

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462401

研究課題名(和文) 泌尿器癌に汎用性を有する癌特異的プロモータを利用した抗癌ウイルス療法の開発

研究課題名(英文) Development of an antineoplastic virus utilizing a tumor-specific promoter effective against multiple urologic tumors

研究代表者

竹島 雄太 (Takeshima, Yuta)

東京大学・医学部附属病院・登録診療員

研究者番号：10372393

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)：第三世代遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス1型はウイルス自体ががん細胞特異的に増殖して死滅させる新しい治療の最先端で、3つのウイルス遺伝子機能を欠落させ、高い安全性と強力なウイルス複製能を実現しすでに臨床試験を開始している。理論上欠落したICP6機能を代償する細胞の酵素活性に依存するため、緩徐に増殖する癌の一部ではウイルス複製能が低い可能性が残る。そこでICP6遺伝子をかん特異的プロモータで制御することにより、常に高いウイルス複製能を呈する新規HSV-1を開発した。緩徐に進行する癌にも高い治療効果を発揮する万能型HSV-1の開発は、癌治療におけるウイルス療法の実用化を更に促進すると期待される。

研究成果の概要(英文)：The triple-deleted oncolytic herpes simplex virus type I G47delta represents the cutting edge of a new field of oncotherapy utilizing genetically-engineered viruses. Of the three deletions, the deletion of the ICP6 gene may in theory make viral replication reliant on host enzyme level, and thus be inhibited in slower-growing tumors. Using the G47delta as the backbone, we created a new oncolytic HSV-1 with an intact ICP6 gene under the control of tumor-specific promoters to eliminate this effect, and enhance viral growth and efficacy against slower-growing tumors. We hope this new virus will further stimulate the use of viral agents in oncotherapy.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：遺伝子治療 ウイルス療法 ヘルペスウイルスI型 泌尿器がん

1. 研究開始当初の背景

(1) ウイルス療法の世界的動向

近年、様々な固形癌に対し抗癌ウイルスによる治療の有効性が示されてきている。これら抗癌ウイルスは、癌細胞でのみ増殖するよう遺伝子工学的に改変され、正常組織に対する安全性を確保したうえで、その殺細胞効果や遺伝子発現を利用し癌を死滅させる効果を持つ。特に増殖型 HSV-1 を用いた癌のウイルス療法は、他のウイルスと比較し殺細胞効果が高いこと、抗ウイルス薬が存在すること、HSV-1 の細胞間伝搬が血中抗 HSV-1 抗体に影響されないことなど実用面で優れており、有効な癌治療法として期待されている。1991 年に遺伝子組換え HSV-1 が癌細胞特異的に複製し癌細胞を死滅させる概念が提唱されて以来[1]、その開発研究は飛躍的に進歩してきた。二重変異を有する第二世代 HSV-1[2]により野生型への復元の懸念や抗ウイルス薬への感受性の消失などの問題が是正され、現在までに欧米で複数の臨床試験が、悪性脳腫瘍、悪性黒色腫などを対象として行われている。一部は第 III 相臨床試験にまで達し、抗癌 HSV-1 の臨床薬承認が期待されている。

(2) 我々の研究成果

これまで開発された様々な遺伝子組換えウイルスの中でも、現在米国で悪性脳腫瘍での臨床試験が行われている第 2 世代の癌治療用 HSV-1 (G207) が、有効性・安全面からウイルス製剤として実現性が高いと考えられている[2]。われわれはこの G207 に更に改良を加えた第 3 世代遺伝子組換え型 HSV-1 である G47 を開発した[3] (図 1)。G207 は脳炎発生など病原性に関連する 34.5 遺伝子とウイルス DNA 合成に関連する ICP6 遺伝子の 2 つの遺伝子を改変したウイルスであり、G47 ウイルスはさらにヒトの免疫機構に關与する ICP47 遺伝子を改変した世界で唯一の第 3 世代 HSV-1 である。ICP47 遺

