

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16862

研究課題名（和文）ヒト膵臓がん細胞株の麻疹ウイルス感染制御機構の解明

研究課題名（英文）Challenge for revealing the regulatory mechanism of measles virus infection in human pancreatic cancer cell lines

研究代表者

早稲田 真澄（Waseda, Masazumi）

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：60794295

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、膵臓がんにおける麻疹ウイルス感染制御機構を解明するため、ヒト膵臓がん細胞株9株を用いて実験を開始した。

麻疹ウイルスはがん細胞に感染して傷害性を示す腫瘍溶解性ウイルスとしての機能を有しており、Nectin-4と呼ばれる膜タンパク質を介して細胞に感染することが知られている。当該受容体が麻疹ウイルス感染に与える影響を少なくする目的で、当該膜タンパク質を過剰発現する膵臓がん細胞株を樹立した。

また、野生型の麻疹ウイルスは免疫細胞にも感染するが、本研究は将来的に免疫療法との併用を予定しているため、Nectin-4特異的な麻疹ウイルス増幅に用いるNectin-4発現Vero細胞も樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、麻疹ウイルス感染に必要な細胞受容体であるNectin-4を過剰発現するヒト膵臓がん細胞株を複数樹立し、免疫細胞への感染性を消失した麻疹ウイルスの増幅に用いるNectin-4発現Vero細胞も作製した。

樹立した細胞株を用いて感染実験を行い、感染動態の異なる細胞間で遺伝子発現を比較することにより、麻疹ウイルス感染制御機構の探索が可能になる。

該当する遺伝子の発現や機能を制御する麻疹ウイルスを作製することにより、がん細胞に長期間感染可能な麻疹ウイルスを開発できれば、固形腫瘍において問題となる「免疫抑制的ながん微小環境」を改善するツールとして応用可能になるのではないかと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we tried to perform the infection experiments of measles virus by using 9 human pancreatic cancer cell lines to identify the kinetics of measles virus infection and reveal how these cell lines regulate measles virus infection.

Measles virus is known as an oncolytic virus, which infects and lyses tumor cells to induce strong immune responses against tumors. In addition, the virus uses Nectin-4 immunoglobulin superfamily receptor for viral entry. Thus, we first established the Nectin-4 transduced pancreatic cell lines.

In addition, we also established Nectin-4 expressing Vero cells for amplifying mutated measles viruses with Nectin-4 specific tropism.

研究分野：免疫再生治療

キーワード：腫瘍溶解性ウイルス 麻疹ウイルス Nectin-4 膵臓がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、血液腫瘍に高発現する CD19 を標的抗原として認識するキメラ抗原受容体 (CAR: Chimeric Antigen Receptor) が作製された。T 細胞受容体とは異なり、CAR は細胞表面絵にある標的抗原を直接認識して細胞を活性化する人工的なタンパク質である。そのため、**がん細胞を攻撃する細胞傷害性 T 細胞 (CTL: Cytotoxic T Lymphocyte) に当該遺伝子を導入することで、CTL に任意の表面抗原に対する反応性を付与することが可能である** [Nature, 545(7655):423-431 (2017)]。CAR を導入した CTL の輸注療法が上記の血液腫瘍に対して著効を示したことから、当該治療法に注目が集まっている。しかし、CAR 導入 CTL による治療法が固形腫瘍に対して著効を示した例はほとんどない。

(2) これまでの研究から、**固形腫瘍における免疫抑制的な腫瘍微小環境の形成が CTL を用いたがん免疫療法にとって障害となることが明らかになっている** [Science, 348(6230):74-80 (2015)]。また、由来となる細胞の種類や個々のがん細胞に偶発する突然変異などにより、**CTL の標的となる抗原の発現を含めた多様性が腫瘍を構成するがん細胞に生じることも明らかになってきた** [Cancer Cell, 27(1):15-26 (2015)]。例えば、がん細胞が CTL の標的となる抗原を発現していなければ、当然 CTL はがん細胞を認識して攻撃することができず、攻撃を免れたがん細胞から癌が再発する危険性がある。そのため、**CAR 導入 CTL を用いた治療法を固形腫瘍に対して有効にするには、「免疫抑制的な腫瘍微小環境」と「がん細胞の不均一性」という 2 つの問題を克服する必要がある**と考えられる。

