

## 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 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700917

研究課題名（和文） 膵臓癌標的因子制御 Oncolytic HSV(HPC-HSV1)の開発

研究課題名（英文） Anticancer virotherapy using mutant oncolytic HSV1 vectors regulated multiple pancreatic cancer associated promoters.

研究代表者

福田 絵美 (EMI FUKUDA)

広島大学・自然科学研究支援開発センター・研究員

研究者番号：20403503

研究成果の概要（和文）：膵臓癌で過剰発現している複数の腫瘍特異的マーカー（hTERT, CEA, Survivin, ERBB2, DF3）の最少プロモーター領域を組み合わせ、各プロモーター全長での活性より20倍以上高い活性を持つ、多因子標的コンストラクトを6種得た。これらのコンストラクトをHSV-BACシステムにインテグレーションし、膵臓癌細胞株にin vitroで感染させてその殺腫瘍効果を検討したが、組換えウイルスが増殖能力に乏しく、治療に十分な水準の増殖力を持つ組換え体を得られなかった。

研究成果の概要（英文）：We combined the minimal promoter region of tumor specific markers (hTERT, CEA, Survivin, ERBB2 and DF3) overexpress in the pancreatic tumor and obtained six constructs those have over 20-fold-higher promoter activity than those of full length promoters. These promoter constructs were integrated to Flip-Flop HSV BAC system and generated the recombinant herpes simplex virus. These recombinant viruses were deficient in the potential of cytotoxic activity and were not sufficient level for medical treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：癌・ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルスベクターによる遺伝子治療として、腫瘍溶解性ウイルスベクターが有望である。これは、ウイルス増殖に必須なタンパク質をコー

ドした遺伝子の一部を自然欠損した変異株が、正常細胞では増殖しにくく腫瘍細胞において高い増殖能を有する性質を利用している。なかでもアデノウイルス(AdV)や単純ヘルペス

ウイルス1型(HSV-1)での病原性を弱めた弱毒化ウイルスは各施設で開発されており、外科的切除困難な難治性癌、とりわけGlioblastoma や Pancreatic Cancer の治療などに有望視されている。

ウイルス増殖に必須のタンパク質をコードする遺伝子上流に腫瘍特異的な標的マーカーのプロモーターを組込んだプロモータードライブの制限増殖型腫瘍溶解性ウイルスベクターは、高度に弱毒化され安全性が高い。しかし一因子プロモーター制御でのベクターでは腫瘍の種類により効果の有無が顕著で腫瘍の耐性を克服できないという問題がある。この点について、AdV ではプロモーターの多因子制御および癌治療遺伝子導入による耐性克服の可能性が示されている (Nagano S, *Gene Ther.*, 2005)。様々な性質の腫瘍にも効率的に感染し、殺腫瘍効果を発揮するウイルスベクターの開発に取り組むことは、癌治療において耐性克服の一助となる。

## 2. 研究の目的

薬剤耐性で再発率が高い難治性固形癌、特に腫瘍に対して、腫瘍内環境に応じて増殖を自律制御する腫瘍特異的ハイブリッドプロモーターカセット(HPC)を、弱毒化された腫瘍溶解性組換えヘルペスウイルスベクター(HSV1)に組込んだ新規遺伝子治療法を新規開発するためのトランスレーショナルな研究を行なう。

これまでのパイロット実験の結果から、組換えウイルス自体の増殖力不足が懸念された。よって、HPC を構築しプロモーター活性を増強すると同時に、Flip Flop HSV1-BAC システムのウイルス増殖に関わる遺伝子を複数挿入することにより改良し、より効率的に増殖するベクターアプリケーションへと改良する。

最近、HSV1 の潜伏感染中に発現する microRNA がウイルスの増殖に関与するタンパク質発現を阻害するということが明らかになってきた (*Nature* 454, 780-783)。本研究では潜伏感染中に発現する miRNA が結合する HSV1 ゲノム上の結合部位に点変異を

挿入し、miRNA の HSV1 ゲノムへの結合を阻害することによってウイルスの再活性化を行い、常にウイルスが生産的増殖を行うようデザインすることを検討している。この結果、ウイルス増殖をより効率化できると考える。

