

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22697

研究課題名（和文）幹細胞をキャリアとして利用した骨肉腫肺転移に対するウイルス療法の開発

研究課題名（英文）Development of virotherapy for osteosarcoma pulmonary metastases using stem cells as carriers

研究代表者

久保 秀司（Kubo, Shuji）

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10441320

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：我々がこれまでに開発した増殖型レトロウイルス(RRV)は、癌細胞特異的に感染・増殖し、腫瘍内で効率よく拡散・伝播する。このRRVに自殺遺伝子を搭載させることによって、薬物前駆体投与で腫瘍細胞死を誘導することができ、これまでに様々な腫瘍モデルにおいて高い感染伝播効率と優れた治療効果を示してきた。本研究の成果により骨肉腫モデルにおいても同ウイルス療法は高い抗腫瘍効果を示す事が明らかとなった。さらに間葉系幹細胞が癌に集積する特性を利用し、この細胞をキャリアとしてRRVを癌に効率良く到達・分配させる方法の原理証明ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、骨肉腫肺転移症例へのRRVを用いた自殺遺伝子療法の適応拡大が期待され、臨床応用可能な実用性の高いウイルス療法開発につながる事が期待される。骨肉腫のみならず、播種性癌の患者の予後やQuality of Lifeを大きく改善する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We have developed a retroviral replicating vector (RRV) that specifically infects and multiplies cancer cells and efficiently spreads and propagates within tumors. By loading a suicide gene onto this RRV, tumor cell death can be induced by administration of a drug precursor, which has shown high infection efficiency and excellent therapeutic efficacy in various tumor models. The results of this study demonstrated that the viral therapy has a high antitumor effect in osteosarcoma models. Furthermore, we have demonstrated a proof-of-principle method to efficiently reach and distribute RRV to cancer cells using mesenchymal stem cells as carriers, taking advantage of their ability to accumulate in cancer cells.

研究分野：遺伝子細胞治療

キーワード：増殖型レトロウイルス がんウイルス療法 骨肉腫 肺転移 自殺遺伝子療法

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに腫瘍細胞特異的に感染・増殖する増殖型レトロウイルス(RRV)を開発した(Kubo et al, Hum Gene Ther 2001, 他多数)。RRV 自体に細胞傷害性はないが、自殺遺伝子搭載 RRV を用いた場合、薬物前駆体を投与することで、感染した腫瘍細胞内でのみ有毒代謝産物(抗癌剤)に転換され、腫瘍細胞死を誘導できる。これまでに様々な腫瘍モデルにおいて腫瘍内投与後、高い感染伝播効率と優れた治療効果を示してきた(Kubo et al, Mol Ther 2005, Cancer Gene Ther 2011, 2013, 2019a, 2019b, 他)。中でも自殺遺伝子であるシトシン脱アミノ化酵素(CD)を搭載した AMLV-RRV は、現在、欧米で悪性神経膠腫などの固形腫瘍に対し第2/3相試験(NCT02414165)に進み、生存期間の延長を含む良好な結果が得られている。

骨肉腫は青年期に好発する高悪性骨腫瘍で、最大の予後不良因子は肺転移である。申請者は、兵庫医科大学整形外科と共同で本療法を骨肉腫に応用することを目指しており、皮下腫瘍モデルマウスにおいて腫瘍内投与した場合は、高い感染伝播効率により優れた治療効果を示した(Kubo et al, Cancer Gene Ther 2018a)。しかし肺転移モデルにおける血管内投与では、十分な感染効率と抗腫瘍効果が認められなかった(癌学会総会口演, 2017)。この原因として、最近申請者は、血液中の補体が RRV を不活化していることを見出した(未発表)。したがって肺転移症例への適応拡大のためには、補体による不活化を回避しつつ RRV を腫瘍に効率良く輸送する方法の開発が必要不可欠である。そこで本研究では、腫瘍に遊走・集積する特性を持つことが知られている間葉系幹細胞(MSC)を RRV のキャリアとして利用することで、腫瘍に効率良く RRV を輸送する新技術の着想に至った。この手法は、MSC が、1)血管内投与や体腔内投与後に補体による RRV 不活化を回避しつつ腫瘍に RRV を効率良く輸送する、2)腫瘍組織内を遊走して広範に RRV を伝達する、3)周囲の正常組織内に浸潤する腫瘍細胞を追跡し RRV を伝達する、ことが期待され、高い治療効果をもたらさうと考えた。

2. 研究の目的

骨肉腫モデルにおけるRRV癌自殺遺伝子療法の有効性について検討し、同療法の骨肉腫への適応拡大を目指す。

3. 研究の方法

(1) MSC をキャリアとした癌への RRV 新規輸送法の in vitro における原理証明

MSC 及び骨肉腫細胞における RRV の感染効率、増殖効率、RRV 産生能の評価

ヒトMSC(骨髄由来3株、脂肪由来1株、臍帯由来1株)及びヒト骨肉腫細胞株6株について、GFP発現RRVを用いて、RRVの感染効率、増殖効率及びRRV産生能を評価した。