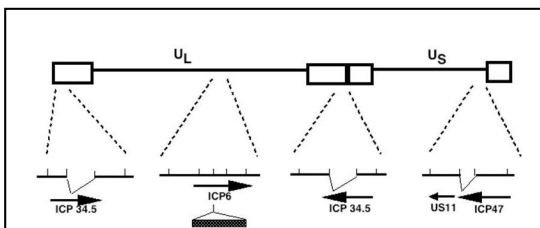


図 1 G47A の構造：野生株 HSV-1 を元に γ 34.5, ICP6, ICP47 を欠失した最新型の第 3 世代抗癌ウイルス

伝子の改変により、G47 は MHCclassI 抗原提示を維持することにより抗腫瘍免疫を惹起し、更に 34.5 欠失状態でもウイルスの蛋白合成能を保つことにより安全性を損なわずに癌特異的なウイルス複製能の飛躍的な向上をもたらした。G47 はグリオーマ・乳癌・神経線維腫・前立腺癌などさまざまな癌種でその有効性・安全性が示され、2009 年より進行性の脳膠芽腫、2013 年より前立腺癌に対し本学で G47 ウイルスの臨床試験を行っている。

またわれわれは、G47 配列に BAC (bacterial artificial chromosome) を組み込み、ウイルスにインターロイキンなど任意の遺伝子を容易に組み込むことができるシステムの構築に成功した[4] (次頁図 2)。このシステムを活用することにより、突然変異を防ぐ工夫を行ったウイルス、サイトカインや免疫補酵素を発現するウイルス等を作製し、それぞれ動物モデルにおいてベースとなった G47 に対し抗腫瘍効果を有意に増強させることができた[論文準備中]

研究代表者はこの BAC を利用したシステム (図 2) を利用し、2 種の新規ウイルス T-OC・T-PSES を作製した (図 3)。これらのウイルスでは 2 種の組織特異的プロモータで ICP6 発現を制御し、ICP6 欠失により失われたウイルス複製能・殺細胞効果を前立腺癌感染時に増強させることに成功(論文準備中)。ただし、簡便なシステムといえど、あらゆる癌種に対応しそれぞれプロモータを組み込み新規ウイルスを作製することは非現実的と思われた。

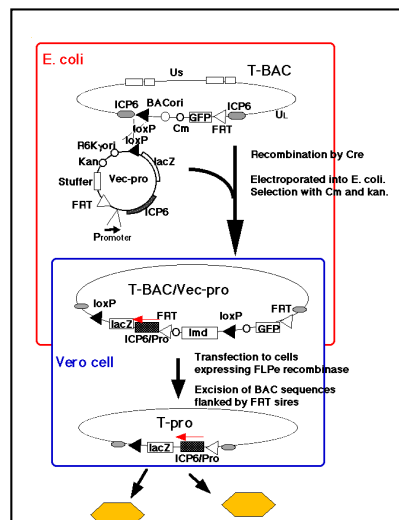
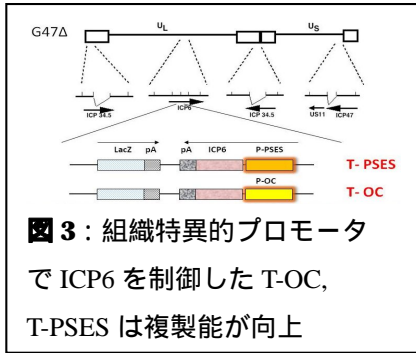


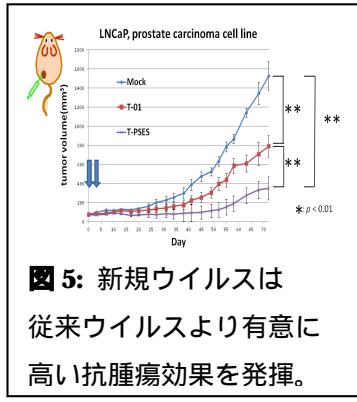
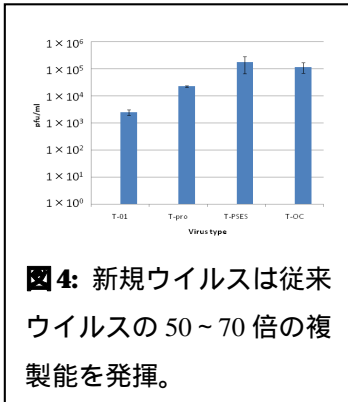
図 2：T-BAC システムにより HSV-1 に簡便に遺伝子組み込みが可能となった。

