

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：32666
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21H03828
研究課題名（和文）高度オルガノイド技術を利用した革新的がん遺伝子治療モデリングと腫瘍溶解性機構解明
研究課題名（英文）Modeling of innovative oncolytic viral therapy and elucidation of the underlying mechanism using an advanced organoid technology
研究代表者
宮川 世志幸（Miyagawa, Yoshitaka）
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：90415604
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腫瘍溶解性ウイルス（OV）の腫瘍選択性機構と間葉系幹細胞（MSC）との併用療法における分子機構解明を目的として、がん免疫微小環境を高度オルガノイド技術によりin vitroで再構築し、遺伝子発現・動態・ウイルス-細胞間相互作用を詳細に究明する。本研究目的達成のために、MSCとがん細胞3次元共培養モデルを開発した。同モデルを用いて、特定の組織由来MSCは有意に腫瘍に対する遊走性が高いこと、ヒト各組織由来OV搭載hMSCsには動態・腫瘍殺傷性に大きな差があることを明らかとした。本研究成果は、OV-hMSCsの臨床応用を進める上で、治療効果の増強やプロセス開発に貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、腫瘍溶解性ウイルスの腫瘍選択性及び間葉系幹細胞併用療法の分子メカニズムが明らかとなれば、治療効果を改善するための最適なウイルスゲノム遺伝子改変、間葉系幹細胞ソース及び免疫チェックポイント阻害剤の選択が可能となり、より現実的ながんウイルス治療戦略が構築できる。また非臨床試験と実際の臨床での結果の解離は、現段階において遺伝子治療製剤の治療効果を適切に評価できる非臨床試験系は存在しないことを意味している。申請者らが今回提案するin vitro TIME再構成系はこのギャップを埋めるものであり、新たな有効性評価の指標となり得る。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we aim to elucidate the molecular mechanism of tumor selectivity of oncolytic viruses (OVs) and their combination therapy with human mesenchymal stem cells (hMSCs) by reconstructing the tumor immune microenvironment in vitro using advanced organoid technology and investigating gene expression, dynamics, and virus-cell interactions in detail. To achieve this objective, we developed a 3D co-culture model of hMSCs and cancer cells. Using this model, we demonstrated that hMSCs derived from a specific tissue have significantly higher migration capacity to tumors, and that the cell kinetics and tumor-killing ability of OV-loaded hMSCs depended of their origin. Our results are expected to contribute to the enhancement of therapeutic efficacy and the manufacturing process development of OV-hMSCs.

研究分野：遺伝子治療学

キーワード：オルガノイド がん遺伝子細胞治療 腫瘍溶解性ウイルス ヘルペスウイルス 間葉系幹細胞 がん免疫微小環境

1. 研究開始当初の背景

現在、従来法では治療が困難な進行性がん・難治性がんに対する画期的治療法として腫瘍溶解性ウイルスが脚光を浴びている。2015年にアメリカFDAで腫瘍溶解性ヘルペスウイルスベクター (oHSV) を用いた腫瘍溶解性ウイルス治療薬 Talimogene laherparepvec (T-VEC) が承認をされて以来、世界中で本製剤に非常に高い関心が寄せられている。一方、臨床試験における多くの腫瘍溶解性ウイルスの難治性固形腫瘍に対する治療効果は単独使用の場合、極めて限定的なものであった。このウイルス療法に対する治療抵抗性は、がん免疫微小環境におけるがん関連線維芽細胞などによる物理的障壁、腫瘍内不均一性、免疫抑制機構に起因するものと考えられている。これら治療抵抗性の克服は、現在がん遺伝子治療全体の共通課題となっている。我々グループは、T-VECのベースになっているHSVベクターの研究開発に長年従事し、数多くの遺伝子治療用・腫瘍溶解性HSVを世に送り出している (Kuroda S, Miyagawa Y*et al. Mol Ther Methods Clin Dev. 2020. Miyagawa Y et al. Mol Ther Methods Clin Dev. 2017. Miyagawa Y et al. PNAS. 2015)。これまでの本分野での研究経験を活かして、現在我々グループは腫瘍溶解性ウイルス Canerpaturev (C-REV) によるがん遺伝子治療研究を進めている。我々は上述の治療抵抗性解決を目指して、C-REV と腫瘍に対するホーミング活性のある間葉系幹細胞 (MSC) との併用療法を提案し、研究を進めている。腫瘍溶解性ウイルスをMSCに搭載することで、がん遺伝子治療の治療抵抗性の一因である免疫機構によるウイルスの不活化・排除を回避し、がん免疫微小環境における物理的障壁を乗り越え、腫瘍内部までウイルスを送達することが可能となる。我々は、本治療法は治療抵抗性を克服する有効な手段と考えており、早期の臨床応用実現に向けて研究を推進している。本革新的がん遺伝子治療法開発の実用化を達成する上で、解決すべき課題が2つ存在する。一つ目はC-REVの選択的腫瘍溶解性の分子機構解明、二つ目はがん遺伝子治療抵抗性機構解明である。これら作用機序の追求には、治療抵抗性の原因となっているがん免疫微小環境を再現した評価系が必要不可欠と考えられる。本研究では、がん免疫微小環境構築に近年急速な発展を遂げているオルガノイド3次元培養技術を応用することで、がん免疫微小環境を忠実に再現するヒトがんモデルを *in vitro* にて再構築することを試み、上記の課題解決に利用する。

