

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：15101

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2011

課題番号：22680065

研究課題名（和文）

癌におけるマイクロRNAの特性を利用した癌特異的ウイルス療法開発の新戦略

研究課題名（英文）

MicroRNA Targeting of Oncolytic Viruses for cancer therapy

研究代表者

中村 貴史（NAKAMURA TAKAFUMI）

鳥取大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70432911

研究成果の概要（和文）：

現在世界中において、生きたウイルスを利用して癌を治療する癌ウイルス療法に関する前臨床研究、及び臨床試験が積極的に行われている。これは、ウイルスが本来持っている癌細胞に感染後、癌組織内で増殖しながら死滅させるという性質を利用する方法である。本研究では、純国産ワクシニアウイルスワクチン株を基に、遺伝子組換え技術によって改良を加え、肺癌や膵臓癌などで発現が低下するマイクロRNA（let-7a）の特性を利用して正常細胞ではウイルスを増殖させず癌細胞のみで増殖させることに成功し、マウス担癌モデルにおいて強力な抗癌効果と高い安全性を実証した。

研究成果の概要（英文）：

Oncolytic viruses are promising therapeutic agents for cancer and are currently under clinical investigation. The virotherapy is novel strategy that viruses infect and replicate within tumor cells, directly lysing and killing them. We have reported that microRNA (miRNA) regulation enables tumor-specific viral replication by altering the expression of a targeted viral gene of an attenuated vaccinia virus vaccine strain LC16m8. We used miRNA-based gene regulation to suppress B5R expression through let-7a, a miRNA that is downregulated in many tumors. The miRNA-regulated vaccinia virus achieved efficient viral replication and oncolysis in cancer cells, but elimination of unwanted replication and associated toxicity in normal cells *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2011年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
年度			
総計	11,100,000	3,330,000	14,430,000

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：遺伝子治療、ウイルス療法

[テキストを入力]

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在世界中において、生きたウイルスを利用して癌を治療する腫瘍溶解性ウイルス療法に関する前臨床研究、及び臨床試験が積極的に行われている。これは、ウイルスが本来持っている癌細胞に感染後、癌組織内で増殖しながら死滅させるという性質（腫瘍溶解性）を利用する方法である。

(2) 純国産ワクシニアウイルスワクチン株 LC16m8 は、4 半世紀前の日本国内で痘瘡ワクチンとして使われ、高い安全性が証明されている。この株では、ウイルスの伝播・増殖に重要な役割を果たすウイルス膜蛋白である B5R 遺伝子にフレームシフト変異が見られ、この蛋白が発現、機能しない。これによって病原性が減弱されているが、本来の強力な腫瘍溶解性を発揮させるためには B5R の発現が必要であることが判明した。

2. 研究の目的

マイクロ RNA (miRNA) は、特定の遺伝子のメッセンジャーRNA の 3' 非翻訳領域に存在する標的配列に結合し、その遺伝子発現を負に制御する。その一つである let-7a は、正常細胞と比べ肺癌、膵臓癌やメラノーマなど様々な癌細胞で発現が低下しており、この異常が癌の発生や進展と深く関わっている。そこでこの let-7a の標的配列をウイルスの伝播・増殖に重要であるウイルス膜蛋白 B5R 遺伝子の 3' 非翻訳領域に挿入することにより、癌細胞では B5R を発現させる（＝ウイルスは増殖する）が、正常細胞では B5R を発現させない（＝ウイルスは増殖しない）ように LC16m8 を改良し、高い腫瘍溶解性による抗腫瘍効果と高い安全性を兼ね備えたウイルス療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) let-7a 低発現細胞であるヒト A549 肺癌細胞、又は BxPC-3 膵臓癌細胞を免疫不全ヌードマウスの右腹側の皮下に移植し、その腫瘍直径が約 6mm に到達した時、 10^7 pfu の let-7a 制御ウイルスを腫瘍内に投与した。その後、腫瘍の大きさと体重を一週間に三回測定し、各治療群における抗腫瘍効果と安全性を比較検討した。又、シフェリン投与によってマウス体内のウイルス感染細胞を非侵襲的にモニターし、let-7a 制御型ウイルスの癌特異的増殖能を検討した。

(2) 癌の多様性に対応するため、let-7a に換えて正常組織と比べ癌細胞で発現が低下している miR-15、-16、-143、又は-145 の標的配列を B5R 遺伝子の 3' UTR に挿入した組換えウイ

ルスを作成し、様々な種類の癌細胞株において各ウイルスの B5R 発現と増殖性を解析した。

(3) 癌免疫療法の併用により抗癌効果を増強させるため、マウスインターフェロン α (IFN- α)、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、又はインターロイキン 12 (IL-12) 遺伝子をウイルスゲノム HA 遺伝子領域に挿入した武装化 let-7a 制御増殖型ワクシニアウイルスを作成した。