そこで、多種の癌細胞で発現しかつ正常組織では発現しない組織特異的のプロモータで ICP6 を制御できれば、1 種のウイルス製剤でも複数の癌種に使用可能な「万能型」の抗癌ウイルスが得られると考えた。本研究では、癌特異的に目的遺伝子を発現する midkine および E2F1 プロモータを利用する計画とした。E2F1、Midkine プロモータはともに複数の癌種で組織特異的に高発現される特性がある。よって本研究のプロモータカセットとして理想的であると考え、その採用を決定した。



2. 研究の目的

本研究では、まず midkine および E2F1 プロモータを利用して新規 HSV-1 ウイルスを作製することを目的とした。前述の研究代表者の研究ではコントロールウイルスと比較して、ICP6 発現の増強およびそれによる複製能の向上(図4)及び抗腫瘍効果の増強(図5)が証明された。E2F1、Midkine プロモータ制御ウイルスでも同様の検証を行い、各種正常細胞の cell line における複製能向上や ICP6 発現の特異性保持の検証も加える予定とした。最終的には *in vivo* の動物モデルで抗腫瘍効果増強の検証を計画した。ICP6 欠失による複製能の Drop-off は増殖の比較的遅い癌種で最も顕著に現われると推察され、泌尿器癌では前立腺癌および腎癌が良いモデルになると考えられた。



3. 研究の方法

(1) 新規ウイルスの作成: 今回 ICP6 を新たに HSV-1 ウイルスに組み込むにあたり、欠失した ICP6 領域の両端が残存することが生体内で相同組み換えを誘導する可能性があると懸念し、残存 ICP6 領域を完全に欠失したウイルス作成に着手した(図6)。まず骨格となる G47 より削除する予定の残存 ICP6 領域の両端の相同配列を作成し、上記 BAC system によるウイルス構築が可能となる配列をならべたプラスミドを作成した(図7)。G47 より DNA 抽出を行った後に、相同組み換えにより ICP6 領域を完全に削除するとともに BAC 配列をウイルス内に組み込んだ(図8)。

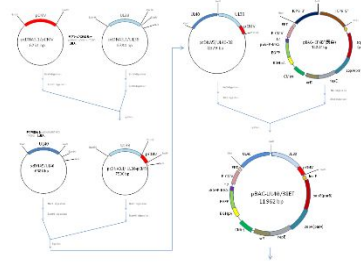
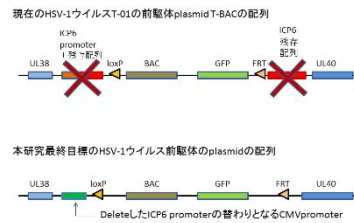


図 8: ウイルス DNA との相同組み換えにより ICP6 配列をすべて除去

(2)次に新規プロモーターmidkine および E2F1 promoter を挿入した shuttle vector を作成し、前述の BAC system で組み込み、新規ウイルスを完成させた。(図 9) 新規ウイルスに用いる E2F1 promoter, Midkine promoter の配列はそれぞれ以下の論文(5),(6)に従い、GeneWiz 社(NJ, USA)に DNA 片の人工合成を外注した。上記図2に示した BAC システムに従い、G47 を Backbone に作製した。出来上がった 2 種のウイルス T-E2F1, T-MK を、コントロールウイルス T-pro, T-01, R47 とともに以降の実験でその機能解析を行う。

