2. バイオイメージング解析の確立
3. 悪性グリオーマにおける開発ウイルスの生態の解析
4. ウイルス感染による生体反応の解明である。

3. 研究の方法

①腫瘍細胞殺傷と抗腫瘍免疫賦活作用を増強した遺伝子組み換えワクシニアウイルス開発では、遺伝子組み換え法を用いてウイルスの複製の障害ないウイルスを作成した。

②バイオイメージング解析技術の確立では、

蛍光顕微鏡ライブ・イメージングを新たにP2レベルで使用できる長時間蛍光顕微鏡ライブ・イメージングを開発・整備した。作製した遺伝子組み換えウイルス生態を解析した。

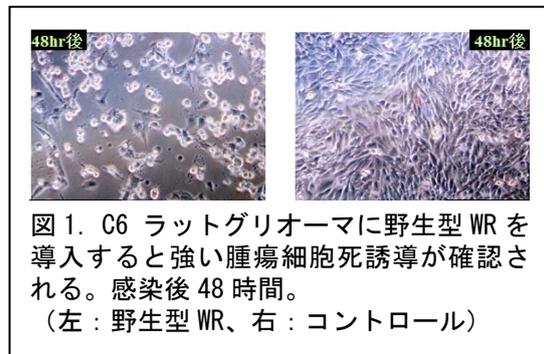
③新規遺伝子組み換えウイルス生態を解析では、長時間蛍光顕微鏡ライブ・イメージングを用いて、細胞内シグナル制御を薬剤等で行い、ウイルス感染細胞の生態を解析した。

④生体内で悪性グリオーマに対する抗腫瘍効果と脳内免疫機構に対する作用機序の解析では C6 グリオーマを用いたラット脳腫瘍モデルでワクシニアウイルス感染による生体反応を解析した。

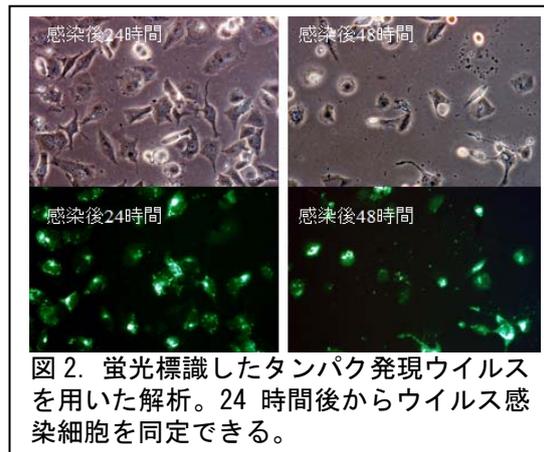
4. 研究成果

①腫瘍細胞殺傷と抗腫瘍免疫賦活作用を増強した遺伝子組み換えワクシニアウイルス開発では、生存シグナル抑制蛋白として Ras 抑制変異体、Ras 結合阻害蛋白、Rho 活性化変異体の導入によるウイルスによるアポトーシス誘導効果を解析し、有効性を確認した。英国で開発した F11L 欠損ウイルスに蛍光タンパク発現ウイルスを作成した。

②長時間蛍光顕微鏡ライブ・イメージングを用いてウイルス腫瘍抑制効果を解析した（図1）。グリオーマ細胞はウイルス感染後形態変化、増殖停止と至り、感染後 24 時間から 48 時間で細胞死導入が進むことが明らかとなった。



蛍光標識タンパクを発現するウイルスを作成し、ウイルスの生態解析を進めた（図2）。これらの解析により、ウイルスは早期に Ras シグナルの活性化により細胞死を抑制し、感染後期に Ras シグナルの抑制により細胞死を誘引することを明らかにした。



③Ras シグナルに着目し、シグナル阻害薬を用いて悪性グリオーマに有効となる分枝機序の解析を行った。その中で multiple receptor tyrosine kinases inhibitor である sunitinib が有用であることが明らかとな

った。また、F11L 欠損ワクシニアウイルスが野生型に比較し細胞障害を減弱しており、腫瘍免疫誘導の可能性が示唆された。

④ラット脳腫瘍モデルにおけるワクシニアウイルス投与で腫瘍抑制効果を確認した(図3)。

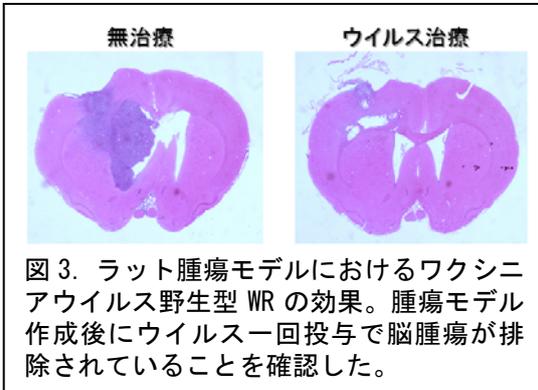


図3. ラット腫瘍モデルにおけるワクシニアウイルス野生型 WR の効果。腫瘍モデル作成後にウイルス一回投与で脳腫瘍が排除されていることを確認した。

さらに *in vitro* で確認された sunitinib の作用をラット脳腫瘍モデルで検討した。その結果、sunitinib 投与でウイルスの腫瘍抑制効果が増強された(図4)。さらに組織学的な解析から、腫瘍周囲免疫担当細胞の分布から、腫瘍免疫応答が腫瘍細胞排除に重要な役割を持つことが示唆された。

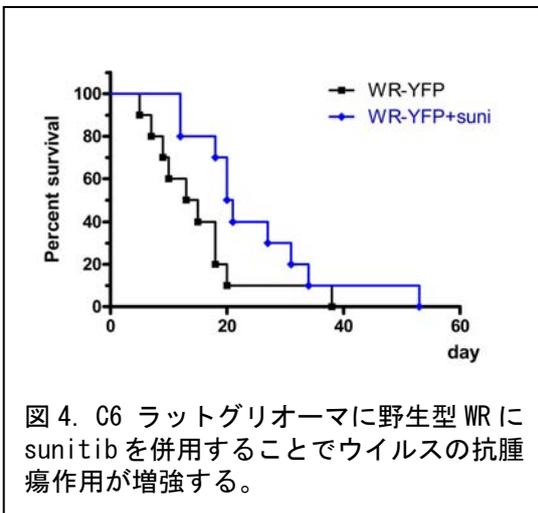


図4. C6 ラットグリオーマに野生型 WR に sunitinib を併用することでウイルスの抗腫瘍作用が増強する。

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)

[雑誌論文] (計3件)

1. Eishu Hirata, Hiroko Yukinaga, Yuji Kamioka, Yoshiki Arakawa, Susumu Miyamoto, Takaharu Okada, Erik Sahai, and Michiyuki Matsuda. *In vivo*

fluorescence resonance energy transfer imaging reveals differential activation of Rho-family GTPases in glioblastoma cell invasion. *Journal of Cell Science*, 2012. 査読あり doi: 10.1242/jcs.089995

2. João V. Cordeiro, Susana Guerra, Yoshiki Arakawa, Mark P. Dodding, Mariano Esteban, Michael Way. F11-mediated inhibition of RhoA signalling enhances the spread of vaccinia virus *in vitro* and *in vivo* in an intranasal mouse model of infection. *PLoS One* 4(12):e8506, 2009 査読あり doi: 10.1371/journal.pone.0008506
3. Eishu Hirata, Yoshiki Arakawa, Mitsuaki Shirahata, Makoto Yamaguchi, Yo Kishi, Takashi Okada, Jun A Takahashi, Michiyuki Matsuda, and Nobuo Hashimoto. Endogenous Tenascin-C enhances glioblastoma invasion with reactive change of the surrounding brain tissue. *Cancer Science*, 100(8):1451-9, 2009. 査読あり doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01189.x. *Cancer Sci*

[学会発表] (計10件)

1. 荒川芳輝、溝脇尚志、小倉健吾、北条雅人、高木康志、高橋淳、三國信啓、平岡真寛、宮本享 最新技術を駆使した Glioblastoma に対する集学的治療と機能温存・改善のための今後の展望 日本脳神経外科学会 第70回学術総会 2011/10/14 横浜
2. 村田大樹、荒川芳輝、山口真、平田英周、宮本享 sunitinib によるワクシニアウイルス療法の増強効果の解析 第29回日本脳腫瘍学会学術集会、2011/11/28 岐阜
3. 平田英周、幸長弘子、荒川芳輝、宮本享、松田道行 R h o - f a m i l y G T P a s e によるグリオブラストーマ浸潤制御 第28回日本脳腫瘍学会、2010/11/28 長野
4. 山口真、荒川芳輝、平田英周、山口真、鐘本学、白畑充章、荒川芳輝、宮本享 ワクシニアウイルス及び分子標的薬を併用した悪性グリオーマに対する新規治療法の開発 第28回日本脳腫瘍学会、

2010/11/28 長野

5. **荒川芳輝**、平田英周、宮本享、松田道行
二光子励起蛍光顕微鏡による
glioblastoma 浸潤機構の in vivo 解析
第 28 回日本脳腫瘍病理学会、2010/5/21
日 大阪
6. Eishu Hirata, Hiroko Yukinaga, Yuji
Kamioka, **Yoshiki Arakawa**, Susumu
Miyamoto, Michiyuki Matsuda. Two modes
of glioblastoma invasion as
visualized by two-photon excitation
microscopy. AACR/JCA Joint Conference
2010/2/5-9, Hawaii
7. 山口真、**荒川芳輝**、岡田崇志、鐘本学、
白畑充章、岸陽、宮本享 悪性グリオ
ーマに対するワクシニアウイルスを用い
た新規治療法開発 第 68 回日本脳神経
外科学会 2009/10/16 東京
8. 平田英周、**荒川芳輝**、松田道行
Analysis of glioblastoma invasion by
two-photon excitation fluorescence
microscopy and FRET microscopy 第 68
回日本癌学会学術総会 2009/10/1-3
神奈川
9. 平田英周、**荒川芳輝**、宮本享、松田道行
2 光子励起蛍光顕微鏡及び FRET
imaging を用いたグリオブラストーマ
浸潤機構の解析. 第 27 回日本脳腫瘍学
会、2009/11/9 大阪
10. 山口真、**荒川芳輝**、岡田崇志、鐘本学、
白畑充章、岸陽、宮本享 悪性グリオ
ーマに対するワクシニアウイルスを用い
た新規治療法開発 第 27 回日本脳腫瘍
学会、2009/11/8 大阪

[その他]

ホームページ等

<http://neurosurg.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 芳輝 (ARAKAWA YOSHIKI)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：20378649