## 3. 研究の方法

(1)ウイルス治療に適した膵臓癌標的プロモーターをスクリーニング。

(2)膵臓癌標的的最小プロモーター領域をルシフェラーゼ発現ベクターにクローニングし、膵臓癌細胞株でのプロモーター活性を測定する。

(3)Cre/LoxP、FLP/FRT テクノロジーをベースとした Flip-Flop HSV-BAC システムで組換えウイルス作製を行う。得られたクローンを HindIII フィンガープリントと DNA シーケンスでチェックしたのち、Vero-E5-FLP 細胞にトランスフェクションして組換えウイルス HSV-HPC を産生する。

(4)Flip-Flop HSV-BAC システムを改善し組換えウイルス増殖の効率化を図る。

(5)HSV-HPC の増殖力と腫瘍細胞に対する細胞毒性を in vitro で定量的、定性的に解析する。

(6)HSV-HPC の殺腫瘍効果の評価を in vivo imaging のもとで行う。

## Flip-Flop HSV BAC システムを利用した組換え

### ウイルス産生

膵臓癌標的のハイブリッドプロモーター配列を HSV に挿入する過程は、Flip-Flop HSV-BAC システム (*BMC Biotechnology* 2006, 6:40) に則して行う。なお、既に Toshihiko Kuroda からは当該システム使用の許可を得ており、素材の供与も受けている。このシステムでは、ICP4 欠損変異株である HSV1 株 d120 全長をコードした pM24-BAC シャトルプラスミドと、d120 株の ICP4 をコードした pFLS- ICP4 の二種類のベクターを用いる。

### Cre/LoxP 相同組換えと BAC plasmid HindIII

#### digested fingerprint

Luciferase Assay の結果選んだ HPC fragment を、pFLS-ICP4 シャトルベクターに InFusion Cloning (BD Biosci.)を用いてサブクローニングする。次にpM24-BACとpFLS-HPCを相同組換えさせ、クロラムフェニコール/カナマイシン二重耐性クローンをラージスケールプレップで

精製したのち HindIII で消化しフィンガープリントを行い、切断パターンを確認する(右図。矢印は pFLS-HPC の切断パターン)。また、BAC vector の複数個所をシーケンシングして相同組換が起こっていることを確認する。

### FLP/FLP システムを利用した組換えウイルスの産生

pM24-BAC-HPC コンストラクトを ICP4 遺伝子を恒常的に発現しているウイルスパッケージング細胞である Vero-E5 細胞(大阪府成人病センターより)を当研究室でさらに FLP recombinase を産生するよう改変した Vero-E5-FLP から組換えウイルスを得、大量培養系にて複製し、シングルクローンを得る。

### 組換えウイルス力価の測定

Vero 細胞と Vero-E5 細胞を96 ウェルプレートで培養し、限界希釈法にてウイルス感染させ、ウイルスプラークが可視化されるまで培養する。細胞をアミドブラックまたは  $\beta$ -galactosidase で染色し、TCID50 にてウイルス力価を算出し、ウイルス液を調製する。

### ICP4 発現量の比較

HSV1-ICP4タンパク質発現量を調べるため感染した細胞を Lysate し、抽出したウイルスタンパク質を anti-HSV-ICP4 monoclonal antibody (US Biological, Swampscott, MA)を用いたウエスタンブロット法によって検出する。自然発生弱毒化ウイルス株と、作成した組換えウイルスの ICP4 タンパク質発現量を比較し、弱毒化株(d120)より組換えウイルスの方が高いウイルス増殖が見込まれるかを検討する。

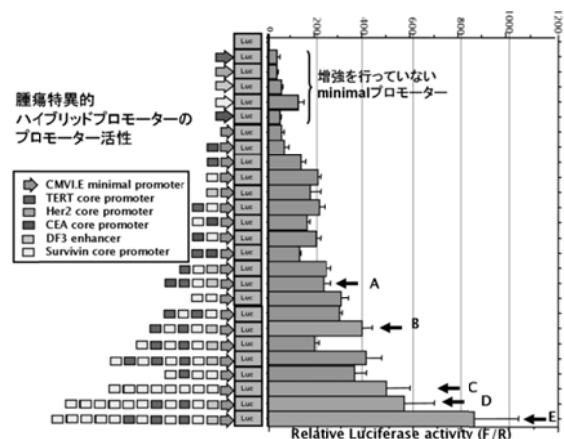
### Virus Burst Assay

MOI1.5 で各株膵臓癌細胞株に弱毒化ウイルス株を感染させ、24 時間後に感染細胞とウイルスを回収しウイルス力価を計算することによって、各細胞に対する組換えウイルスの増殖能力を計算する。また、フローサイトメリー

