

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24300340

研究課題名(和文) マイクロRNAを指標にして癌幹細胞を標的破壊する抗癌ウイルス療法の新戦略

研究課題名(英文) Novel cancer therapy using microRNA-regulated oncolytic viruses targeting cancer stem cells

研究代表者

中村 貴史 (Nakamura, Takafumi)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70432911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)： 現在世界中において、生きたウイルスを利用して癌を治療する癌ウイルス療法に関する臨床試験が積極的に行われている。これは、ウイルスが本来持っている癌細胞に感染後、癌組織内で増殖しながら死滅させるという性質を利用する方法である。

本研究では、癌幹細胞の制御にmiRNA (let7) の発現低下が重要な役割を果たすことに注目し、これを指標にして癌幹細胞を根絶する新しい癌ウイルス療法を提案した。純国産ワクシニアウイルスのワクチン株に改良を加えた遺伝子組換えウイルス(MDVV)は、マウス担癌モデルにて強力な抗癌効果と高い安全性を示すと同時に、IL-12発現武装化MDVVは抗癌効果を増強することを実証した。

研究成果の概要(英文)： Oncolytic viruses are promising therapeutic agents for cancer and are currently under clinical investigation. The virotherapy is novel strategy that viruses infect and replicate within tumor cells, directly lysing and killing them.

In this study, we have developed that microRNA (miRNA) regulation enables tumor-specific viral replication by altering the expression of a targeted viral gene of an attenuated vaccinia virus vaccine strain. We used miRNA-based gene regulation to suppress B5R expression through let-7, a miRNA that plays important roles in cancer stem cells through the downregulation of let-7 expression. The miRNA-regulated vaccinia virus (MDVV) achieved efficient viral replication and oncolysis in cancer cells, but elimination of unwanted replication and associated toxicity in normal cells in vivo. Furthermore, the MDVV armed with IL-12 enhanced its anti-tumor effects.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：癌 ウイルス療法 トランスレーショナルリサーチ 遺伝子治療 バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

欧米を中心に現在世界中において、生きたウイルスを利用して癌を治療する抗ウイルス療法に関する前臨床研究、及び臨床治験が積極的に行われている。これは、ウイルスが本来持っている癌細胞に感染後、癌組織内で増殖しながら死滅させるという性質(腫瘍溶解性)を利用する方法である。一方、このウイルス療法におけるキーポイントは、正常組織に対するウイルス病原性をいかに排除するかという点にある。

純国産ワクシニアウイルスワクチン株は、4半世紀前の日本国内で痘瘡ワクチンとして使われ、高い安全性が証明されている。一方国内外において、このウイルスを用いた癌治療法に関する研究開発の報告はない。本研究では、この高い安全性に注目し、遺伝子組換え技術により改良を加え、“純和製抗ウイルス製剤”として活用する。これまで、マイクロRNA(miRNA)制御機構による遺伝子発現調節と同調させることによって、ウイルスの伝播増殖に重要な役割を果たすウイルス膜蛋白B5Rを、癌細胞では発現させる(=ウイルスは増殖する)が、正常細胞ではB5Rを発現させない(=ウイルスは増殖しない)ようにワクチン株を改良し、ヒト膵臓癌細胞を移植したマウス腹膜播種モデルにおいて強力な腫瘍溶解性による抗癌効果と高い安全性を実証してきた。

さらに、このmiRNA制御に加え、ウイルスTK遺伝子を欠失させた多因子制御ワクシニアウイルス(MDVV)では、ウイルスの腫瘍特異性がさらに向上し、より効果的で安全な抗ウイルスとして期待している。これは、ウイルスTK遺伝子が機能を失うと、正常細胞におけるウイルスの増殖能は低下するが、癌細胞にはこの遺伝子の機能を補う酵素が豊富に存在するためウイルスの増殖能は低下せず、結果的に腫瘍特異性が向上したためである。

2. 研究の目的

本研究では、現行の治療法に抵抗性を示す癌幹細胞に焦点を当て、その自己再生能や発癌性の制御にmiRNA(let7)の発現低下が関わっていることに注目し、これを指標にして癌幹細胞を根絶する新しい抗ウイルス療法の確立を目指す。

(1)マウス癌細胞を用いた同系移植腫瘍モデルにおいてMDVVの抗癌効果と安全性を検討する。

(2)癌免疫療法との併用によってMDVVの抗癌効果を増強できるかどうか検討する。

(3)臨床応用を視野に入れMDVVのGMP製造や品質管理に関する基盤技術を構築する。

3. 研究の方法

(1)マウス肺癌細胞TC1より、その内因性let7aをDecoy RNAによって特異的かつ長期

的に抑制したTC1-let7aKD細胞を作製した。C57BL/6マウスの右腹側の皮下にTC1、又はTC1-let7aKD細胞を移植した同系移植腫瘍モデルを作成し、その腫瘍直径が0.6cmに到達した時、 10^7 pfuのMDVVを尾静脈より全身投与した。

(2)癌免疫療法との併用によってMDVVの抗癌効果を増強するため、マウス由来サイトカインGM-CSF、又はIL-12遺伝子を発現するように組込んだMDVV-GMCSF、又はMDVV-IL12を作製した。マウス大腸癌MC38細胞を同系C57BL/6マウスの両側の皮下に移植したマウス担癌モデルにおいて、Mock(生理食塩水)、MDVV、MDVV-GMCSF、又はMDVV-IL12を右側の腫瘍内にのみ投与し、抗癌効果(腫瘍発育抑制効果)を評価した。

(3)MDVVの臨床応用に向けて、ウイルス製剤のGMP製造法と品質管理システムのための基盤技術を構築するため、I)細胞の大量培養工程、II)ウイルスの増殖・回収・抽出工程、III)精製工程からなるGMP製造工程の最適条件を検討した。

4. 研究成果

(1)let7aの発現が低下しているTC1-let7aKD腫瘍モデルにおいて、MDVVの腫瘍特異的増殖が確認でき、さらに生理食塩水を投与したコントロール群と比べMDVV投与群では著明な腫瘍発育抑制効果が見られた。それに対し、TC1腫瘍モデルにおいては、MDVVの腫瘍特異的増殖は見られず、コントロール群と比べ腫瘍発育抑制効果も示さなかった。以上の結果は、let7aの発現が低下する癌幹細胞をMDVVの血中を介した全身投与によって標的破壊する本アプローチの妥当性を示すものである。

(2)MDVV、又はMDVV-IL12を投与した右側の腫瘍増殖抑制効果はMockと比較して有意に見られたが、各ウイルスの間で有意な差はなかった。それに対し、ウイルスを投与しない左側の腫瘍増殖はMDVV-IL12による有意な抑制が見られた。以上より、ウイルスを投与した右側の腫瘍増殖抑制効果は、ウイルス間で差がないため、ウイルス増殖による腫瘍破壊に因るものと考えられた。一方、投与しない左側の腫瘍増殖は、IL12発現ウイルスによって最も有意に抑制されているため、NK細胞を活性化する・Tリンパ球に作用しTh1タイプの免疫反応を誘導し腫瘍に対する細胞性免疫を増強するIL-12に因るものと考え、免疫学的解析を進めている。

(3)MDVVを効率良く産生するために、工程I)では宿主細胞の決定、工程II)では感染時の細胞密度、ウイルス量、及びウイルス感染細胞の培養時間の最適条件を決定した。

一方、MDVVの品質管理のために、ウイルスに挿入したmiRNA標的配列のシーケンス解析、ウイルスゲノムの制限酵素切断による解析、外来治療遺伝子の発現解析によって、ウイルスの品質を評価する検定法を確立した。

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3件)

1. Ohashi T, Nakamura T, Kidokoro M, Zhang X, and Shida H. Combined Cytolytic Effects of a Vaccinia Virus Encoding a Single Chain Trimer of MHC-I with a Tax-Epitope and Tax-Specific CTLs on HTLV-I-Infected Cells in a Rat Model. *BioMed Research International*. 2014: 902478, 2014 (査読有)
2. Lech PJ, Pappoe R, Nakamura T, Russell SJ. Antibody neutralization of retargeted measles viruses. *Virology* 454-455: 237-246, 2014 (査読有)
3. Miyamoto S, Inoue H, Nakamura T, Yamada M, Sakamoto C, Urata Y, Okazaki T, Marumoto T, Takahashi A, Takayama K, Nakanishi Y, Shimizu H and Tani K. Coxsackievirus B3 Is an Oncolytic Virus with Immunostimulatory Properties that Is Active Against Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res.* 15: 2609-2621, 2012 (査読有)

[学会発表](計18件)

1. 中村 貴史. 新たながん治療の扉を開く腫瘍溶解ウイルスの最前線～難治性がんを標的破壊する遺伝子組換えワクシニアウイルスによる全身性がんウイルス療法の開発. 第74回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市), 2015/10/9
2. Horita K, Nakatake M, Goto I, Yamane M, Okazaki M, Parada R, Kurosaki H and Takafumi Nakamura. Identification of host factors required for enhancing replication and spread of oncolytic vaccinia virus. The 21th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy. 大阪国際会議場(大阪府・大阪市), 2015/7/25
3. Nakatake M, Yamane M, Parada R, Horita K, Okazaki M, Hasegawa K, Miyara A, Fujiwara K, Kurosaki H and Takafumi Nakamura. Enhancing tumor specificity and therapeutic index of oncolytic vaccinia virus through deletions of both VGF and O1 protein genes. The 21th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy. 大阪国際会議場(大阪府・大阪市), 2015/7/25
4. Takafumi Nakamura. Tumor-specific, replication-competent vaccinia virus for systemic oncolytic virotherapy. The 21th Annual Meeting of Japan

Society of Gene Therapy. 大阪国際会議場(大阪府・大阪市), 2015/7/25

5. Takafumi Nakamura. Deletions of both vaccinia growth factor and O1 protein genes enhance therapeutic index of oncolytic vaccinia virus. 9th International Conference on Oncolytic Viruses As Cancer Therapeutics. Boston, USA, 2015/6/15
6. 中村 貴史. 純和製ワクシニアウイルスを用いた難治がんに対するウイルス療法の開発(招待講演). 第23回遺伝子治療推進産学懇話会. 京都大学東京オフィス会議室(東京都), 2015/4/10
7. 中村 貴史. がん治療に生きたウイルスを利用する～ウイルス感染・増殖の制御に基づくウイルス療法の開発～(招待講演). 第10回 霊長類医科学フォーラム. 文部科学省研究交流センター(茨城県・つくば市), 2014/11/13
8. Motomu Nakatake and Takafumi Nakamura. Tumor-specific, replication-competent and stealth vaccinia virus for systemic oncolytic virotherapy. 第73回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2014/9/27
9. Naoyoshi Nitta, Ikumi Goto, Motomu Nakatake, Masato Yamane, Kosuke, Horita, Hajime Kurosaki and Takafumi Nakamura. Deletions of both vaccinia growth factor and O1 protein genes enhance therapeutic index of oncolytic vaccinia virus. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy. 東京慈恵会医科大学(東京都), 2014/8/8
10. Ikumi Goto, Naoyoshi Nitta, Motomu Nakatake, Nao Okada, Masato Yamane, Hajime Kurosaki, Takafumi Nakamura. Deletions of both vaccinia growth factor and O1 protein genes enhance therapeutic index of oncolytic vaccinia virus. The 17th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy. Washington, DC, USA, 2014/5/21
11. Naoyoshi Nitta, Nao Okada, Ikumi Goto, Masato Yamane, Motomu Nakatake, Hajime Kurosaki, and Takafumi Nakamura. Safety profile, tumor selectivity and oncolytic effects after systemic administration of oncolytic vaccinia virus MDVV. 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2013/10/5
12. Naoyoshi Nitta, Nao Okada, Ikumi Goto, Masato Yamane, Motomu Nakatake, Hajime Kurosaki, and Takafumi Nakamura. SYSTEMIC CANCER VIROTHERAPY WITH MDVV, A COMBINED miRNA-REGULATED

- AND THYMIDINE KINASE-DELETED ONCOLYTIC VACCINIA VIRUS. The 19th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy. 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市), 2013/7/4
13. Naoyoshi Nitta, Nao Okada, Ikumi Goto, Motomu Nakatake, Masato Yamane, Hajime Kurosaki, Takafumi Nakamura. Systemic cancer virotherapy with MDVV, a combined miRNA-regulated and thymidine kinase-deleted oncolytic vaccinia virus. 7th International Meeting On Replicating Oncolytic Virus Therapeutics. Quebec City, Canada, 2013/6/16
 14. Takafumi Nakamura. MicroRNA regulation of viral replication for oncolytic virotherapy. The 2nd Meeting on RNA and Biofunctions-ASIA Study "RNA Biofunctions and Viruses". ホテルレオパレス博多 (福岡県・福岡市), 2013/1/9
 15. Takafumi Nakamura. Systemic cancer therapy with MDVV, a combined miRNA-regulated and thymidine kinase-deleted oncolytic vaccinia virus. 第71回日本癌学会学術総会. ホテルロイトン札幌 (北海道・札幌市), 2012/9/19
 16. 中村 貴史. マイクロ RNA によって制御されるウイルスベクターの開発. 第14回日本RNA学会年会. 東北大学百周年記念会館 (宮城県・仙台市), 2012/7/18
 17. Mina Hikichi, Minoru Kidokoro, Hisatoshi Shida, Hideaki Tahara and Takafumi Nakamura. SYSTEMIC ONCOLYTIC VIROTHERAPY WITH TUMOR-SPECIFIC REPLICATING VACCINIA VIRUSES. The 18th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy. ホテル熊本テルサ (熊本県・熊本市), 2012/6/29
 18. Mina Hikichi and Takafumi Nakamura. Systemic cancer virotherapy with MDVV, a combined miRNA-regulated and thymidine kinase-deleted oncolytic vaccinia virus. The 15th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy. Philadelphia, USA, 2012/5/17

〔図書〕(計2件)

1. 中村 貴史. 腫瘍特異的に増殖する遺伝子組換えワクシニアウイルスによるがんウイルス療法. 実験医学(羊土社), 34(1): 31-37, 2016
2. 中村 貴史. miRNA 制御ウイルスによるがん細胞特異的治療法の開発. 遺伝子医学(メディカルドゥ), MOOK23号: 176-181, 2012

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計1件)
名称: マイクロRNA制御組換えワクシニアウイルス及びその使用
発明者: 中村貴史、引地美奈、田原秀晃、木所稔、志田壽利
権利者: 国立大学法人東京大学、国立大学法人北海道大学、国立感染症研究所
種類: 特許
番号: 5652830号
取得年月日: 2014年11月28日
国内外の別: 国内

〔その他〕

- ホームページ等
1. 研究内容紹介
<http://www.med.tottori-u.ac.jp/integbio/522/1198.html>
 2. がんナビ
http://medical.nikkeibp.co.jp/leaf/all/cancer/navi/report/201301/528660_3.html
 3. ウイルスで新しいがん療法の開発をめざす
<http://ganshien.umin.jp/research/main/nakamura/index.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
中村 貴史 (NAKAMURA Takafumi)
鳥取大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 70432911
 - (2) 研究分担者
該当者なし
 - (3) 連携研究者
該当者なし