2. 研究の目的

本研究では、我々が研究開発を進める革新的がん遺伝子治療法である腫瘍溶解性ウイルス C-REV の腫瘍選択性機構と間葉系幹細胞との併用療法の作用機序を、高度オルガノイド技術による *in vitro* 3D 腫瘍再構成系を用いた遺伝子発現解析・動態解析・細胞間及びウイルス-細胞間相互作用解析により明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 高度オルガノイド技術による *in vitro* がんモデルの確立

我々グループが習得している高度オルガノイド技術を応用して、どの細胞の組み合わせ・比率が *in vitro* 3D 腫瘍再構成系に必要な解明する。再構成系には Geltrex や Matrigel 等の基底膜マトリックスを用いる培養系と気相液相界面 (ALI) 培養系を足場として使用する。

(2) 各種ヒト組織由来 MSC に対する C-REV の特性解析

MSC は骨髄を含む様々な組織より単離可能であり、それぞれ性質が異なる事が報告されている。本研究では、いずれの組織由来 MSC が C-REV のキャリアとして適当か調べる。各組織由来 MSC に対する C-REV の感染能・細胞毒性・複製能を解析する。同時にがん細胞の殺傷性について *in vitro* 試験で解析し、それぞれ治療担体単独の場合と比較して MSC のキャリア細胞としての利用が有用か検討する。

(3) *in vitro* 3D 腫瘍モデルにおける C-REV 及び C-REV 搭載 MSC の動態・機能解析

C-REV の動態を観察するために、上記にて開発した *in vitro* 3D 腫瘍再構成系に C-REV を加え、がん細胞殺傷性・C-REV の増殖率を調べる。また *in vitro* 3D 腫瘍再構成系において、C-REV 搭載 MSC の動態を観察するために、MSC に蛍光タンパク質を導入してラベルし可視化する。ラベルした MSC を本モデルに導入し、がんオルガノイドへの走化性・浸潤を解析する。

(4) *in vitro* 3D 腫瘍再構成系におけるがん細胞-C-REV-MSC 間の相互作用解析

in vitro 3D 腫瘍再構成系における腫瘍細胞と MSC、C-REV、もしくは C-REV 搭載 MSC が惹起する様々な細胞の細胞間相互作用の変化を明らかにするために、*in vitro* 3D 腫瘍再構成系に C-REV もしくは MSC を加えた後、*in vitro* 3D 腫瘍再構成系に存在する腫瘍細胞とその他の細胞を分取する。その後、RNA-seq によって取得した遺伝子発現データを用いて、リガンドと標的遺伝

子の関係性をコントロールと解析することで、細胞間相互作用に起こる変化を推定する。各細胞における遺伝子発現変化に関与するシグナルを同定することで、治療によって各細胞に入力されたシグナルを推定する。

4. 研究成果

まず *in vitro* 3D 腫瘍再構成系のために、膵がん細胞株スフェロイド 3 次元培養モデル及び膵がん患者検体由来オルガノイドモデルの構築を試みた。膵がん細胞株を用いて、細胞数及び複数の基底膜マトリックス濃度等培養条件検討を試みた結果、最適なスフェロイド 3 次元培養モデルの確立に成功した(図 1)。一方、膵臓がん患者由来がん組織を用いて、膵臓がんオルガノイドの樹立を試みた。オルガノイド樹立には、組織片処理法や培養条件等様々な条件検討、マトリゲル等の基底膜マトリックスを用いる培養系と気相液相界面 (ALI) 培養系を足場として採用し、いずれが膵臓がんオルガノイド作製に適しているか検討を行なった。その結果、最適な組織片処理法・培養条件を確立し、基底膜については、いずれの培養法でも 3 次元培養下で腫瘍細胞の増殖を認める条件を設定した(図 1)。続けて、様々なヒト組織由来 MSC