4. 研究成果

(1) 皮下腫瘍マウスモデルにおいて、B5R 発現が let-7a によって制御される let-7a 制御増殖型ワクシニアウイルス (▲) は、let-7a の発現が高い正常組織内では B5R 発現が抑制され伝播増殖できないが、let-7a の発現が低い癌組織内では B5R 発現が抑制されないため伝播増殖し、癌のみを標的破壊し消失させた。対照的に、生理食塩水 (●) では治療効果がなく腫瘍は増大し、一方 B5R を恒常的に発現する無制御ウイルス (■) は癌を破壊したが、同時に正常組織へも伝播増殖し、その毒性でマウスは死亡した (図 1 上)。又、各ウイルスはホタルルシフェラーゼを発現しているため、ルシフェリンを投与によってマウス体内のウイルス分布を非侵襲的にモニターした結果、let-7a 制御増殖型ワクシニアウイルスの腫瘍特異的増殖が確認できた (図 1 下；矢印は腫瘍部位である)。

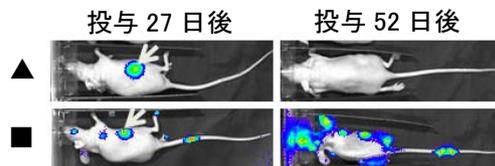
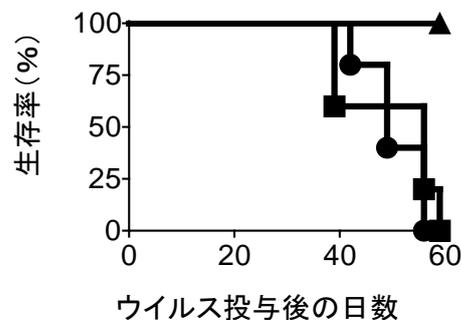


図1 皮下腫瘍マウスモデルにおける let-7a 制御ウイルスの抗腫瘍効果(上)と腫瘍特異的増殖(下)

以上の結果より、図2に示すように miRNA 制御ワクシニアウイルスは、癌細胞では B5R を発現するが、正常細胞では B5R を発現しないため、強力な腫瘍溶解性による抗腫瘍効果と高い安全性を兼ね備えたウイルスであることが実証された。

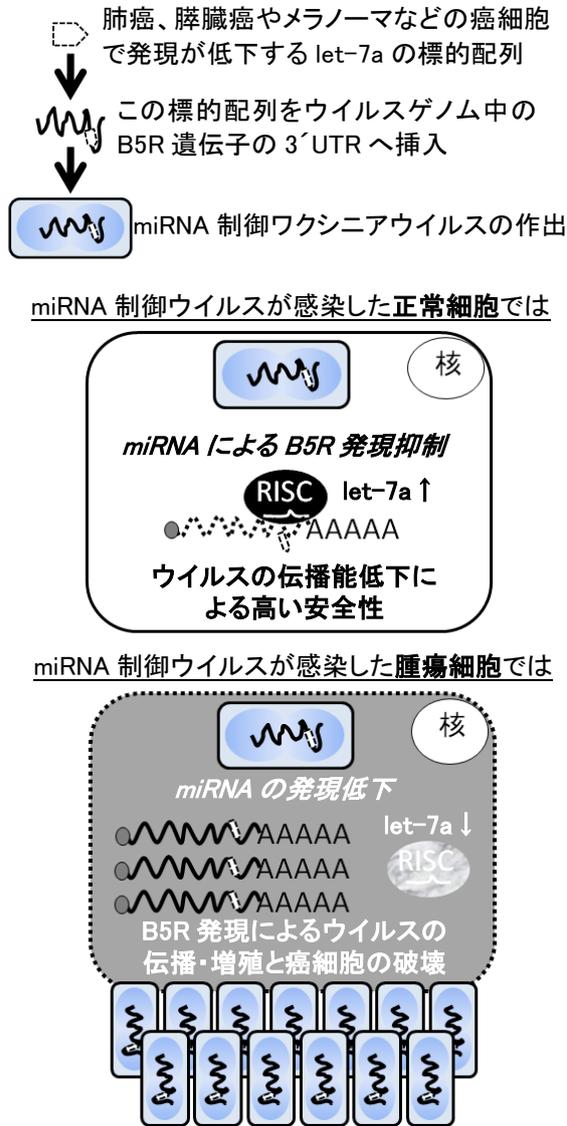


図2 癌におけるマイクロ RNA の特性を利用した癌特異的ウイルス療法開発の新戦略

(2) 様々な種類の癌細胞株に各制御ウイルスを感染させ解析した結果、各 miRNA (miR-15、-16、-143、又は-145) 制御増殖型ワクシニアウイルスの B5R 発現と伝播・増殖性は、let-7a 制御ウイルスと同様に、各細胞での miRNA 発現パターンに依存していることを確認した。

(3) 各武装化 let-7a 制御増殖型ワクシニアウイルスを感染させた RK13 細胞の培養上

清を用いて、ELISA により各外来遺伝子発現を測定した。その結果、低い MOI=0.01 で感染させても、3 日後の培養上清中にはウイルス増殖に伴って発現した IFN- α 、GM-CSF、又は IL-12 が 1 μ g/ml 以上の濃度で検出できた。

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 4 件)

