

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 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591606

研究課題名（和文） 腫瘍融解型センダイウイルスを用いた脳腫瘍特異的な免疫遺伝子治療

研究課題名（英文） Oncolytic Sendai virus for brain tumor-specific immune-gene therapy

研究代表者

岩立 康男 (IWADATE YASUO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：70272309

研究成果の概要（和文）：

センダイウイルスの出芽に必要な M タンパクを欠失させ(SeV/ M)、細胞融合に必要な F タンパクをグリオーマ細胞において高発現が確認されている urokinase-type plasminogen activator (uPA) によって開裂し活性型となるように改変した新規の腫瘍融解ウイルスを作製した。このウイルスベクターにインターフェロンβ (IFN-β) 遺伝子を搭載することにより (SeV/ M-IFN)、遺伝子導入効率を損なうことなく樹状細胞を活性化し、強力な抗腫瘍免疫が誘導されることが示された。治療後 2 週間目に脳を摘出し、CD8 T cell、CD4 T cell、CD11b+マクロファージの浸潤を免疫組織化学により検討したところ、これらの細胞の著大な浸潤増加を認めた。また、その分子機構として、樹状細胞の活性化を促す Flt3 ligand の発現増強を確認した。

研究成果の概要（英文）：

Glioblastoma (GM) is highly invasive due to the expression of proteases including urokinase-type plasminogen activator (uPA). A new recombinant Sendai virus (rSeV) showing uPA-specific cell-to-cell fusion activity [rSeV/dMFct14 (uPA2)] was shown to be effective for GM treatment, especially with the interferon-β (IFN-β) gene integration. There were marked infiltration of CD8 T cell, CD4 T cell, and CD11b+ cells in the brain tumor tissues. Flt3-L was also highly positive in the tumor tissues treated with rSeV/dMFct14 (uPA2)/ IFNβ, which was considered to be the molecular background of the prominent immunogenicity. There were no adverse events observed in the long-survived rats. Therefore, these results suggest that rSeV/dMFct14 (uPA2)/ IFNβ may have a significant potential to improve the survival of GM patients in a clinical setting.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍学、ウイルス療法、腫瘍特異的免疫、インターフェロン、遺伝子組み換え

1. 研究開始当初の背景

代表的脳腫瘍であるグリオーマは、切除困難な脳に浸潤性に発育し、また放射線・化学療法に抵抗性であることから、極めて治癒を得ることが難しい難知性腫瘍である。近年、臨床の場に導入された新規抗がん剤テモゾロミドは、最悪性型のグリオブラストーマに対し初めて有意な生存期間の延長をもたらしたが、それでも生存期間中央値は1年半程度であった(Stupp, 2005)。特に腫瘍細胞と正常神経細胞が混在する浸潤域の治療を考えると、現有の可及的切除術と放射線治療・化学療法を主体とした治療戦略は強い中枢神経毒性につながる可能性がある。腫瘍特異的免疫監視機構を強化する免疫学的治療が理論的に優れた方法であると思われる。一方で、中枢神経系は免疫学的寛容の場として知られており、抗原提示が不十分かつ免疫担当細胞の浸潤も起こりづらい部位として知られている。

そこで我々は、免疫学的寛容の場に発生した膠芽腫を皮下ワクチンとして全身の免疫システムに認知させ腫瘍特異的な細胞障害性 T リンパ球を誘導するとともに、この T リンパ球を、腫瘍内で IL-2 などのサイトカインを発現させることにより効率よく脳腫瘍内に集積させることを目指した治療実験を行ってきた(Iwadate, 2005)。この免疫学的遺伝子治療により、これまでの文献上治癒を得ることが困難であった生着ラット脳腫瘍の約 30%を治癒させることに成功した。しかし、この結果は、脳以外の場所で誘導された腫瘍特異的 T リンパ球を用いた場合、脳腫瘍局所でリンパ球遊走作用を有するサイトカインを分泌させても、治癒が得られる確率は低いことを示している。また、このワクチン接種ラットは、その後の腫瘍細胞再移植に対し皮下では完全に拒絶するが、脳内では増殖抑制に止まることも示された(Iwadate, 2001)。脳腫瘍局所における抗原提示を増強することが、腫瘍特異的 T リンパ球を効果的に集積させる有効な方法である可能性が高いと考えられる。我々は、遺伝子導入効率が高く、細胞質のみウイルスゲノムを複製するセンダイウ

イルスベクターの開発を行ってきた。ウイルススタンパクのうち、出芽に必要な M タンパクを欠失させ(SeV/dM)、細胞融合に必要な F タンパクをグリオーマ細胞において高発現が確認されている urokinase-type plasminogen activator (uPA) によって開裂し活性型となるように改変した新規の腫瘍融解ウイルスを作製した[rSeV/dMFct14 (uPA2)/ IFN β]。このベクターに感染した細胞は uPA 存在下で細胞融合を繰り返し、最終的にアポトーシスに至る。センダイウイルスベクターは血球系細胞にも高い効率で感染し、特に樹状細胞に対し、他のウイルスベクターを大きく上回る遺伝子導入効率を示した(Shibata, 2006)。同時にこのベクターは、樹状細胞の抗原提示能を向上させることも明らかとなった(Yoneyama, 2007)。さらに、種々の免疫反応を増強する作用を有するインターフェロン β (IFN- β) 遺伝子を搭載することにより、遺伝子導入効率を損なうことなく樹状細胞を強力に活性化することも証明された(Shibata, 2006)。

2. 研究の目的

脳は免疫学的寛容の場として知られ、抗原提示が不十分であると同時に、免疫担当細胞の集積を得づらい組織である。したがって、皮下ワクチンなどによって腫瘍特異的な細胞障害性 T リンパ球が誘導されても、十分な治療効果を得ることが困難であった。我々は、すでに臨床応用されているセンダイウイルスベクターが、抗原提示細胞に対して強力なアジュバントとして作用することを証明してきた。今回、このベクターを改変して、腫瘍細胞特異的に細胞融合とそれに引き続く細胞死を誘導しうる腫瘍融解ウイルスを作製した。これを脳腫瘍内に投与することにより、効率よく細胞死を起こすと同時に、脳腫瘍局所で有効な抗原提示をもたらすことにより、効率よく免疫機構を動員して腫瘍拒絶に結びつく可能性がある。本研究の目的は、この組換えセンダイウイルスベクターを脳腫瘍内に投与することにより、脳内で強力な抗原提示を誘導し、かつ効率よく脳腫瘍局所に腫瘍特異的 T リ

ンパ球を集積できることを証明することにある。最終的なエンドポイントは、脳腫瘍モデルラットの生存期間延長であり、同時に安全性を確認し、将来的な臨床応用につなげることを目指して研究を行う。

3. 研究の方法

Fisher rat-9L gliosarcoma の系による脳腫瘍モデルを作製し、一定期間の後に rSeV/dM Fct14 (uPA2)/ IFN β による治療を行い、その効果と安全性を確認する。治療効果については、(1) 生存期間・治癒率、(2) 7テスラ動物専用 MRI (放射線医学総合研究所) による腫瘍体積の経時的変化の観察、(3) ^{51}Cr release assay による腫瘍特異的細胞障害性 T リンパ球誘導の定量、(4) 摘出脳における免疫担当細胞浸潤の量やマイクログリアの活性化、免疫関連分子発現に関する免疫組織化学、などにより行い、安全性の確認には、(1) 脳を含め種々の臓器を摘出し、その病理組織検査を行う、(2) 神経症状発現などをモニターする。

4. 研究成果

センダイウイルスタンパクのうち、出芽に必要な M タンパクを欠失させ(SeV/dM)、細胞融合に必要な F タンパクをグリオーマ細胞において高発現が確認されている urokinase-type plasminogen activator (uPA) によって開裂し活性型となるように改変した新規の腫瘍融解ウイルスを作製した [rSeV/dMFct14 (uPA2)]。このウイルスベクターにインターフェロン β (IFN- β) 遺伝子を搭載することにより [rSeV/dMFct14 (uPA2)/ IFN β]、遺伝子導入効率を損なうことなく樹状細胞を強力に活性化することを証明した。これを 9L-gliosarcoma 細胞によるラット脳腫瘍モデルの脳腫瘍局所に投与すると 100%の治癒が得られた。また、Standard ^{51}Cr release assay により、腫瘍特異的細胞障害性 T リンパ球が通常の皮下ワクチン療法よりも強力に誘導されていることが示された。免疫学的寛容の場である脳においても、センダイウイルスを活用することにより強力な抗腫瘍免疫が誘導されることが示された。治療後 2 週間目に脳を摘出し、CD8 T cell、CD4 T cell、CD11b+マクロファージの浸潤を免疫組織化学により検討したところ、これらの細胞の著名な浸潤

増加を認めた。また、免疫機構活性化の分子機構として、樹状細胞の活性化を促す Flt3 ligand の発現増強を確認した。長期生存ラットにおいて、神経症状の出現、体重の異常変化、臓器異常などはいずれも認められず、また MRI 検査にて脳浮腫の所見もなかったことより、その安全性も確認された。

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 4 件)

1. Autologous antibody to src-homology 3-domain GRB2-like 1 specifically increases in the sera of patients with low-grade gliomas. Matsutani T, Hiwasa T, Iwadate Y (7th of 7). J Exp Clin Cancer Res 31, 査読有, 85-96, 2012.
2. Gene expression signature-based prognostic risk score in patients with primary central nervous system lymphoma. Kawaguchi A, Iwadate Y, Yamanaka R (2nd of 15). Clin Cancer Res 18, 査読有, 85-96, 2012.
3. Functional similarity of anticancer drugs by MTT bioassay. Hiwasa T, Takiguchi M, Iwadate Y (8th of 13). J Cancer Sci Ther 3, 査読有, 250-255, 2011
4. Urokinase-targeted fusion by oncolytic Sendai virus eradicates orthotopic glioblastomas by pronounced synergy with interferon- β gene. Hasegawa Y, Iwadate Y, Ueda Y (3rd of 15). Mol Ther 18, 査読有, 250-255, 2010.

[学会発表] (計 3 件)

1. Koto M, Hasegawa A, Takagi R, Sasahara G, Ikawa H, Kamada T, Iwadate Y, Matsutani M. Carbon ion radiotherapy for skull base and paracervical chordomas. 17th Annual Meeting of The Society of Neuro-Oncology, Washington DC (USA), 2012/11/15~2012/11/18 (poster)
2. 岩立康男、篠崎夏樹、池上史郎、松谷智郎、佐伯直勝. シグナル伝達系タンパク抗体アレイによる膠芽腫の新規予後因子. 第 71 回日本脳神経外科学会学術総会. 2012. 10. 17. (大阪) (シンポジウム)
3. Iwadate Y. Proteomics and immunological screening in gliomas. World Cancer Congress-2011. 2011.5.22-25, Dalian, China, (Invited Lecture)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩立 康男 (IWADATE YASUO)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：70272309

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：