MSCの腫瘍細胞への遊走、RRV伝達効率の評価

レンチウイルスベクターを用いてGFP標識したMSCとmCherry標識した腫瘍細胞株について Transwell plateを用いMSCの骨肉腫細胞株への遊走能を検討した。さらにGFP発現RRVを感染させたMSCとmCherry標識ヒト骨肉腫細胞株につきTranswell plateを用いてMSCから腫瘍細胞へのRRV伝達効率の評価を検討した。またMSC-腫瘍細胞の接触共培養におけるRRV伝達効率についても評価した。

(2) 動物における有用性の検討

MSCの皮下腫瘍への集積、RRV伝達の評価

mCherry標識骨肉腫細胞6株をヌードマウスの皮下に移植し(1~2 x 10⁶ / 匹) 腫瘍形成の有無を評価した。腫瘍から骨肉腫細胞を回収し(in vivo passage)、数回継代した後に細胞を保存した。この細胞を用いて皮下腫瘍や肺転移腫瘍の作製を試みた。皮下腫瘍形成後、ルシフェラーゼを発現するRRV(RRV-luc)、及びこれを事前に感染させたMSC(MSC/RRV-luc)をそれぞれ尾静脈より投与し、In Vivo Imaging System (IVIS Lumina-II)により腫瘍内におけるluc発現を継続的に評価した。

ヒト骨肉腫肺転移マウスモデルの作製

従来報告に見られる方法で肺転移モデル作製を試みた。即ちmCherry標識骨肉腫細胞株(1~2 x 10⁶個)をヌードマウスの尾静脈から投与し、肺における腫瘍形成の有無についてIVISを用いて評価した。

ヒト骨肉腫肺転移マウスモデルを用いた治療実験

自殺遺伝子であるCDを発現するRRV(RRV-CD)を感染させた143B細胞(治療群)、及び非感染143B細胞(未治療群)をそれぞれヌードマウスに尾静脈注射した(各群9匹)。その7日後より70日目まで、薬物前駆体である5-FCを隔日投与した。その間、マウスの体重、健康状態、IVIS評価を続けた。

4. 研究成果

(1) MSC をキャリアとした癌への RRV 新規輸送法の in vitro における原理証明

MSC 及び骨肉腫細胞における RRV の感染効率、増殖効率、RRV 産生能の評価

いずれのヒトMSC(骨髄由来3株、脂肪由来1株、臍帯由来1株)においても骨肉腫細胞株に比べ、感染効率は2~15倍低く、増殖効率は10~25倍低かった。しかしウイルス量を増やす事で10cmディッシュ程度のスケールでも一度の感染で100%の効率を得られた。RRV産生能については、いずれのMSCにおいても腫瘍細胞株に比べ10倍以上低かった。

MSCの腫瘍細胞への遊走、RRV伝達効率の評価

骨肉腫細胞株へのMSC遊走能については、いずれのMSCも足場依存性及び非依存性の腫瘍遊走能を示した。さらにMSCから腫瘍細胞へのRRV伝達効率に関しては、いずれのMSCも腫瘍細胞にRRVを効率良く伝達することが明らかとなった。さらに接触共培養においては、Transwell plateを用いた培養(非接触共培養)に比べ、RRV伝達効率が格段に向上することが判明した。

以上の結果より、MSCをキャリアとしてRRVを癌に効率良く到達・分配させる技術のin vitroにおける原理証明ができた。

(2) 動物における有用性の検討

MSCの皮下腫瘍および肺転移腫瘍への集積、RRV伝達の評価

皮下腫瘍モデルにおける検討では、RRV-luc投与群では4週まで腫瘍内luc発現が見られなかった。一方、MSC/RRV-luc投与群では5匹全例で腫瘍内luc発現の継時的増強を認めた。以上の結果より、MSCをキャリアとしてRRVを癌に効率良く到達・分配させる技術のin vivoにおける原理証明ができた。

ヒト骨肉腫肺転移マウスモデルの作製

治療実験に用いる予定であったMG-63、MNNG-HOS細胞株では、ヌードマウスの肺に腫瘍形成を認めなかった。一方でマウスLM8細胞株を用いてモデル作製を試みたところ、全例で肺転移腫瘍形成を認めた。他のヒト細胞株でも検討を進めたところ、肺転移好発株の一つであるヒト143B細胞株でも肺転移を形成した。さらに143B細胞ではRRVによる感染増殖効率と殺細胞効果が高かった。したがって治療実験には143Bを用いた肺転移モデルを使用することにした。