- Hikichi M, Minoru Kidokoro M, Haraguchi T, Iba H, Shida H, Tahara H and Nakamura T. MicroRNA regulation of glycoprotein B5R in oncolytic vaccinia virus reduces viral pathogenicity without impairing its antitumor efficacy. *Molecular Therapy* 19, 1107-1115, 2011. doi: 10.1038/mt.2011.36.
- Takenobu H, Shimozato O, Nakamura T, Ochiai H, Yamaguchi Y, Ohira M, Nakagawara A and Kamijo T. CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification. *Oncogene* 30: 97-105, 2011. doi: 10.1038/onc.2010.383.
- Katoh M, Kazuki Y, Kazuki K, Kajitani N, Takiguchi M, Nakayama Y, Nakamura T and Oshimura M. Exploitation of the interaction of measles virus fusogenic envelope proteins with the surface receptor CD46 on human cells for microcell-mediated chromosome transfer. *BMC Biotechnology* 10: 37, 2010. doi: 10.1186/1472-6750-10-37.
- Meng X, Nakamura T, Okazaki T, Inoue H, Takahashi A, Miyamoto S, Sakaguchi G, Eto M, Naito S, Takeda M, Yanagi Y and Tani K. Enhanced Antitumor Effects of an Engineered Measles Virus Edmonston Strain Expressing the Wild-type N, P, L Genes on Human Renal Cell Carcinoma. *Molecular Therapy* 18: 544-551, 2010. doi: 10.1038/mt.2009.296.

[学会発表] (計 10 件)

- Takafumi Nakamura. MicroRNA Targeting of Oncolytic Viruses for cancer therapy: 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011/10/4, Oral presentation.
- Mina Hikichi, Minoru Kidokoro, Hisatoshi Shida, Hideaki Tahara and Takafumi Nakamura. MicroRNA Regulation of Glycoprotein B5R in

- Oncolytic Vaccinia Virus Reduces Viral Pathogenicity without Impairing its Antitumor Efficacy: The International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 札幌, 2011/9/12, Oral presentation.
3. **Takafumi Nakamura**, Mina Hikichi, Minoru Kidokoro, Hisatoshi Shida and Hideaki Tahara. Development of tumor-targeting vaccinia viruses as novel oncolytic agents: The 17th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 福岡, 2011/7/17, Oral presentation.
 4. Mina Hikichi, Minoru Kidokoro, Hisatoshi Shida, Hideaki Tahara and **Takafumi Nakamura**. Enhancing therapeutic index of oncolytic vaccinia virus through combining microRNA regulation and thymidine kinase deletion: The 14th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy, Seattle, USA, 2011/5/20, Oral presentation.
 5. **Takafumi Nakamura**. MicroRNA Regulation of Oncolytic Vaccinia Virus Reduces Viral Pathogenicity without Impairing its Antitumor Efficacy. The 6th International Conference on Oncolytic Viruses As Cancer Therapeutics, Las Vegas, USA, 2011/3/19, Invited Speaker.
 6. **Takafumi Nakamura**. 強い抗癌作用と高い安全性を兼ね備えたマイクロRNA制御増殖型ワクシニアウイルスによる癌ウイルス療法の開発、第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010/9/23、Oral presentation.
 7. **Takafumi Nakamura**. マイクロRNAによって制御されるウイルスの開発とその応用、第12回日本RNA学会年会、東京、2010/7/27、Oral presentation.
 8. **Takafumi Nakamura**. MicroRNA-regulated oncolytic vaccinia virus not only enhances the oncolytic activity but also reduces the viral pathogenicity. The 16th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 宇都宮, 2010/7/1, Oral presentation.
 9. **Takafumi Nakamura**. Highly Attenuated Vaccinia Virus as a Potential Oncolytic Agent for Cancer Virotherapy. The 13th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy, Washington D.C., USA, 2010/5/22, Poster presentation.
 10. **Takafumi Nakamura**. Highly attenuated

vaccinia virus with microRNA-regulated oncolysis for cancer virotherapy. The 13th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy, Washington D.C., USA, 2010/5/20, Oral presentation.

〔図書〕(計1件)

1. **中村貴史**、麻疹ウイルスによるがん治療法の開発、臨床とウイルス 38: 197-205, 2010.

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称: マイクロRNA制御組換えワクシニアウイルス及びその使用
 発明者: **中村貴史**、引地美奈、田原秀晃、志田 壽利、木所 稔
 権利者: 国立大学法人東京大学、国立大学法人北海道大学
 種類: 特許
 番号: PCT/JP2011/056693
 出願年月日: 2011年3月15日
 国内外の別: 国外

名称: マイクロRNA制御組換えワクシニアウイルス及びその使用
 発明者: **中村貴史**、引地美奈、田原秀晃、志田 壽利、木所 稔
 権利者: 国立大学法人東京大学、国立大学法人北海道大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2010-090662
 出願年月日: 2010年4月9日
 国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://ganshien.umin.jp/public/research/main/nakamura/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 貴史 (NAKAMURA TAKAFUMI)

鳥取大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 70432911

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし