

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592203

研究課題名(和文) 生物医薬品としての肉腫標的化腫瘍溶解性ウイルスの開発

研究課題名(英文) Development of an oncolytic virus targeting sarcoma as a biological agent

研究代表者

山村 倫子 (Yamamura, Hisako)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：50342994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：臨床ロット製造のため、d12.CALPf_{RR}と固形腫瘍の腫瘍内低酸素環境を標的化し得る新規腫瘍溶解性HSV-1ウイルスd12.ODD_{RR}について、生物学的評価試験が終了したウイルス産生細胞であるVeroデザイナー細胞において、特異的で安定した標識遺伝子発現を示す単一クローンを限界希釈法により精製した。Fisherラットに移植可能な悪性線維性組織球腫を用いて、免疫能をもつ実験動物モデルで、精製d12ODD_{RR}とd12.CALPf_{RR}ウイルスの効力試験を行い抗腫瘍効果を確認した。ヒト肉腫初代培養細胞を用いて継代可能なスフェロイド培養系を樹立し、RNA発現解析と薬物治療への感受性を検討した。

研究成果の概要(英文)：d12.CALPdeltarr and d12.ODDdeltarr were purified using a Vero designer cells which were carried out biological safety evaluation. Those two oncolytic HSV-1 viruses were tested their anti-tumor activity using malignant fibrous histiocytoma (MFH) which can be maintained in immuno-competent Fisher rats.

We established 3D-spheroids cultures of human primary sarcoma cells, analysed RNA expression and tested their sensitivity to anti-tumor drugs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：腫瘍溶解性ウイルス カルポニン 肉腫 中皮腫

1. 研究開始当初の背景

難治性肉腫は、若年者にも多発し化学療法や分子標的治療に感受性のある一部の症例を除いて標準的治療法と呼べるものが未だなく、患者やその家族、治療に携わる医師など新治療法の開発を切望する社会的要請が強い。

世界的にみてもこれまで治療法のなかった平滑筋肉腫などの難治性肉腫に対する新治療法の開発を目指して、研究代表者と研究分担者である高橋らは、遺伝子操作で、カルポニン遺伝子を発現する肉腫細胞を標的化して破壊する新規腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス (HSV-1) (d12CALP ΔRR) を用いた遺伝子治療法を開発した (特許技術)。

研究の全体構想は、この肉腫標的化ウイルスの速やかかつ適切な実用化・臨床応用をはかるために、安全性評価や生物学的評価試験の基準を満たす臨床試験用ロットを製造することである。

2. 研究の目的

研究代表者らが開発した腫瘍溶解性HSV-1 は、DNA ウイルスの複製に必須なRibonucleotide reductase (RR) またはThymidine kinase (TK) を欠失している。これらの酵素は正常細胞では増殖時にのみ発現するが、肉腫を含む腫瘍細胞では構成的に発現している。したがって、このHSV-1 ウイルス変異体は増殖細胞や腫瘍細胞に感染した場合にだけ、細胞由来のRR やTK を利用して複製することができるため細胞溶解作用を示す。カルポニン遺伝子は、本来は最終分化した増殖しない平滑筋細胞に発現しているため、1) RR またはTK を欠失し、2)カルポニン遺伝子のプロモーターによって複製が開始されるようなHSV-1 ウイルス変異体を作製すれば、正常な平滑筋には影響を与えず、カルポニンを発現しかつ増殖する肉腫細胞のみを選択的に破壊できるはずである。研究代表者らは、これまでの研究において、HSV-1 ウイルスの基本転写因子 (ICP4)

の合成を制御する方法によってこれを実験的に証明し、マウスにおける安全性を確認した (Yamamura et al. Cancer Res. 61, 3969-3977, 2001)。

しかし、腫瘍溶解性ウイルス遺伝子治療剤やウイルスワクチンは、生物医薬品であるため塩基配列置換によりウイルス遺伝子の変化がおこる可能性があり、これまで医薬品としての製品出荷時の規格試験で規格を統一することが困難であるという問題点があった。

特に、Vero 細胞やPER.C6 細胞などの哺乳動物細胞を使って増殖させ、バルクで精製されたウイルスは、ゲノムDNA の塩基配列が異なるウイルスの混合体である。したがって、生物薬剤としての規格を統一するためには、均一なゲノムDNA をもつウイルスを大量に増幅する必要がある。そのための最も一般的な方法は、ウイルスDNA の増幅を哺乳動物細胞の系からプラスミドを用いた大腸菌の系に変換することであり、最近、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、EB ウイルス、アデノウイルスのゲノムDNA についてBACmidを用いた大腸菌での増幅方法が開発されている。しかし、これらの従来技術では、ウイルスゲノムの制限酵素処理、標識遺伝子の挿入、相同組み換え用ベクターの構築など多段階の工程が必要であるため、煩雑で時間を要するという欠点があった。

最近研究代表者らは、カルポニン発現にかかわらない全ての肉腫や癌を対象にした腫瘍内の低酸素環境を標的化し得る次世代の腫瘍溶解性HSV-1 (d120DD ΔRR) を開発した (特許出願済み)。d120DD ΔRR (HSV-1) とそれより大きなゲノムサイズをもつカルポニン標的化HSV-1、d12CALP ΔRR について、本研究では、製剤化に適したより均質なゲノムをもつウイルスを製造することを目的とする。

3. 研究の方法

BACmid (6875bp) とサイトメガロウイルス

のプロモーター/エンハンサー (589bp)、挿入を確認するための標識遺伝子としてDsRED 遺伝子(678bp)、ポリA 配列(6bp)をFlp recombinase の認識配列であるFRT 配列(34bp)ではさんだDNA (8453bp) の両端にウイルスゲノムとの相同配列(3000bp)を配した全人工合成DNA (14453bp)を作成した。この合成DNA は環状のBACmid として大腸菌内で増幅させることが可能で、また、相同組み換え時には1回のClaI 制限酵素処理により直鎖状の相同組み換えベクターとして用いることができるようデザインした。これにより、この新規HSV-1BACmid 挿入ベクターにより、従来の組換え法に比し簡便で、迅速なBACmid へのウイルスゲノムの挿入が可能になることが予想される。

また、臨床の状況により近い免疫能をもつ実験動物(Fisherラット)を用いて、ラットの自然発症肉腫である悪性線維性組織球腫に対する効力試験を実施する。

4. 研究成果

(1) ウイルス臨床ロット製造のため、d12. CALPf Δ RR と固形腫瘍の腫瘍内低酸素環境を標的化し得る新規腫瘍溶解性HSV-1ウイルスd12. ODD Δ RRについて、既に製造済みで米国での生物学的評価試験(安全性試験)が終了したウイルス産生細胞であるVeroデザイナー細胞において、特異的で安定した標識遺伝子発現を示す単一クローンを限界希釈法により精製した。

(2) Fisher ラットに移植可能な悪性線維性組織球腫(未分化多形性肉腫)を用いて、免疫能をもつ実験動物モデルで、精製 d12ODD Δ RR と d12. CALPf Δ RR ウイルスの効力試験を行い抗腫瘍効果を確認した。

(3) d12. CALPf Δ RR と d12ODD Δ RR のそれぞれのウイルスについて複数のクローンからウイルスゲノムDNAを大腸菌で Maxi-prep して精製し、ショットガンシーケンス法で、

ヘルペスウイルスゲノムの繰り返し配列を除く塩基配列を決定した。

(4) d12. CALPf Δ RR の抗腫瘍効果を高め、クローンの安定性を高めるために d12. CALPf Δ RR ウイルスのRRを温存した変異体を作製するため、これまでBACへのクローニンサイトとして外来遺伝子の挿入を確認し得たUL3とUL4の領域のそれぞれ3kbの相同配列に挟まれた-4F2enhancer-calponin1 promoter-ICP4- IRES -EGFP-の配列を含む相同組換えベクターを全人工合成するためにデザインした。

(5) ヒト明細胞肉腫と平滑筋肉腫、悪性末梢神経鞘腫の再発転移腫瘍から樹立した培養細胞を用いて継代可能なすフェロイド培養系を樹立し、RNA 発現解析を行い、薬物治療への感受性を検討した。

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 2件)

(1) Yamamura H., Takahashi K., Development of incurable cancer cell targeted agents using viral technology, 133, 297-303, 2013 査読有

(2) 高橋克仁、山村倫子、悪性中皮腫の遺伝子治療；腫瘍溶解性ウイルスによる次世代のがん遺伝子治療、呼吸器内科21, 518-523, 2012 査読無

[学会発表] (計 5件)

(1) 高橋克仁、山村倫子他、キュアサルコームボード共同治療連携：病院間“水平”連携による肉腫・GISTの集学的治療、第51回日本癌治療学会、2013年10月25日、京都

(2) 山村倫子、高橋克仁、シンポジウム；ウイルス工学を応用した難治がん標的医薬の開発、第132回日本薬学会年会、2012年3月31日、札幌

(3) 山村倫子、高橋克仁他、ICP4の発現制御腫瘍溶解性ヘルペスウイルスの臨床ロット製造用Veroデザイナー細胞のバンキング、

第71回日本癌学会総会、2012年9月19日、札幌

(4) 山村倫子、高橋克仁他、GISTにおけるがん幹細胞マーカーCD133とBmi1の発現、第50回日本癌治療学会、2012年10月25日、横浜

(5) 高橋克仁、山村倫子他、KITのホモ/ヘミ型変異；GIST 249症例におけるその頻度、転移、悪性化の指標について、第50回日本癌治療学会、2012年10月26日、横浜

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山村 倫子 (Yamamura Hisako)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：50342994

(2) 研究分担者

高橋 克仁 (Takahashi Katsuhito)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：40211338

(3) 連携研究者 無し