(3) 現在、「免疫抑制的な腫瘍微小環境」の改善についてはいくつかのアプローチが試みられ [J. Clin. Invest., 128(8):3209-3218 (2018)]、臨床試験においても一定の効果を示すことが報告されている。例えば、PD-1 や CTLA-4 などの CTL に発現する抑制分子に対する阻害抗体、いわゆる「免疫チェックポイント阻害剤」と CTL 療法との併用が挙げられる。また、**腫瘍溶解性ウイルスと呼ばれるがん細胞に感染して増殖するウイルスとの併用も試みられている** [Cancer Res., 74(18):5195-5205 (2014)]。動物実験レベルではあるが、当該ウイルスを介して腫瘍局所に CTL の誘導因子や活性化因子を発現させることで、CTL の腫瘍への集積や腫瘍部位での増殖などが促進し、抗腫瘍効果が向上することが報告されている。

(4) 一方、腫瘍組織を構成するがん細胞は「不均一」なため、一部のがん細胞に対して治療が有効であった場合でも残存するがん細胞が増殖し、癌の根治には至らないという大きな課題がある。この課題を克服するためには、がん細胞の「不均一性」を解消するためのアプローチが必要だと考えられる。

(5) 申請者は、腫瘍溶解性ウイルスとしての性質を有する麻疹ウイルスを用いた感染実験により、同じ臓器由来のがん細胞株であってもウイルスが長期間感染する「感受性株」と短時間で感染が収束する「耐性株」に分かれることを確認している。そこで、「耐性株」で機能する感染制御機構を解明し、「感受性株」と同様に感染させることが出来るようになれば、がん細胞の「不均一性」を解消するアプローチとして利用できるのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

腫瘍溶解性ウイルスの膵臓がんへの有効性を検討する研究や、CTL 療法など他の治療法との併用を意図した遺伝子導入ウイルスの開発などが近年実施されるようになってきているが、使用するウイルスに対する「感受性株」を用いた検討が多く、「耐性株」への対策はあまり進んでいない。そのため、「がん細胞の不均一性」に起因する治療抵抗性という課題は依然として残されている。本研究は、ヒト膵臓がん細胞株に見られる麻疹ウイルス感受性の違いに着目してその制御機構を解明することにより、多様な膵臓がん細胞株に対して持続感染可能なウイルスの開発を目指している。

3. 研究の方法

本研究では、インフルエンザウイルス等と比較してはるかに感染力が強い麻疹ウイルスを腫瘍溶解性ウイルスとして使用する。また、5 年生存率が最も低い膵臓がんを対象として選択する。まず始めに、本研究に用いる Nectin-4 強制発現ヒト膵臓がん細胞株および Nectin-4 強制発現 Vero を樹立する。次に、ヒト膵臓がん細胞株の麻疹ウイルスに対する耐性機構の解明を目指し、様々な膵臓がん細胞株に持続感染可能な改変型麻疹ウイルスを作製する。最後に、ヒト膵臓がん細胞株を移植した嗅願マウスに当該ウイルスを投与することにより、in vivo において多様な膵臓がん細胞に対して普遍的な抗がん作用を発揮できるか評価する。

4. 研究成果

(1) 本研究では、多様なヒト膵臓がん細胞に共通する感染制御機構を見出すために、複数の膵臓がん細胞株を理研バイオリソースセンター（BRC）および American Type Culture Collection（ATCC）より導入して実験に使用した。本研究にて使用する腫瘍溶解性ウイルスである麻疹ウイルスは、細胞接着分子である Nectin-4 を介してがん細胞に感染することが報告されている。そのため、導入した膵臓がん細胞株 9 株の Nectin-4 発現をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、Nectin-4 陽性株は 4 株（Capan-2、KLM-1、PK-1、PK-8）、陰性株は 5 株（AsPC-1、BxPC-3、MIA PaCa2、PANC-1、PK-59）であることが確かめられた（図 1、陽性細胞集団を矢印で示す）。

