

令和元年5月20日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04712

研究課題名(和文) RIG-I/MAVS経路の制御因子の解明に基づく癌治療の新展開

研究課題名(英文) Development of a new strategy for cancer therapy based on RIG-I and MAVS signaling pathway

研究代表者

金田 安史 (Kaneda, Yasufumi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10177537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：HVJ-Eの抗腫瘍作用はRIG-I/MAVS経路が担っている。その下流分子の中でHVJ-Eの抗腫瘍作用を決める分子の同定を行いIRF7であることを明らかにした。HVJ-Eを投与された治験患者の腫瘍組織のRNA seq.により、投与1ヵ月後でもT細胞の活性化マーカーとともにT細胞抑制マーカーの発現も上昇していた。免疫チェックポイント阻害抗体抵抗性になった患者の腫瘍サンプルを移植してPDXマウスを作成した。HVJ-Eの腫瘍内投与により、有意な腫瘍抑制を認めた。このことは、HVJ-Eと抗PD-1抗体の併用が抗腫瘍効果を増強できることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来自然免疫を活性化する1つの経路を担う分子として研究されてきたRIG-Iであるが、我々は癌細胞選択的細胞死を起こすシグナルとして発見し注目してきた。今後はRIG-Iシグナルに焦点をあて癌細胞に特徴的なクロマチン構造変化やその原因究明の研究が進むことが期待され、癌細胞特異的なクロマチン構造変化を起こし細胞死を誘導できる分子機構の究明につながり、癌細胞の新たな特性を明らかにできる。本研究成果をもとにさらに研究が発展すれば、癌の予防や治療に貢献する新規標的分子の同定を可能にし、正常組織に影響を与えることなく癌を駆逐できる理想の癌治療法を提供できる。

研究成果の概要(英文)：The anti-tumor activity of Sendai virus envelope (HVJ-E) is dependent of RIG-I and MAVS signaling pathway, which induces anti-tumor immunity and cancer-selective cell death. We identified IRF7 plays a pivotal role for HVJ-E-activated anti-tumor activity. RNA seq. analysis was performed to elucidate gene expression pattern in melanoma samples isolated from HVJ-E-treated patients. Both T cell activation and exhaustion markers were up-regulated. Then, we obtained melanoma tissue derived from metastatic lymph node of patients resistant to anti-PD-1 therapy. PDX mice were constructed and treated with HVJ-E by intratumoral injection. Tumors were significantly suppressed by the treatment. These results suggest that combination of HVJ-E with anti-PD-1 antibody will provide more effective cancer therapy to cancer patients.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：抗腫瘍免疫 がん

## 1. 研究開始当初の背景

癌治療の分野は、最近飛躍的な進歩を遂げている。1つは免疫チェックポイント阻害抗体による治療が次々と奏功し、それによって腫瘍免疫の理解が進み、癌における免疫寛容を打破する治療法の重要性に注目が集まっている。また腫瘍溶解ウイルスの有効性も認められ、GM-CSF 遺伝子を乗せた腫瘍溶解ヘルペスウイルス(T-Vec®)は欧米で癌治療薬として最近承認された状況である。しかし免疫チェックポイント阻害抗体に抵抗性の癌をどう克服するのか、癌の形成や再発をおこす源となる癌幹細胞とみなされる集団をどのように制御するのかは、現在の癌治療の最大の課題である。

一方、我々が開発を進めてきた不活性化 Sendai virus (HVJ-E)はその粒子自体が抗腫瘍作用を有し、それは抗腫瘍免疫の活性化、と、癌細胞選択的な細胞死誘導であることが報告されてきた (Cancer Res. 2007, 2014, Clinical Cancer Res. 2012)。臨床用製剤(凍結乾燥製剤)の完成、非臨床試験の完了を基に、メラノーマと去勢抵抗性再燃性前立腺癌では臨床研究を経て医師主導治験に入っており、その臨床データからも、2つの抗腫瘍作用が検証されつつある。

