

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19597

研究課題名（和文）抗がん剤タキソール耐性を示す難治性がんの根絶を目指したがんウイルス療法の新戦略

研究課題名（英文）A novel oncolytic virotherapy for paclitaxel resistant ovarian cancer

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：抗がん剤タキソール耐性を示す難治性卵巣癌の担癌モデルマウスにおいて、がん治療用ワクシニアウイルスは高い抗がん効果を示した。その作用機序は、Long non-coding RNAであるUCA1が細胞骨格の制御に関わるCdc42の活性化を介して、がん治療用ワクシニアウイルスの伝播能を増強することに因るものであることを解明した。以上よりUCA1は、がん治療用ワクシニアウイルスの抗がん効果を予測するバイオマーカーになり得る可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

UCA1は、卵巣癌をはじめ様々ながんにおける発現亢進と抗がん剤耐性能の獲得への関与が報告されているが、がん治療用ワクシニアウイルスとの関連を示唆する報告は全くなかった。本研究において、UCA1の発現亢進はがん治療用ワクシニアウイルスの抗がん効果を増強すること、及びその分子メカニズムを解明した。これらの研究成果は、UCA1をはじめとするバイオマーカーによって、がん治療用ワクシニアウイルスによる抗がん効果を予測できる他に類のないがんウイルス療法の創出につながる。

研究成果の概要（英文）：In mice bearing paclitaxel-resistant ovarian cancer cells, oncolytic vaccinia virus (OVV) showed efficient anti-tumor activity. We found long non-coding RNA urothelial carcinoma-associated 1 (UCA1) upregulation in the cancer cells promotes OVV cell-to-cell spread via modulating the Cdc42 signaling. These results suggested that UCA1 regulates the oncolytic effects of OVV and might be considered a promising biomarker to predict oncolytic activity in ovarian cancer.

研究分野：遺伝子治療学

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

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

がんウイルス療法の研究は、1900年代の初めころから始まり、日本でもムンプスウイルスを使っての臨床研究が試みられていた。しかし当時は、野生型に近いウイルスを投与していたので、安全性の点から問題があり、新しい治療法として確立・定着するには至らなかった。ところが最近、遺伝子工学技術や、ウイルス及び癌の分子病態解析が発展し、ウイルスが元来持っている正常組織に対する病原性を排除し、ウイルスを癌細胞だけで増殖させることが可能になった。これより、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するがん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。

一方、従来の抗がん剤の代表として知られているタキソール（パクリタキセル）は、1992年に米国で卵巣癌の治療薬として認可され、現在では、乳癌、肺癌や胃癌など様々ながんの治療に世界各国で広く用いられている。しかしながら、パクリタキセル耐性を示すがん患者が多く存在する。これまでの研究により創出した腫瘍細胞特異的に増殖し破壊する腫瘍溶解性ワクシニアウイルスによるがんウイルス療法の臨床応用を想定した場合、これらパクリタキセル耐性の難治性ががんが最初の対象となる可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では、卵巣癌においてパクリタキセル耐性能の獲得に関与しているUCA1が腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの抗がん効果を増強するという知見に基づき、以下の4つの研究項目を提案し、その有効性の検証と作用機序の解明を目指す。

- (1) 抗がん剤耐性卵巣癌細胞を用いて臨床像を反映した腹膜播種マウスを作製し、パクリタキセル耐性の残存腫瘍でのUCA1発現と腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの抗がん効果を評価する。
- (2) 臨床検体モデルを用いて、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの増殖・伝播を正に制御するUCA1の有用性を検証する。
- (3) UCA1とワクシニアウイルスを関連付ける報告はなく、その相互作用を分子レベルで解明する。
- (4) 卵巣癌と同様にUCA1の発現亢進が予後不良となる他のがん種においても、その有用性を検証するとともに、UCA1以外の他の新規バイオマーカーを探索・同定する。

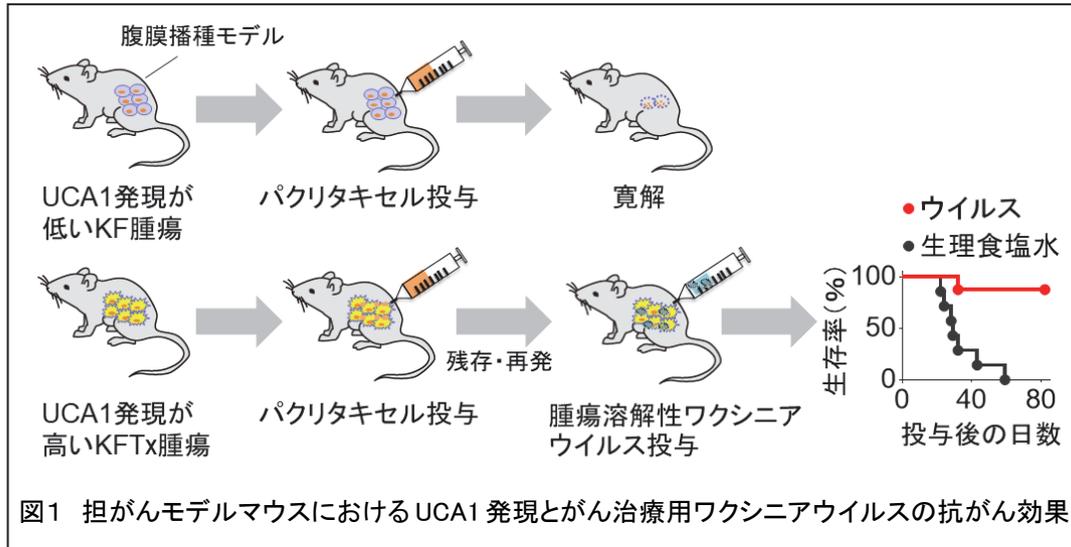
3. 研究の方法

- (1) 臨床像を反映した卵巣がんの担がんモデルマウスを構築すべく、ヌードマウスに対し、*in vivo* イメージング用に *Renilla Luciferase* (Rluc) を導入したパクリタキセル (PTx) 感受性 Low 細胞、又は PTx 耐性 KFTx 細胞を腹腔内投与した。Rluc の基質であるセレンテラジンを経口投与することによって、マウス体内での腫瘍の生着を *in vivo* イメージングシステムで非侵襲的に確認した。これらの腹膜播種モデルマウスと *in vivo* イメージングシステムを用いて、パクリタキセル耐性の残存腫瘍でのUCA1発現と腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの抗がん効果を評価した。
- (2) 卵巣がん患者の手術検体由来の初代培養細胞を含む8種類の卵巣癌細胞を用いて、UCA1の発現はリアルタイムPCR、ウイルスの増殖はGFP発現・FLuc発光の定量により、UCA1の発現亢進が腫瘍溶解性ワクシニアウイルスによる抗がん効果を増強するかどうかを評価した。
- (3) UCA1の発現亢進が腫瘍溶解性ワクシニアウイルスによる抗がん効果を増強する分子メカニズムを解明すべく、UCA1の発現が低いLow細胞と発現が高いKFTx細胞において、Gene Ontology解析と標的分子に対するsiRNAを用いたノックダウンにより、UCA1の下流分子の同定を試みた。
- (4) UCA1と結合能を持つ可能性があるmiRNAの発現を指標に、UCA1に対するsiRNAを用いたノックダウンによって変動するmiRNAを同定する。同定したmiRNAをトランスフェクションすることにより、ウイルス伝播の阻害効果を評価した。

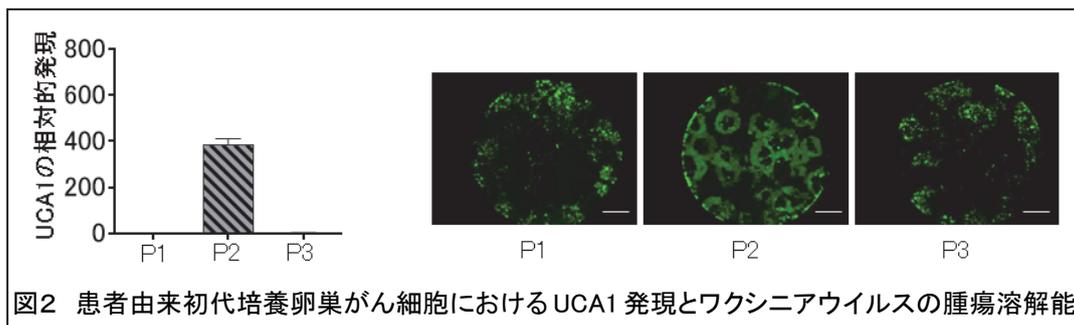
4. 研究成果

- (1) 臨床像を反映した卵巣がんの担がんモデルマウスにおいて、腫瘍におけるUCA1の発現を比較解析した結果、KFTx細胞由来の腫瘍におけるUCA1の発現は高く、Low細胞由来の腫瘍では低かった。一方、腹膜播種モデルマウスにPTxを投与し7日後に腫瘍をRlucイメージングした結果、Low細胞由来の腫瘍は95%以上消失したのに対し、KFTx細胞由来の腫瘍は残存していた。次に、この残存腫瘍に対する腫瘍溶解性ワクシニアウイルスによる治療を試みた。その結果、ウイルス投与2日後のウイルスイメージングでは、腹膜播種した残存KFTx腫瘍において高いウイルス増殖が観察された。そしてウイルス投与9日後の腫瘍イメージングでは、コントロールのPBS投与群において残存腫瘍の再増殖が観察されたのに対し、ウイルス投与群ではPTx治療前の腫瘍の98%以上が消失していた。さらに、ウイルス投与10日後のウイルスイメージングでは、この腫瘍の消失に伴って、ウイルス増殖も消失していた。即ち、UCA1を高発現する卵巣がんKFTx細胞を用いた担がんモデルマウスでは、パクリタキセル治療が耐性を示し

たのに対し、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの著明な抗がん効果が確認された(図1)。以上より、UCA1 の発現は、抗がん剤パクリタキセルと腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの両方の治療効果を予測するバイオマーカーになり得ることが示唆された。



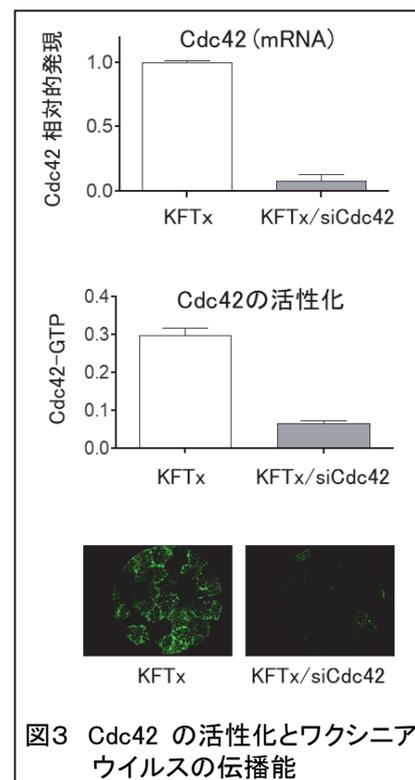
(2) UCA1 の発現が亢進している患者由来の初代培養卵巣がん細胞において(図2左)、より高いワクシニアウイルスによる腫瘍溶解が確認された(図2右)。以上より、卵巣がん患者の手術検体由来の初代培養細胞を含む8種類の卵巣癌細胞において、UCA1 の発現亢進と腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍溶解能との相関性が確認された。



(3) UCA1 を高発現する卵巣がん KFTx 細胞において、Cdc42 に対する siRNA (siCdc42) をトランスフェクションすると、Cdc42 の mRNA レベルの低下(図3上)、および活性化レベルの低下(図3中)を確認した。そして、その siRNA 処理後の KFTx 細胞では、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍溶解能が低下した(図3下)。加えて、UCA1 は Cdc42 の活性化を介して、フィロポディアと呼ばれる細胞突起を増加させ、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの感染能、複製能には影響を与えず、細胞間伝播能に関与していることが認められた。以上より、UCA1 の発現亢進が腫瘍溶解性ワクシニアウイルスによる抗がん効果を増強する分子メカニズムとして、UCA1 が細胞骨格の制御に関わる Rho ファミリー低分子量Gタンパク質の一つである Cdc42 を活性化し、フィロポディア形成を増加させることによって、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの細胞間伝播を促進することを見出した。

(4) UCA1 は、2つのマイクロ RNA、miR-18a と miR-182 を負に制御するスポンジ機能によって、ウイルスの細胞間伝播を亢進していることが示された。

以上(1)~(4)の結果より、UCA1 の発現亢進や Cdc42 の活性化、さらに miR-18a や miR-182 は、がん治療用ワクシニアウイルスの抗がん効果を予測するバイオマーカーになり得ることが示唆された。



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 Horita Kosuke, Kurosaki Hajime, Nakatake Motomu, Ito Mai, Kono Hiromichi, Nakamura Takafumi	4. 巻 516
2. 論文標題 Long noncoding RNA UCA1 enhances sensitivity to oncolytic vaccinia virus by sponging miR-18a/miR-182 and modulating the Cdc42/filopodia axis in colorectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 831 ~ 838
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.06.125	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 Horita Kosuke, Kurosaki Hajime, Nakatake Motomu, Kuwano Nozomi, Oishi Tetsuro, Itamochi Hiroaki, Sato Sho, Kono Hiromichi, Ito Mai, Hasegawa Kosei, Harada Tasuku, Nakamura Takafumi	4. 巻 13
2. 論文標題 lncRNA UCA1-Mediated Cdc42 Signaling Promotes Oncolytic Vaccinia Virus Cell-to-Cell Spread in Ovarian Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 35 ~ 48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omto.2019.03.003	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11件（うち招待講演 6件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中村貴史
2. 発表標題 日本発がん治療用ウイルスの創薬
3. 学会等名 金沢大学薬学シンポジウム2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Horita K, Kurosaki H, Nakamura T
2. 発表標題 LncRNA UCA1 is a potential biomarker of response to oncolytic virotherapy as well as chemotherapy
3. 学会等名 The 12th International Oncolytic Virotherapy Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamura T
2. 発表標題 LncRNA UCA1 is a potential biomarker of response to oncolytic virotherapy as well as chemotherapy for ovarian cancer
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Horita K, Kurosaki H, Nakatake M, Kuwano N, Ishii K, Kohno H, Ito M, Itamochi H, Oishi T, Harada T, Nakamura T
2. 発表標題 LncRNA UCA1 is a potential biomarker of response to oncolytic vaccinia virotherapy and chemotherapy for ovarian cancer
3. 学会等名 第25回日本遺伝子治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamura T
2. 発表標題 Next-generation oncolytic vaccinia virus for cancer virotherapy
3. 学会等名 国際遺伝子細胞治療シンポジウムIGCT（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Horita K, Kurosaki H, Nakatake M, Kuwano N, Ishii K, Kohno H, Ito M, Itamochi H, Oishi T, Harada T, Nakamura T
2. 発表標題 Predictive biomarkers for cancer virotherapy with oncolytic vaccinia virus
3. 学会等名 第24回日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakamura T
2. 発表標題 Tumor-targeted and armed oncolytic vaccinia virus for systemic cancer virotherapy
3. 学会等名 第23回日本遺伝子細胞治療学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村 貴史
2. 発表標題 難治性がんを標的破壊する武装化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
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村 貴史
2. 発表標題 分子生物学的アプローチを駆使してウイルスを知り、そしてがん治療に利用する
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村 貴史
2. 発表標題 がんのみを標的破壊するワクシニアウイルスベクターの開発
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Horita K, Kurosaki H, Nakatake M, Kuwano N, Ishii K, Itamochi H, Oishi T, Harada T, Nakamura T.
2. 発表標題 lncRNA UCA1 has the potential to be a biomarker of therapeutic response to oncolytic vaccinia virus in paclitaxel resistant ovarian cancer.
3. 学会等名 第23回日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 中村貴史	4. 発行年 2017年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 8
3. 書名 先端治療技術の実用化と開発戦略	

1. 著者名 中村貴史	4. 発行年 2017年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 7
3. 書名 次世代がん治療：発症・転移メカニズムからがん免疫療法・ウイルス療法、診断法まで	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 ワクシニアウイルスの増殖・伝搬を増強する宿主制御因子	発明者 中村 貴史, 堀田 享 佑, 黒崎 創, 中武 大 夢	権利者 国立大学法人鳥 取大学
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6452266号	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

分子医学分野

<https://www.med.tottori-u.ac.jp/introduction/medicine/about/3318/3708/27470.html>

がんナビ

http://medical.nikkeibp.co.jp/leaf/all/cancernavi/report/201301/528660_3.html

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