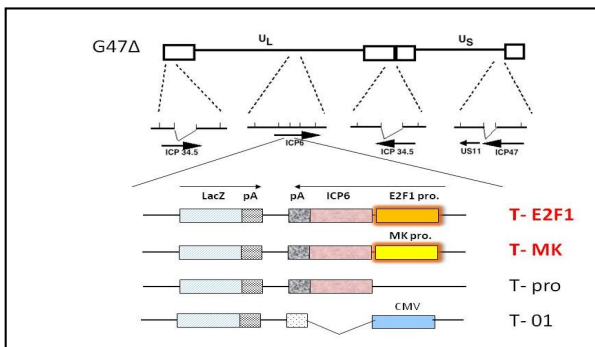


図 9:新規 HSV-1 の構造

(3) 電気泳動・Southern Blot・シーケンシングによりウイルスの構造が正しく作成されているか確認した。

(4) (III) ICP6 の機能復元が有効となる細胞株選定

新規ウイルスの backbone となる G47 (ICP6negative)とコントロールウイルス R47 の複製能を各種癌細胞株で比較することにより、ICP6 機能復元により抗腫瘍効果の増強が期待できる細胞株を選定する。代表申請者は以前の研究で同様の検討を行っており、図 10 の通り前立腺癌・腎癌などの細胞株で ICP6 欠失による複製能低下を確認済である。本研究では肉腫・膵癌・膀胱癌などさらに癌種を増やし、検討を行う予定とする。

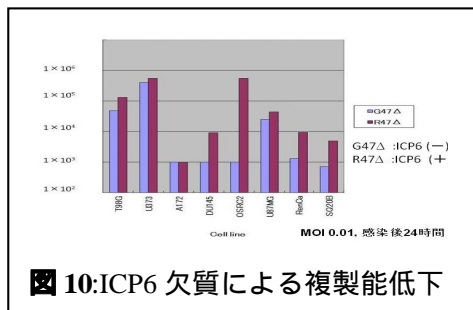


図 10:ICP6 欠質による複製能低下

(5) 新規ウイルスの複製能の検討

上記の実験で得られた候補の細胞株を使用し、*in vitro*での replication assay を行う。具体的にはシャーレに撒いた細胞

にウイルス液を感染させ、48 時間 incubation ののち培養液を回収し力価を測定する。力価は IgG 無添加培地の中で Vero 細胞に感染させ、72 時間後に plaque を計数することにより plaque forming units(pfu)/ml として計算する。コントロールウイルスには図 6 に記した T-01, T-pro を使用する。ここで新規ウイルスの複製能が有意に上昇した細胞株を使用し、以下の殺細胞効果・抗腫瘍効果の実験へと進む。

(6) *in vitro*における新規ウイルスの殺細胞効果の検討

(4) の実験で得られた候補の細胞株を使用し、*in vitro*での cytotoxicity assay を行う。具体的にはシャーレに撒いた細胞にウイルス液を感染させ、incubation を行いながら連日残存細胞数の計数を行う。コントロールウイルスには図 6 に記した T-01, T-pro を使用する。ただし、ここで新規ウイルスの殺細胞効果が有意に上昇しなくとも、細胞培養に適した *in vitro* の環境では有意差が出にくいと考えられ、構わず *in vivo*の実験へと進むこととする。

(7) *in vivo*における新規ウイルスの抗腫瘍効果の検討

前年度に予備実験にて決定した癌細胞・ウイルスそれぞれの投与量を使用し本実験を行う。ヌードマウスに皮下腫瘍モデルを作成し、Day0, Day3 と新規ウイルスの 2 回投与を行う。腫瘍径の変化を 3 日ごとに測定し、ANOVA 検定で成長曲線に有意差が生じるかを検定する。

(7) 新規ウイルスの安全性評価

使用するプロモータはすでに双方とも悪性腫瘍に対する高い組織特異性が示されているものの、正常組織での増殖が一部でもその特異性に依存する以上、ウイルスゲノム内での発現確認は必須と考えられる。本研究では幅広い癌種での使用が見込まれるため、正常組織の cell line も使用した検証を行う。具体的には、overnight でウイルス感染させた組織液を RIPA buffer で採取、抗 ICP6 抗体(ヒト ribonucleotide reductase と相同性なし)を用いて Western Blotting を行い、ICP6 がプロモータにより癌特異的に発現されているかを検証する。