HVJ-E の主たる抗腫瘍作用は抗腫瘍免疫の活性化と癌選択的な細胞死誘導作用であることが解明されている。粒子内に含まれるウイルス RNA 断片が細胞質内 RNA 受容体の RIG-I(retinoic acid-inducible protein-I)で認識され、RNA/RIG-I complex がミトコンドリア上の MAVS(mitochondria anti-viral signaling protein)に働いて多量体を形成させ、周囲のリン酸化酵素を活性化して、IRF(interferon regulatory factor)3,7 などの転写因子の核移行を促す。この経路により樹状細胞やマクロファージなどの免疫細胞からは、サイトカインとして interferon(IFN)- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , interleukin (IL)-6 やケモカインとして CCL2,3,5, CXCL10 が誘導され、NK 細胞や CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T 細胞の浸潤を促すとともにそれらを活性化する。また樹状細胞の抗原提示能、マクロファージの抗腫瘍性を強化させる。さらに IL-6 により制御性 T 細胞の機能を抑制する(Cancer Res. 2007, etc)。一方、癌細胞ではこの経路により TRAIL, Noxa などのアポトーシス誘導遺伝子が癌細胞選択的に発現する(これら遺伝子のエンハンサーとして機能する特定部位に癌細胞でのみ脱メチル化を認める; unpublished data)ことにより癌細胞選択的な細胞死を誘導する(Clin. Cancer Res. 2012)。このように HVJ-E は RIG-I/MAVS 経路を活性化できる RNA delivery system と考えることができる。ちなみに RIG-I/MAVS 経路の活性化に必要な HVJ-E のゲノム RNA 断片の構造も我々の研究室で最近明らかになった。

## 2. 研究の目的

我々は、不活性化 Sendai virus 粒子(HVJ-envelope; HVJ-E)自体に抗腫瘍免疫活性化能と癌選択的な細胞死誘導作用を見出し、現在医師主導治験が実施されている。その主たる作用機構は、HVJ-E含有のウイルスRNA断片が細胞質内RNA受容体RIG-Iに認識されMAVSを経てIRF3,7等の転写因子を活性化することによる。一方RIG-IおよびMAVS経路は癌幹細胞に優先的な細胞死を誘導し、免疫チェックポイント阻害抗体と相乗的に癌免疫を活性化することが示唆されている。本研究では、RIG-I/MAVS経路の制御因子の網羅的解析を癌細胞、癌組織において施行し、臨床検体を用いた検証を行って、癌幹細胞への作用や免疫チェックポイントとの関わりを解明し、その結果とHVJ-Eの抗腫瘍効果をもとに、癌治療分野の課題を克服できる癌治療の新展開を目指す。

### 3. 研究の方法

- (1) HVJ-E の抗腫瘍能の根幹である RIG-I/MAVS 経路に作用する遺伝子を次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析法により網羅的に探索し、候補遺伝子を CRISPR/Cas9 法でノックアウトした癌細胞を作成し、マウスに移植して HVJ-E を投与し、その感受性を調べる。臨床検体における検証も RNA seq.により行う。HVJ-E の作用は細胞によって異なり、癌細胞では細胞死を誘導するが、正常細胞では細胞死を誘導しない。そのメカニズムを解析するため、ヒト前立腺がん細胞と正常前立腺上皮細胞での RNA seq.により HVJ-E によって発現が誘導される遺伝子を比較し、癌細胞特異的に発現増強する遺伝子群を絞り込む。その遺伝子座について ChIP-seq.を用いてクロマチンの状態を解析する。特に H3K4 モノメチル化、H3K27 アセチル化について調べる。また p300, IRF7 の結合状況も解析する。さらに ATAC seq.を用いてクロマチンの凝縮状態の変化についても調べる。
- (2) HVJ-E で治療した患者の腫瘍組織を入手し、その腫瘍組織での網羅的な遺伝子発現を特に T 細胞マーカーに限定して RNA seq.により解析する。また抗 PD-1 抗体抵抗性のメラノーマの臨床サンプルを入手し、細切して NOD-SCID マウスの皮内に移植して PDX マウスを作成する。腫瘍形成後に HVJ-E (2000 HAU)を腫瘍内投与して治療を行う。
- (3) HVJ-E の Cancer Initiating Cell (CIC)に対する感受性を調べるため、ヒト乳癌細胞 MDA-MB231 をスフェア形成用のプレートに 1 well あたり 10000, 1000, 100, 10, 1 細胞が入るように巻き込み、スフェア系静養の培地で培養する。巻き込む前に癌細胞を 100 HAU, 500 HAU の HVJ-E(コントロール群は PBS のみ)で処理し、48 時間後、細胞増殖に差がないことを確認のうえ、スフェア形成を誘導する。96 well のうちスフェア形成を起こした well の割合 (sphere initiating frequency) を比較する。