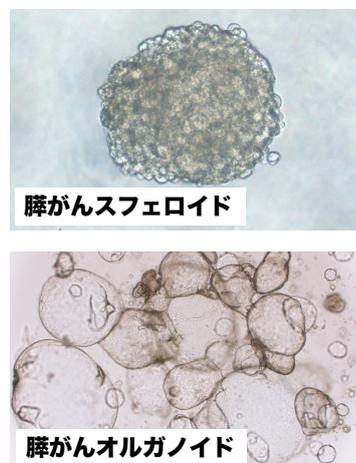


図 1. *in vitro* 3D 腫瘍再構成系の構築

について、キャリア細胞としての特性解析を行った。具体的には、2 次元培養下においてがんオルガノイドへの走化性・浸潤の解析を進めた。その結果、いずれの組織由来 MSC についても腫瘍特異的遊走性が認められること、また興味深いことに特定の組織由来 MSC は他の組織由来 MSC と比較して有意に腫瘍に対する遊走性が高いことが判明した。より生体内に近い環境である 3 次元培養下でヒト組織由来 MSC の特性解析を行うために、ヒト組織由来 MSC を蛍光タンパク質 GFP でラベルし、一方で腫瘍細胞を mCherry でラベル後、上記で開発した *in vitro* 3D 腫瘍再構成系とヒト組織由来 MSC の共培養モデルを開発した(図 2)。本モデルを用いて、ヒト組織由来 MSC の動態について共焦点レーザー顕微鏡を用いた詳細な経時的かつ定量的解析を行った。その結果、本共培養モデルにおいては蛍光ラベルされた MSC の動態が経時的にモニターできること、2 次元培養下同様に 3 次元培養下においても特定の組織由来 MSC は他の組織由来 MSC と比較して有意に腫瘍に対する遊走性が高いこと、一方でヒト線維芽細胞由来スフェロイドとの共培養系では遊走性を示さないことが判明した。またヒト各組織由来 MSC を用いた oHSV 搭載 MSC の作製及びがんオルガノイドモデルにおける動態観察を目的として、ヒト各組織由来 MSC に対する感受性を評価した。その結果、oHSV に対する感受性は由来組織によって大きく異なることがわかった。感受性の違いが何に起因するか解析するために、ヒト各組織由来 MSC に対する oHSV の感染性及びウイルス産生率を調査した。その結果、感染性は組織間で差は認められないが、ウイルス産生率には有意な差が認められた。以上のことから、oHSV に対する感受性の差は oHSV のウイルス産生率によるものと推察された。解明した各ヒト組織由来 MSCs の腫瘍に対する遊走性の差異が何に由来するか調べるために、がん 3D 培養モデルとヒト組織由来 MSC の共培養系における hMSC の遺伝子発現解析を行なった。同解析により、腫瘍に対する遊走性が高い骨髄由来 hMSCs に特徴的な遺伝子発現・活性化されたシグナル経路を同定することに成功した。現在、同定した遺伝子発現・活性化されたシグナル経路を阻害することによる影響を詳細に解析するとともに、腫瘍側の遺伝子発現解析も同時に行うことで、hMSC の腫瘍への特異的遊走性向上のメカニズムの解明を進めている。

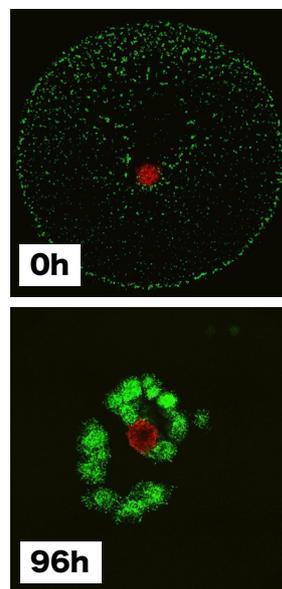


図 2. *in vitro* 3D 腫瘍-MSC 共培養モデル

赤：膵がん細胞、緑：MSC

次に、これまでに開発したがん培養モデルと hMSC の共培養系を用いて、oHSV 搭載ヒト組織由来 MSC (oHSV-hMSCs) の特性解析を進め、oHSV-hMSC のがんモデルにおけるウイルス動態、それによって惹起されるウイルス-細胞間相互作用の変化を解析することを目的とした。まず各ヒト組織由来 MSCs を用いた oHSV-hMSCs を作製し、その腫瘍殺傷性をがん 2D 培養モデルにて比較した(図 3)。その結果、oHSV 単

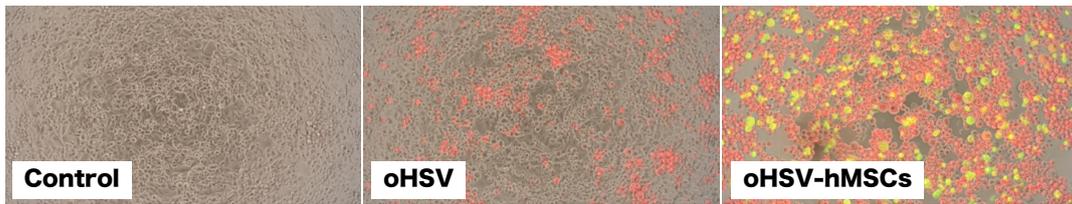


図3. oHSV-hMSC/腫瘍共培養モデル (2D)

赤：oHSV感染細胞、緑：MSC

独感染と比較し、hMSCs を用いた方が、効率的にウイルスを伝播し、有意に腫瘍殺傷性が高いことがわかった。続けて、がん 3D 培養モデルと oHSV-hMSCs の共培養系の開発に着手した。oHSV-hMSCs を 3D 腫瘍モデルに効率的に接着させるために、まず、oHSV-hMSCs と腫瘍細胞と hMSCs の数、培養方法、温度などの各種共培養条件を検討し、再現性高くモデル構築が可能な培養条件の設定に成功した。本モデルを用いて、oHSV-hMSCs の動態・腫瘍殺傷性を解析した (図 4)。その結果、oHSV 単独感染と比較し、oHSV-hMSCs においては oHSV の急速な感染拡大が認められ、殺傷能力も非常に高いことが明らかとなった。また組織間によって oHSV の感染拡大・腫瘍殺傷性が異なることがわかった。現在、本研究で開発した *in vitro* 3D 共培養モデルで解析した結果が、*in vivo* モデルでも再現されるか解析するために、マウス腺がんモデルに対する各ヒト組織由来 MSCs を用いた oHSV-hMSCs の投与試験を実施しており、本 *in vitro* 3D 共培養モデルの有用性について検証を推進している。

以上、本研究においては、革新的がん遺伝子治療法である腫瘍溶解性ヘルペスウイルスの腫瘍選択性機構と hMSCs との併用療法の作用機序を解明するために、高度オルガノイド技術による新規 *in vitro* 3D 腫瘍再構成系確立に成功した。本モデルを用いて、各ヒト組織由来 MSCs のキャリア細胞としての特性について検証し、hMSCs 遊走性に関わる特徴的な遺伝子発現・活性化されたシグナル経路を同定することに成功した。また本モデルを用いることで 3D 腫瘍モデルにおける oHSV-hMSCs の腫瘍殺傷性や oHSV 伝播について詳細にモニタリングできることを証明した。これらの研究成果は、腫瘍溶解性ウイルス C-REV の腫瘍選択性機構解明や hMSCs の腫瘍特異的遊走性機構解明といった学術的知見をもたらすに留まらず、oHSV-hMSCs 併用療法の臨床応用における oHSV キャリア細胞選択の際の hMSC 由来組織の重要性を示唆しており、今後 oHSV-hMSCs の臨床応用を進める上で、治療効果増強や oHSV-hMSCs 製造プロセス開発に大いに貢献することが期待される。



図4. oHSV-hMSC /腫瘍共培養モデル (3D)