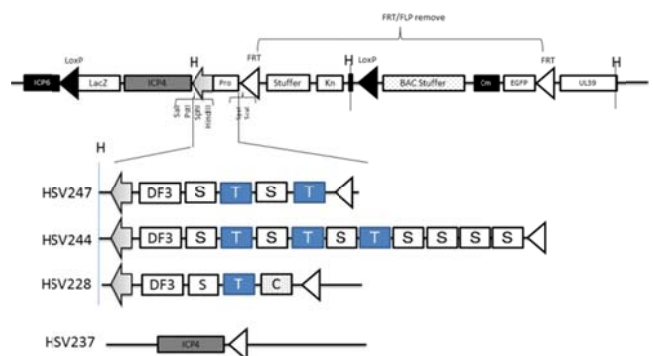
解析で細胞の状態を解析し、アポトーシスによる細胞致死率を算出する。さらに、組換えウイルスは正常膵細胞株に感染させて細胞毒性の有無を確認する。

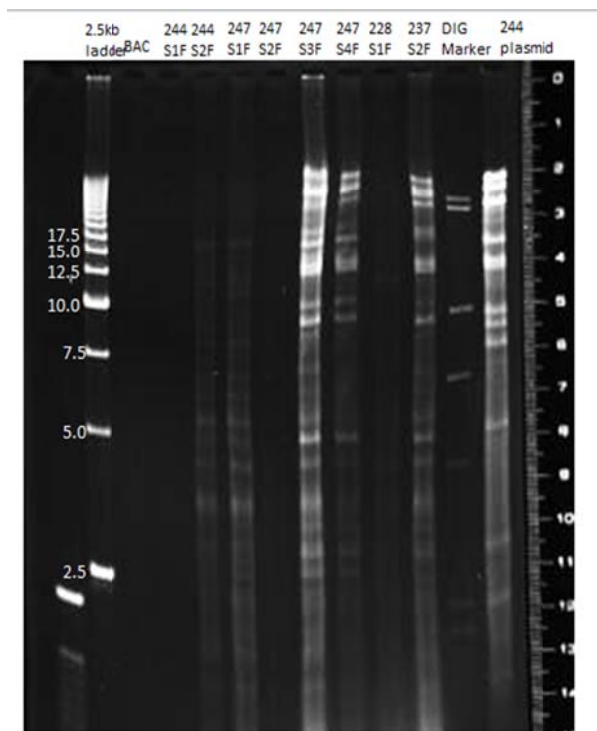
### 4. 研究成果

膵臓癌で過剰発現している複数の腫瘍特異的マーカー (hTERT, CEA, Survivin, ERBB2, DF3)の最少プロモーター領域を組み合わせるシフェラーゼ発現ベクター (pGL4.10, Promega) にサブクローニングし、膵臓癌細胞株にトランスフェクションして活性を確認しながらプロモーター活性の増強を行い、各プロモーター全長での活性より20倍以上高い活性を持つプロモーター活性を持つコンストラクトを得た。これらのうち、6種を用いてウイルスを作成することにした(下図矢印)。



これらのプロモーターコンストラクトを Flip-Flop HSV-BAC システム (*BMC Biotechnology* 2006, 6:40) を用いてインテグレーションし pM24-BAC-HPC コンストラクトを作成したのち、ICP4 遺伝子を恒常的に発現しているウイルスパッケージング細胞である Vero-E5 細胞に FLPrecombinase と co-transfection し組換えウイルスを精製した。この結果、4 種のコンストラクトの組換えウイルス株を得た(下図)。