ヒト骨肉腫肺転移マウスモデルを用いた治療実験

未治療群では、143B細胞投与後2週間でIVIS上肺野に腫瘍形成を認め始めた。さらに4週後以降には衰弱、体重減少を認め、77日目までに全例死亡した。一方、治療群では84日目まで全例生存し、体重減少等を認めなかった。このようにRRVを用いた癌自殺遺伝子療法はヒト骨肉腫肺転移マウスモデルにおいても高い抗腫瘍効果を示した。今後さらに検討を進めて行く。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamano Tomoki, Kubo Shuji, Sonoda Emiko, Kominato Tomoko, Kimura Kei, Yasuhara Michiko, Kataoka Kozo, Son Jihyung, Babaya Akihito, Takenaka Yuya, Matsubara Takaaki, Beppu Naohito, Ikeda Masataka	4. 巻 16
2. 論文標題 Assessment of circulating microRNA specific for patients with familial adenomatous polyposis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0250072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamano Tomoki, Kubo Shuji, Tomita Naohiro	4. 巻 9
2. 論文標題 A patient derived xenograft and a cell line derived from it form a useful preclinical model for small bowel adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 3337~3343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.2986	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 川邊 彩音、藤野 宏晃、園田 絵観子、竇田 徹、笠原典之、久保 秀司
2. 発表標題 骨肉腫に対する増殖型レトロウイルスベクターを用いた細胞死誘導型がんウイルス療法
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroaki Fujino, Emiko Sonoda, Lisa Isoda, Ayane Kawabe, Toru Takarada, Noriyuki Kasahara, Shuji Kubo
2. 発表標題 Suicide Gene Therapy Using Retroviral Replicating Vectors for Gastric Cancer
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Emiko Sonoda, Hiroaki Fujino, Ayane Kawabe, Toru Takarada, Shunsuke Noguchi, Noriyuki Kasahara, Shuji Kubo
2. 発表標題 Suicide gene therapy by retroviral replicating vectors for canine malignancies
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保 秀司、藤野 宏晃、川邊 彩音、園田 絵観子
2. 発表標題 増殖型レトロウイルスを用いた卵巣癌に対する自殺遺伝子治療
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Emiko Sonoda, Lisa Isoda, Hiroaki Fujino, Ayane Kawabe, Kosei Hasegawa, Noriyuki Kasahara, Shuji Kubo
2. 発表標題 Suicide gene therapy for ovarian cancer using retroviral replicating vector
3. 学会等名 第27回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuji Kubo, Lisa Isoda, Hiroaki Fujino, Emiko Sonoda, Kosei Hasegawa, Noriyuki Kasahara, Toru Takarada
2. 発表標題 Potential Utility Of Retroviral Replicating Vector-Mediated Prodrug Activator Gene Therapy For Human Ovarian Cancer
3. 学会等名 American Society of Gene & Cell Therapy 23rd annual meeting
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保秀司、磯田 莉沙、藤野 宏晃、園田 絵観子
2. 発表標題 骨肉腫に対する増殖型レトロウイルスベクターを用いた細胞死誘導型がんウイルス療法
3. 学会等名 第123回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuji Kubo, Tomoki Yamano, Kosei Hasegawa
2. 発表標題 Usefulness of suicide gene therapy for ovarian cancer using retroviral replicating vector
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuji Kubo, Hiroaki Fujino, Ayane Kawabe, Noriyuki Kasahara, Emiko Sonoda, and Toru Takarada
2. 発表標題 Suicide Gene Therapy Using Retroviral Replicating Vectors in an Experimental Model of Human Gastric Cancer
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuji Kubo, Misato Takagi-Kimura, Lisa Isoda, Hiroaki Fujino, Noriyuki Kasahara
2. 発表標題 Mesenchymal Stem Cells as Carriers of Retroviral Replicating Vectors for Cancer Gene Therapy
3. 学会等名 第22回米国遺伝子治療学会議(ASGCT 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuji Kubo, Hiroaki Fujino, Takao Morinaga, Masatoshi Tagawa, Noriyuki Kasahara
2. 発表標題 Development of human mesenchymal stem cells as tumor-homing cellular carriers for retroviral replicating vectors
3. 学会等名 第25回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保秀司、藤野 宏晃、笠原典之
2. 発表標題 間葉系幹細胞を運搬体として用いた増殖型レトロウイルスベクターの新規デリバリー法の開発
3. 学会等名 第26回日本遺伝子診療学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuji Kubo, Takao Morinaga, Tomoki Yamano
2. 発表標題 Mesenchymal stem cells as cellular vehicles to deliver retroviral replicating vectors for cancer gene therapy
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuji Kubo, Hiroaki Fujino, Noriyuki Kasahara
2. 発表標題 Human mesenchymal stem cells as tumor-homing cellular carriers of retroviral replicating vectors for cancer gene therapy
3. 学会等名 第27回欧州遺伝子細胞治療学会(ESGCT 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuji Kubo, Misato Takagi-Kimura, Lisa Isoda, Hiroaki Fujino, and Noriyuki Kasahara
2. 発表標題 Mesenchymal Stem Cells as Carriers of Retroviral Replicating Vectors for Cancer Gene Therapy
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第64回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroaki Fujino, Lisa Isoda, Emiko Sonoda, Noriyuki Kasahara, Shuji Kubo
2. 発表標題 Mesenchymal Stem Cells As Tumor-homing Cellular Carriers For Retroviral Replicating Vectors
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山野 智基 (Yamano Tomoki) (00599318)	兵庫医科大学・医学部・非常勤講師 (34519)	
研究分担者	萩谷 博之 (Futani Hiroyuki) (30248140)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
研究分担者	中込 隆之 (Nakagomi Takayuki) (80434950)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------