赤：oHSV感染細胞、緑：MSC

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kuroda Seiji, Miyagawa Yoshitaka, Sukegawa Makoto, Tomono Taro, Yamamoto Motoko, Adachi Kumi, Verlengia Gianluca, Goins William F., Cohen Justus B., Glorioso Joseph C., Okada Takashi	4. 巻 26
2. 論文標題 Evaluation of parameters for efficient purification and long-term storage of herpes simplex virus-based vectors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Methods & Clinical Development	6. 最初と最後の頁 132-143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtm.2022.06.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshiyuki Yamazaki, Yuko Nitahara-Kasahara, Kai Miyazaki, Yoshitaka Miyagawa, and Takashi Okada.
2. 発表標題 Improvement of protocol for generation of vector-producing mesenchymal stem cells (VP-MSCs) from amniotic MSCs.
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (MBSJ2022).
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Makoto Sukegawa, Yoshitaka Miyagawa, Seiji Kuroda, Motoko Yamamoto, Kumi Adachi, Nobuhiko Taniai, Hiroshi Yoshida, Akihiro Umezawa, Mashito Sakai, Takashi Okada.
2. 発表標題 The functional analysis of human mesenchymal stem cells for cancer gene therapy.
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (MBSJ2022).
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒川将史、仁藤智香子、宮川世志幸、坂本悠記、高橋史郎、笠原優子、須田智、酒井真志人、岡田尚巳、木村和美.
2. 発表標題 一過性局所脳虚血モデルにおける iPSC由来間葉系幹細胞 (iMSC) の脳保護効果.
3. 学会等名 The 65th Annual Meeting of the Japanese Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋史郎 , 仁藤智香子 , 荒川将史, 久保田麻紗美, 須田智, 宮川世志幸, 笠原優子, 澤百合香, 酒井真志人 , 岡田尚巳, 木村和美.
2. 発表標題 ラット脳虚血モデルにおける羊膜由来間葉系幹細胞投与の脳保護効果.
3. 学会等名 The 65th Annual Meeting of the Japanese Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Seiji Kuroda, Yoshitaka Miyagawa, Makoto Sukegawa, Yuriko Sato, Yuka Oyama, Motoko Yamamoto, Kumi Adachi, Mashito Sakai, Goins WF, Cohen JB, Glorioso JC, and Takashi Okada.
2. 発表標題 Impacts of purification and storage methods on the yield and functionality of oncolytic herpes simplex virus.
3. 学会等名 The 28th Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy (JSGCT2022).
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshitaka Miyagawa, Gianluca Verlengia, Yukage Kobari, Fang Han, Ryotaro Hashizume, Michele Simonato, Akihiro Umezawa, Justus B. Cohen, and Joseph C. Glorioso.
2. 発表標題 A non-cytotoxic herpes simplex virus vector provides standalone inducible co-expression of four cellular reprogramming factors.
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (MBSJ2021).
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Makoto Sukegawa, Yoshitaka Miyagawa, Seiji Kuroda, Motoko Yamamoto, Kumi Adachi, Nobuhiko Taniai, Hiroshi Yoshida, Akihiro Umezawa, Mashito Sakai, Takashi Okada.
2. 発表標題 The comparison between human mesenchymal stem cells from different sources for oncolytic viral therapy.
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (MBSJ2021).
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshiyuki Yamazaki, Yuko Nitahara-Kasahara, Kai Miyazaki, Yoshitaka Miyagawa, Takashi Okada.
2. 発表標題 Functional characterization of vector-producing amniotic mesenchymal stem cells (VP-AMSCs) generated by optimized electroporation protocols.
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (MBSJ2021).
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒田 誠司, 宮川 世志幸, 助川 誠, 酒井 真志人.
2. 発表標題 遺伝子治療目的の高品質無毒化ヘルペスウイルス(HSV)ベクター精製方法および保管条件の検討.
3. 学会等名 第 89 回 日本医科大学医学会総会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Makoto Sukegawa, Yoshitaka Miyagawa, Seiji Kuroda, Motoko Yamamoto, Kumi Adachi, Nobuhiko Taniai, Hiroshi Yoshida, Akihiro Umezawa, Mashito Sakai, Takashi Okada.
2. 発表標題 Biological and functional characterization of human mesenchymal stem cells derived from different sources for cancer gene therapy.
3. 学会等名 The 27th Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy.
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 3. 宮川 世志幸	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日医大医学会誌	5. 総ページ数 2
3. 書名 遺伝子治療の最前線 AAVベクター遺伝子治療の躍進と課題	

1. 著者名 宮川 世志幸	4. 発行年 2022年
2. 出版社 昆虫細胞を活用したウイルスベクター製造技術開発	5. 総ページ数 9
3. 書名 PHARMSTAGE	

1. 著者名 宮川 世志幸	4. 発行年 2021年
2. 出版社 遺伝子細胞治療における間葉系幹細胞の利用	5. 総ページ数 6
3. 書名 別冊 医学のあゆみ	

〔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	小池 博之 (Koike Hiroyuki) (20821771)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授 (32666)	
研究分担者	酒井 真志人 (Sakai Mashito) (40643490)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	

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
---------	---------