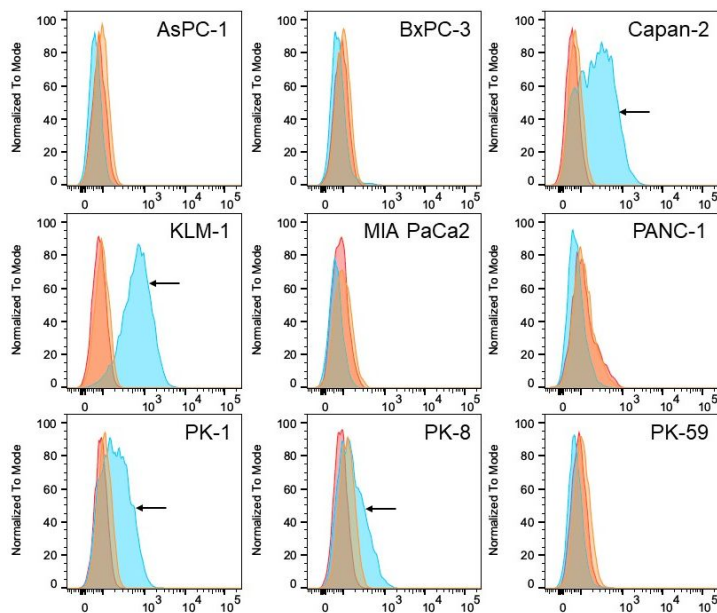


図 1 ヒト膵臓がん細胞株における Nectin-4 の発現

(2) 次に、麻疹ウイルス感染実験の際に Nectin-4 発現量の差がその後の解析に影響することを防ぐため、ヒト由来 Nectin-4 (hNectin-4) 強制発現株の樹立を実施した。hNectin-4 遺伝子を発現するガンマレトロウイルスベクターをヒト膵臓がん細胞株に感染させた後、フローサイトメーターを用いて hNectin-4 の発現を解析した（図 2）。その結果、いずれの細胞株においても同程度 hNectin-4 を発現する細胞集団が確認できたことから、同程度 hNectin-4 を発現する集団をソーティングにより回収し、hNectin-4 強制発現株として保存した。

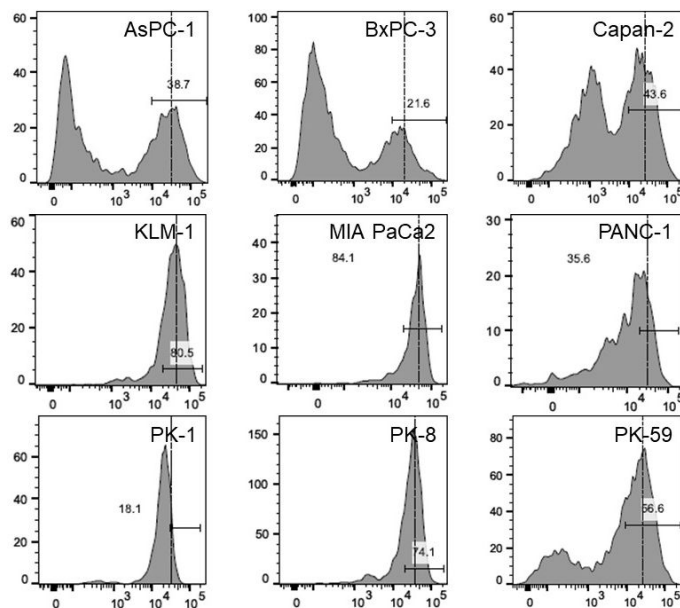


図 2 レトロウイルス感染後の Nectin-4 発現状況

(3) 本研究にて使用している麻疹ウイルスは、Nectin-4 に加えて、免疫細胞に発現する SLAM タンパク質を感染受容体として用いることが知られている。また、麻疹ウイルスを in vitro で増幅する目的で、ヒト SLAM を発現させた Vero 細胞が広く用いられている。しかし、我々は将来的に免疫細胞との併用を目指した麻疹ウイルスの開発を行っているため、SLAM への結合能を欠失した麻疹ウイルスの使用を計画している。そこで、もう一つの感染受容体である hNectin-4 を発現する Vero 細胞 (Vero/Nectin-4) 細胞を作製した（図 3）。本研究にて樹立した細胞株を使用することで、将来的に免疫細胞への感染性を無くした麻疹ウイルスの増幅も可能である。

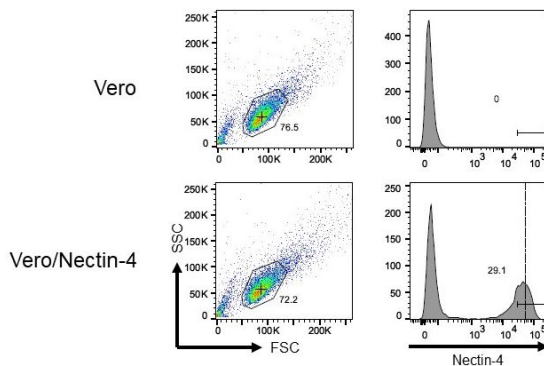


図 3 Nectin-4 発現 Vero 細胞

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 1件）

1. 著者名 Waseda Masazumi, Kaneko Shin	4. 巻 9
2. 論文標題 Podoplanin as an Attractive Target of CAR T Cell Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1971 ~ 1971
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9091971	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0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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