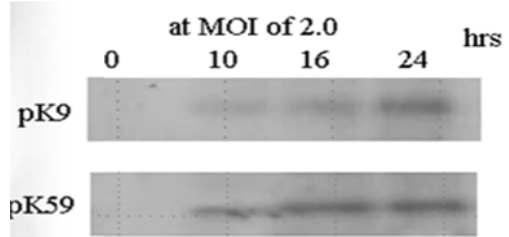




それらの殺腫瘍効果を pK1, pK8, pK59, Mia-PaCa2, KLM などの膵臓癌細胞株に感染させてウェスタンブロット、蛍光免疫染色、Virus burst assay、細胞生存アッセイで評価した。

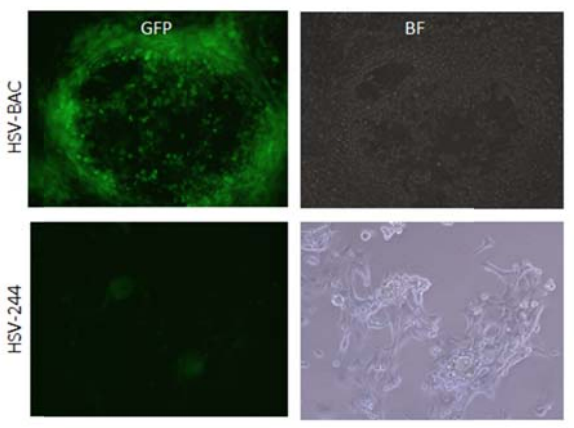
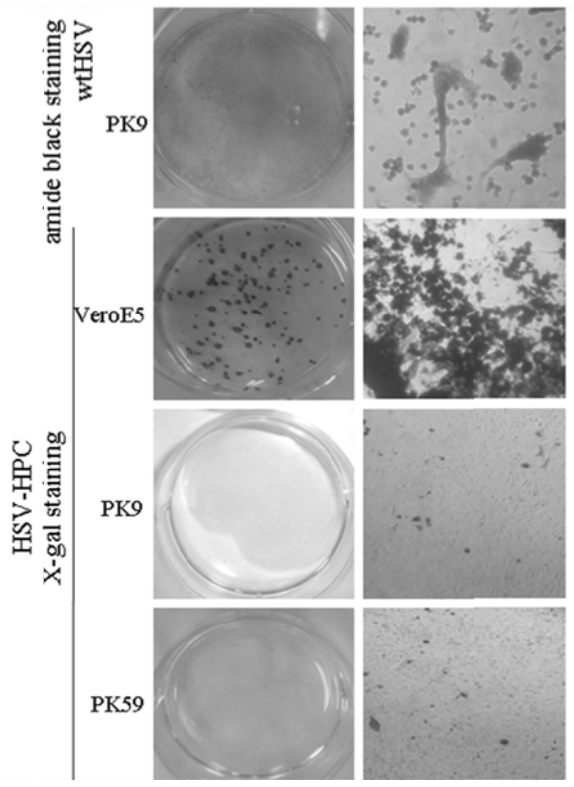
細胞生存アッセイの結果、高力価 (MOI3) で感染させると、組換えウイルスは全ての細胞株で殺腫瘍能力を保持していた。

ウェスタンブロットの結果では、感染価 MOI2 では、pK9, pK59 の ICP4 の発現は、野生型と比較すると劣っていた (下図)。



低力価 (MOI0.01) では pK1 以外の細胞株で ICP4 の発現量が野生型に大きく劣り、増殖力に乏しく感染後十日間培養しても Total CPE に達しなかった。

コンストラクトを改良しウイルスの増殖力の改善を試みていたが、研究期間中に治療に十分な水準の増殖力を持つ組換え体を得ておらず、in vivo での検討に移行できなかったが、研究は継続中である。



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 0 件)  
 [学会発表] (計 0 件)  
 [その他]  
 ホームページ等

6. 研究組織  
 (1) 研究代表者  
 福田 絵美 (EMI FUKUDA)  
 広島大学・自然科学研究支援開発センター・研究員  
 研究者番号: 20403503  
 (2) 研究分担者  
 ( )  
 研究者番号:  
 (3) 連携研究者  
 ( )  
 研究者番号: