

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25年5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22300339

 研究課題名（和文） 不活化ウイルス粒子による癌治療臨床研究を基に機能補充した多角的
癌遺伝子治療の開発

 研究課題名（英文） Development of multi-lateral cancer gene therapy by enhancing
anti-tumor activity of inactivated Sendai virus particle

研究代表者

金田 安史 (KANEDA YASUFUMI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10177537

研究成果の概要（和文）：我々は複製能を欠いた不活化 Sendai virus (HVJ envelope；HVJ-E) が様々な抗腫瘍作用を有することを見出している。これを用いた癌治療の臨床研究も開始された。そこでさらに抗腫瘍効果を増強するため、HVJ-E に封入する分子を検討したところ、抗腫瘍免疫を増強できる分子として IL-12、IL-2 の有効性が見出された。IL-12 遺伝子を封入する代わりに、IL-12 蛋白質を表面にもつ HVJ-E はさらに強力な癌治療効果を示した。また抗がん剤(ダカルバジン)の効果を高めるために Rad51siRNA の封入が効果的であった。

研究成果の概要（英文）：We have reported that UV-inactivated Sendai virus particles (hemagglutinating virus of Japan envelope；HVJ-E) have multiple anti-tumor activities. Clinical application of HVJ-E has been started to evaluate the safety and efficacy of the particle in cancer patients. To enhance the anti-tumor activities, we attempted to incorporate therapeutic molecules into HVJ-E. As a result, HVJ-E containing IL2 or IL-12 gene enhanced anti-tumor immunity. HVJ-E having IL-12 polypeptide on the surface was developed and was more effective for the treatment of melanoma than original HVJ-E alone. Rad51 siRNA incorporated into HVJ-E augmented the effect of cancer treatment when combined with anti-tumor reagent, dacarbazine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2012年度	3,000,000	900,000	3,900,000
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：HVJ、癌、抗腫瘍免疫、アポトーシス、遺伝子解析、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

癌は治療に抵抗性のさまざまな機能を備えて生体内での生存をはかり、再発・転移を繰り返して個体死を招く。癌治療のためには、治療からのエスケープを防ぎ、最終的には個体の免疫反応を高めて腫瘍細胞の根絶を図らねばならない。その実現はきわめて困難としても、方向性としては多種類の治療法の組み合わせによる複合的治療法が望ましく、また1つの治療法であっても多種類のターゲットを制御して、治療抵抗性の癌を多角的に攻撃する治療法を開発する必要がある。一方我々は複製能を欠いた不活化 Sendai virus (HVJ envelope ; HVJ-E) が様々な抗腫瘍免疫を誘導できること、正常細胞は傷害せず癌細胞に強い細胞死を誘導できること、を多くの腫瘍モデルを用いて証明し、そのメカニズムの解明を進めてきた。その成果を基に、メラノーマ患者への不活化 Sendai virus の連続投与による安全性と有効性評価の臨床研究を開始することになった。

2. 研究の目的

動物実験の成果と臨床研究で得られた情報を基にして不活化 Sendai virus 粒子の抗腫瘍効果を完全に解明し、さらなる治療効果増強のため、不活化 Sendai virus よりなるベクターに搭載すべき治療分子を検討し、様々な腫瘍モデルを用いてその効果を検証して、転移や再発を抑制できる新たな遺伝子治療法の開発を行う。

3. 研究の方法

不活化 Sendai virus より作成した HVJ envelope vector の抗腫瘍効果について、動物実験のデータおよび臨床研究のデータをもとにその分子機構をさらに解明して、癌治療効果増強の観点から補充すべき機能を明らかにする。抗腫瘍免疫活性化については、T細胞の増殖促進およびメモリーT細胞の維持機能の補充が必要であり、これらに最適の遺伝子を腫瘍モデルでの検証系で選出する。一方、腫瘍細胞死の誘導については、HVJ envelope vector が腫瘍細胞特異的な細胞死を誘導できる活性があるので、まずそのメカニズムを解明する。そのデータをもとに、HVJ envelope vector 本来の細胞死誘導経路とは異なる経路で癌細胞死を誘導できる遺伝子

を機能補充分子として選択する。以上の治療分子候補の評価と絞り込みを様々な腫瘍モデル動物を用いて行い、有効性と毒性の観点から評価して、転移や再発を抑制できる最適な遺伝子治療法を確立する。

4. 研究成果

(1) HVJ-E の抗腫瘍活性の1つは多彩な抗腫瘍免疫の活性化であり、それは樹状細胞の成熟化と癌抗原提示によるCTLの惹起、NK細胞の活性化、および制御性T細胞(RegT)の癌組織での抑制である。その中心的な作用をするサイトカインはType I interferon (IFN), CXCL10, IL-6であることが分かった。しかしCTLの活性化作用は活性化NK細胞から分泌されるIFN- γ によっており間接的である。そこでHVJ-Eに種々のサイトカイン遺伝子(GM-CSF, IFN- β , IL-2, IL-12)を封入し、さらに抗腫瘍効果を高めるための治療実験をマウス悪性グリオーマの皮内モデルで行った。IL-2, IL-12の遺伝子を封入したHVJ-Eを腫瘍内に3回投与した群では、腫瘍増殖がほぼ完全に抑制されたが、GM-CSF, IFN- β 遺伝子封入群はHVJ-E単独群と比べて有意な腫瘍増殖抑制を示さなかった。IL-2, IL-12遺伝子封入群では腫瘍の完全消失率はそれぞれ70%, 30%であった。そこで以降は、IL-2遺伝子封入HVJ-Eを用いたマウスグリオーマ治療実験を行った。グリオーマの脳内接種モデルを作成し、腫瘍形成がみられた時点で1回投与を行った。比較としてIL-2封入レトロウイルスベクターを用いた。IL-2遺伝子封入HVJ-Eの方が有意なマウス生存率の延長を認めた。腫瘍組織での免疫細胞浸潤を調べたところ、HVJ-E群ではレトロウイルスベクター群に比較してCD8⁺リンパ球の著明な浸潤を認め、これはRT-PCRでも確認された。IL-2遺伝子はRegTの増殖も促すことが免疫遺伝子治療において問題視されてきたが、HVJ-Eに封入して用いると、レトロウイルスベクター投与群のようなRegTの浸潤増強を認めなかった。次に臨床に近いモデルとして脳内腫瘍を形成後、外科的に切除し残存腫瘍にIL-2遺伝子封入HVJ-Eを投与すると60%のマウスが寛解した。

(2) メラノーマは既存の抗癌剤や放射線療法が奏功しないケースが多い。そこで抗癌剤や放射線療法で誘発される DNA 傷害の修復を癌細胞において助長し、癌細胞死を増強する治療法の開発を行った。メラノーマ治療に用いられる抗癌剤ダカルバジン (DTIC) を癌細胞に投与すると DNA 傷害が起こるが、それを修復する経路のうち相同組み換え修復が活性化し、それに関わる Rad51 の発現増強が起こった。そこで HVJ-E に Rad51 siRNA を封入し、DTIC と併用投与するとマウスメラノーマ細胞のコロニー形成能が単独投与よりも有意に抑制された。そこでマウスメラノーマの腫瘍モデルを作成し、臨床用量相当の DTIC は腹腔内投与 (5 回)、siRNA 封入 HVJ-E は腫瘍内投与 (3 回) を行った。それぞれの単独群や scramble siRNA 封入 HVJ-E と DTIC 併用群と比較して、Rad51 siRNA 封入 HVJ-E と DTIC 併用群により、有意な腫瘍抑制が得られた。このマウスにおける抗腫瘍免疫の活性化を調べると、HVJ-E により CD4, CD8 リンパ球の腫瘍内集積が著明に誘発されており、抗癌剤投与下においても抗腫瘍免疫の活性化が示唆された。

(3) Interferon-beta, GM-CSF, IL-2 などのサイトカイン遺伝子の中で、IL-12 遺伝子封入 HVJ-E がマウスメラノーマ腫瘍モデルでもっとも顕著な腫瘍抑制効果を示した。これをもとに、IL-12 遺伝子ではなく、IL-12 蛋白質をエンベロープ表面に持つ HVJ-E を作成し、全身投与を可能にするため、赤血球凝集活性をもつ HN 蛋白質を欠損させた高機能化 HVJ-E の作製に成功した。この IL-12 結合 HVJ-E は interferon-gamma を脾臓細胞や樹状細胞から産生させることができた。HVJ-E 単独では interferon-gamma の産生が見られない。この高機能化 HVJ-E をマウス腫瘍モデルに局所注入すると腫瘍消失マウスが 35% の確率で得られた (HVJ-E 単独では 5%)。メラノーマに対する CTL の活性化も増強された。この抗腫瘍免疫の活性化には、CD4 は不要であり、CD8 と NK 細胞が関与していることが阻害抗体を用いた実験から明らかになった。この高機能化 HVJ-E をマウス尾静脈から注射すると肺に集積することが分かった。そこでメラノーマ細胞を尾静脈から導入して肺に播種させた転移モデルを作成し、5 日後に高機能化 HVJ-E, HVJ-E 単独、IL-12 単独を 3 回投与したところ、高機能化

HVJ-E により有意差をもって転移巣の抑制が引き起こされた。高機能化 HVJ-E を投与した肺組織では interferon-gamma と NKG2D の発現が有意に亢進し、メラノーマに対する CTL の誘導が増強された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 8 件)

① Saga, K., Tamai, K., Yamasaki, T., and Kaneda, Y. Systemic administration of a novel immune-stimulatory pseudovirion suppresses lung metastatic melanoma by regionally enhancing IFN- γ production. *Clinical Cancer Research.*, 1;19(3):668-679, 2013. (査読有)

② Kiyohara, E., Tamai, K., Katayama, I., Kaneda, Y. The combination of chemotherapy with HVJ-E containing Rad51 siRNA elicited diverse anti-tumor effects and synergistically suppressed melanoma. *Gene Therapy*, 19, 731-41, 2012. (査読有)

③ Matsuda, M., Nimura, K., Shimbo, T., Hamasaki, T., Yamamoto, T., Matsumura, A. and Kaneda, Y. Immunogene therapy using immunomodulating HVJ-E vector augments anti-tumor effects in murine malignant glioma. *J. Neuro-Oncology*, 103, 19-31, 2011. (査読有)

④ Kaneda, Y. Update on non-viral delivery methods for cancer therapy: possibilities of a drug delivery system with anticancer activities beyond delivery as a new therapeutic tool. *Expert Opinion on Drug Delivery* 7, 773-780, 2010. (査読有)

〔学会発表〕 (計 5 件)

① 金田安史 新規抗がん剤としての不活化ウイルス粒子のポテンシャル、日本脳神経学会 2012 年 10 月 8 日 大阪国際会議場

② 金田安史 HVJ envelope vector の抗腫瘍効果の解明と高機能型ベクターの開発 日本生化学会大会 2011 年 9 月 24 日 京都国際会議場

③ 金田安史 癌の分子治療法の現状と将来展望 日本中性子捕捉療法学会 2010 年 8 月 5 日 学習院大学

〔図書〕(計1件)

- ① 金田安史 丸善出版 遺伝子と医療、
2013年、総ページ数 230

〔その他〕

ホ ー ム ペ ー ジ :
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gts/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 安史 (KANEDA YASUFUMI)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10177537

(2) 研究分担者

種村 篤 (TANEMURA ATSUSHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50457016