### 4. 研究成果

- (1) ヒト前立腺がん細胞 PC3 と正常前立腺上皮細胞 PNT2 に HVJ-E を作用させ、その遺伝子発現を RNA seq.により網羅的に解析し、転写因子 BATF2, IRF7 ががん細胞選択的に HVJ-E により発現増強されることが明らかになった。マウスメラノーマ細胞株 F10 細胞に HVJ-E を作用させてもほとんど遺伝子発現に変動はなかったが、マウスに腫瘍を形成させて HVJ-E を投与すると、やはりこれら 2 つの遺伝子発現が増強することが分かった。この系では、癌細胞の遺伝子発現を調べるために GFP マウスの皮内に野生型の F10 細胞を移植して GFP 非発現細胞のみを回収して次世代シーケンサーで RNA seq.を実施している。そこで IRF7, BATF2 それぞれのノックアウト細胞を CRISPR/Cas9 法により作成した。それぞれの変異細胞株を C57BL/6 マウスの皮内に移植し、HVJ-E(2000 HAU)を 3 回腫瘍内に投与を行った。BATF2 ノックアウト細胞を移植した場合には、野生型の F10 細胞と同じく HVJ-E による腫瘍抑制が起こったが、IRF7 ノックアウト F10 細胞では、HVJ-E による腫瘍抑制効果が消失した。以上のことから、RIG-I/MAVS 下流ではたらくと報告されている IRF7 が HVJ-E の抗腫瘍効果の重要な決定因子であることが示唆された。なお HVJ-E では I 型インターフェロンが誘導され、これによる抗腫瘍効果も考えられることから、I 型インターフェロンの受容体を CRISPR/Cas9 でノックアウトしたマウスメラノーマ細胞を作成し、この細胞をマウスに移植して腫瘍を形成させ HVJ-E で治療をおこなった。I 型インターフェロン受容体をノックアウトしても HVJ-E による腫瘍抑制は阻害されなかった。

ヒト前立腺がん細胞PC3でHVJ-Eによりがん細胞選択的に発現誘導される遺伝子を同定した。その代表的な遺伝子であるインターフェロン誘導蛋白質の遺伝子座についてクロマチン状態の変動を調べた。ATAC-seqを施行したところ、何れの遺伝子座もクロマチン構造が弛緩しオープンクロマチン状態になっていた。ChIP-seqを行ったところ、それらの遺伝子座においてH3K27のアセチル化が亢進していたが、H3K4のモノメチル化は変化がなかった。またそれらの遺伝子座にはp300がリクルートされ、IRF7が結合していることが分かった。以上の結果は、HVJ-Eの作用によりがん細胞選択的にクロマチン構造の変化が誘導され、それががん細胞選択的な遺伝子発現誘導につながっていることが示唆された。

(2) HVJ-Eを投与された治験患者の腫瘍組織を用いて、RNA seq.を行った。治験1例目で低用量HVJ-Eを投与した患者の腫瘍組織である。HVJ-E非投与の腫瘍組織、HVJ-E投与後1ヶ月の残存腫瘍、HVJ-E投与から半年後にHVJ-E非投与部位に新たに出現した腫瘍組織を用いた。HVJ-E投与後1ヶ月の腫瘍組織でPD1, LAG3, CTLA4などT細胞の抑制マーカーの発現が上昇し、T細胞活性化後の疲弊状態を表していることが示唆された。そのほかの免疫系のマーカー遺伝子の変動はなかった。以上のことは、HVJ-Eと抗PD-1抗体の併用が抗腫瘍効果を増強できることを示唆している。マウスメラノーマF10の腫瘍モデルでは、HVJ-Eは皮内投与でも腫瘍内投与と同等の腫瘍抑制効果を発揮することが分かった。そこでマウスメラノーマモデルでHVJ-Eの皮内投与と抗PD-1抗体の腹腔内投与を行った。抗PD-1抗体単独では腫瘍抑制効果は認められなかった。HVJ-Eと抗PD-1抗体の併用群でもっとも腫瘍抑制が著明であったが、HVJ-E単独群と有意差は認めなかった。分担研究者より免疫チェックポイント阻害抗体で治療し抵抗性になった患者の腫瘍サンプルを入手した。この組織を細切しNOD-SCIDマウスの皮内に移植してPDXマウスを作成した。腫瘍体積が約300 mm<sup>3</sup>になった時点でHVJ-E(2000 HAU)を2日おきに腫瘍内に投与した。投与は20回続けられた。抗PD-1抗体に抵抗性でリンパ節に転移した腫瘍はHVJ-Eに反応し、有意な腫瘍抑制を認めた。一方、抗PD-1抗体と抗CTLA-4抗体に抵抗性になって腸管に転移した腫瘍をNOD-SCIDマウスに移植した場合は、HVJ-Eによる治療に反応しなかった。

(3) CICに対するHVJ-Eの効果をsphere initiating frequencyによって検証した10000細胞を巻き込んだ場合は、全てのwellにスフェア形成がされ、HVJ-Eによる影響は見られなかった。1000細胞、100細胞、10細胞で巻き込んだ場合はHVJ-E処理によりスフェア形成率が激減し、1000細胞の場合、0 HAU (PBSのみ)、100 HAU, 500 HAU群でそれぞれ70%、50%、30%であった。100細胞の場合は、それぞれ20%、8%、10%、10細胞では7%、4%、2%であった。1細胞の場合はいずれも0%であった。以上よりHVJ-EはCICを特異的に細胞死誘導している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件、すべて査読有り)

Shimbo, T., Endo, M., Iwai, S., Kitayama, T., Ouchi, Y., Yamamoto, R., Takaki, E., Yamazaki, S., Nishida, M., Wang, X., Kikuchi, Y., Tomimatsu, T., Kaneda, Y., Kimura, T. Tamai, K.

Transcriptionally distinct mesenchymal stem/stromal cells circulate in fetus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019 Mar 16. pii: S0006-291X(19)30410-3 doi: 10.1016/j.bbrc.2019.03.033.

Mitsuda Y, Morita K, Kashiwazaki G, Taniguchi J, Bando T, Obara M, Hirata M, Kataoka TR, Muto M, Kaneda Y, Nakahata T, Liu PP, Adachi S, Sugiyama H, Kamikubo Y. RUNX1

positively regulates the ErbB2/HER2 signaling pathway through modulating SOS1 expression in gastric cancer cells. *Sci. Rep.* 2018, 8, 6423 doi: 10.1038/s41598-018-24969-w.

Ho YT, Shimbo T, Wijaya E, Ouchi Y, Takaki E, Yamamoto R, Kikuchi Y, Kaneda Y, Tamai K. Chromatin accessibility identifies diversity in mesenchymal stem cells from different tissue origins. *Sci Rep.* 2018 Dec 10;8(1):17765, doi: 10.1038/s41598-018-36057-0.

Sumin, L., Nishikawa, T., Kaneda, Y. Inactivated Sendai Virus Particles upregulate cancer cell ICAM-1 expression with enhancing NK cell sensitivity on cancer cell. *Cancer Science* 108(12):2333-2341, 2017. doi:10.1111/cas.13408.

Lee C-H, Nishikawa, T., Kaneda, Y. *Salmonella* mediated the hemagglutinating virus of Japan-envelope transfer suppresses tumor growth. *Oncotarget* 8(21):35048-35060, 2017. doi: 10.18632/oncotarget.17037.

Fujita, K., Nakai, Y., Kawashima, A., Ujike, T., Nagahara, A., Uemura, M., Miyagawa Y., Lee, C-M., Inoue, T., Kaneda, Y., Nonomura, I. Phase I/II clinical trial to assess safety and efficacy of intratumoral and subcutaneous injection of HVJ-E to castration resistant prostate cancer patients. *Cancer Gene Ther.*, 24(7):277-281, 2017. doi:10.1038/cgt.2017.15.

Chang CY, Tai JA, Li S, Nishikawa T, Kaneda Y. Virus-stimulated neutrophils in the tumor microenvironment enhance T cell-mediated anti-tumor immunity. *Oncotarget* 7 (27), 42195-42207, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.9743.

Jiang Y, Saga K, Miyamoto Y, Kaneda Y. Cytoplasmic calcium increase via fusion with inactivated Sendai virus induces apoptosis in human multiple myeloma cells by downregulation of c-Myc oncogene. *Oncotarget* 7(24):36034-36048, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.9105.

Li, Y-T., Nishikawa, T., and Kaneda, Y. Platelet-cytokine Complex Suppresses Tumour Growth by Exploiting Intratumoural Thrombin-dependent Platelet Aggregation. *Scientific Reports*, 26:25077, 2016. doi: 10.1038/srep25077

Liu, L-W, Nishikawa, T. and Kaneda, Y. An RNA molecule derived from Sendai virus DI particles induces anti-tumor immunity and cancer-selective apoptosis. *Mol. Therapy*, 24(1):135-45, 2016. doi: 10.1038/mt.2015.201

〔学会発表〕(計 9件)

HVJ エンベロープベクターを用いたがん免疫治療法の開発”、口頭発表(シンポジウム)、金田安史、第18回日本再生医療学会 神戸、2019年3月22日、国内  
Development of a novel anti-cancer immunotherapy using HVJ-E、口頭発表(シンポジウム)、金田安史、第56回日本癌治療学会学術集会 横浜 2018年10月19日、国内

世界の遺伝子治療の現状と展望 口頭発表(招待講演) 金田安史 日本人類遺伝学会第62回大会 神戸 2017年11月18日 国内

Clinical trials for the treatment of intractable cancers using HVJ envelope (HVJ-E). 口頭発表(シンポジウム) Kaneda, Y. 横浜、第76回日本癌学会学術総会 2017年9月30日 国内

Current status and future prospect of human gene therapy.口頭発表(招待講演) Kaneda, Y. 国際胎児新生児治療学会 2017、大阪、2017年9月3日 国内

Current status and future prospect of gene therapy in Japan. 口頭発表 (理事長講演) Kaneda, Y. 第23回日本遺伝子細胞治療学会 岡山 2017年7月21日 国内

Development of a new anti-cancer immunotherapy using Sendai virus envelope (HVJ-E). 口頭発表(招待講演) Kaneda, Y. International Society of Cell and Gene Therapy of Cancer. Seoul (Korea) 2016年11月14日 国外

Multiple anti-cancer strategies using inactivated Sendai virus particle (HVJ-E). 口頭発表(シンポジウム) Kaneda, Y. 横浜、第75回日本癌学会学術総会 2016年10月8日

日 国内

Mission of JSGCT for gene therapy prosperity in future. 口頭発表(理事長講演)  
Kaneda, Y. 東京、第22回日本遺伝子細胞治療学会 2016年7月27日 国内

〔図書〕(計 1件)

(編集者、執筆者) 金田安史 (書名)遺伝子医学 (出版社)メディカルドゥ (発行年)2016年(総ページ数)300

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称:HVJ-E および CXCL2 を含む抗がん剤

発明者:金田安史、中島俊洋

権利者:ジェノメディア株式会社

種類:特許

番号:PCT/2016/074464

出願年:2016年

国内外の別: 国外

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gts/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:種村 篤

ローマ字氏名: Tanemura Atsushi

所属研究機関名:大阪大学

部局名:医学系研究科

職名:講師

研究者番号(8桁):50457016

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。