4. 研究成果

(1) ICP6 (UL39) の両端を形成する配列の作成を行った。UL40 領域の 3' 末端を形成する 1.2kb の fragment は HSV-1 の遺伝子配列に従い primer を作成し、PCR で得られた。UL40 の 3' 末端を形成する fragment は様々な

primer 設定を行うも PCR で得ることができず、最終的には元のウイルス DNA より制限酵素処理 (NheI と KpnI) で切り出した 960bp の fragment を相同組み換えに利用する計画とした。プラスミドへの組み込み・構築は図 7 の通りに進行した。相同組み換え用のプラスミドが完成した時点で骨格となる G47 の DNA 抽出を行ったものの、超遠心後に band を視認することができず断念。ICP6 領域が wild type のままとされている 2 重遺伝子変異ウイルス R47 を backbone に作成しても全く同じ配列のウイルスが完成すると考え、R47 の DNA 抽出を行った結果成功した。相同組み換えを行い、GFP positive の株を採取。

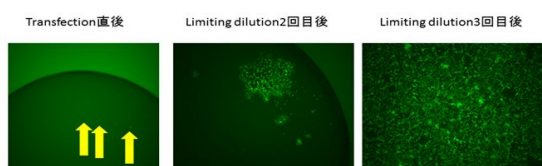
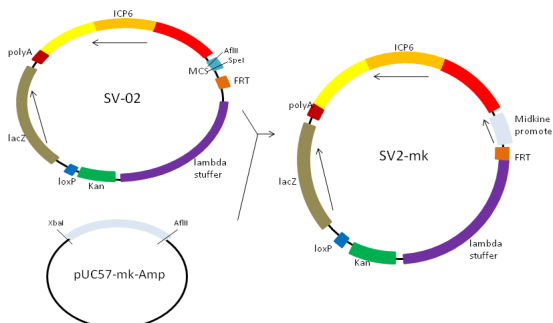


図 10:新規 BAC の単離

下記の図 11 のように limiting dilution を 3 回行い、single clone の BAC を単離した。Hirt 法により円形の BAC の形態に戻し、shuttle vector の組み込みへと進んだ。

上記の通り shuttle vector 内への promoter



の組み込みを施行。Promoter の配列は前述の通り人工遺伝子作成を依頼し得たものである。

Shuttle vector が完成した時点で新規 BAC への組み込みを図 2 の T-BAC system に従い行い、下記図 11 の通り、GFP が切り出されたコロニーを採取していった。この limiting dilution の作業をさらに 3 回繰り返す、単一クローンによると思われるウイルス株を新規ウイルス T2-MK, T2-E2F1, コントロールウイルス T2-02 についてそれぞれ 3 - 6 株構築した。

(2) 上記までの作業に約 3 年費やしたため、実験計画に大幅な遅れをとることとなった。現在構造確認・複製能検査を行っており、機能実験はそののちという段階である。

<引用文献> Martuza RL et al: Science 1991. Mineta T et al: Nat Med 1995. Todo T et al: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001. Fukuhara H et al: Cancer Res 2005 Hsiao KM et al., Genes Dev. 1994; 8: 1526-1537 Uehara K, et al., J Biochem. 1992; 111(5):563-7

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 1 件)

竹島 雄太、泌尿器癌に対し高い複製能を有する新規がん治療用 HSV-1 の開発、第 102 回日本泌尿器科学会総会 2014 年 4 月 24 日 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

6. 研究組織

研究組織

(1) 研究代表者 竹島 雄太 (TAKESHIMA, Yuta) 東京大学 医学部附属病院 登録診療員 研究者番号: 10372393

(2) 研究分担者 福原 浩 (FUKUHARA, Hiroshi) 東京大学・医学部附属病院・准教授 研究者番号: 20292948