

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590302

研究課題名(和文) 腫瘍融解性 SIN レプリコンの開発と腫瘍特異的 SIN 複製機構の解明

研究課題名(英文) Development of oncolytic SIN replicon and the mechanism of tumor-specific replication of SIN

## 研究代表者

白澤 浩 (SHIRASAWA HIROSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00216194

研究成果の概要(和文)：腫瘍を特異的に死滅させるが、ヒトに対する病原性が低いシンドビスウイルス(SIN)の複製に必要な遺伝子部分のみで構成したRNA分子(SINレプリコン)に腫瘍融解性のあることを確認し、腫瘍融解性SINレプリコンを開発した。更に、SINレプリコンにSINウイルスゲノムの3'末端側非翻訳領域(3' UTR)を付加すると、レプリコンの正常細胞に対する毒性が低下し腫瘍特異性が向上することを見出した。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated the oncolytic feature of a Sindbis-virus-derived RNA molecule, SIN replicon, which constitutes the necessary genome part of an avirulent virus Sindbis (SIN) for the replication. Thus, we developed expression vectors for oncolytic SIN replicons. We found that the 3' UTR of the SIN genome allowed the SIN replicon to be less toxic to normal cells and more specific to cancer cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学、癌、ウイルス、レプリコン、腫瘍融解

## 1. 研究開始当初の背景

トガウイルス科アルファ属(アルファウイルス)は、広い宿主域を持ち、高い発現レベルを有することから、近年、発現ベクターとして用いられるようになり、**Sindbis virus (SIN)**、Semliki Forest virus (SFV)、Venezuelan Equine Encephalitis virus (VEE)等をベースにしたウイルスベクターの研究・開発が進んでいる(K. Lundstrom, Gene Therapy 12, S92-S97, 2005)。

特に、シンドビスウイルスベクターおよび

SIN AR339株は腫瘍選択的集積性を有することが、それぞれTseng等(Cancer Research 64, 6684-6692, 2004)と我々のグループ(Clin Cancer Res 11, 4553-4560, 2005)によって報告され、腫瘍に対するウイルス療法および遺伝子治療用ベクターとして有用であることが期待されている。

SINは節足動物を介してヒトに感染するアルボウイルスの一つであり、本来の宿主は昆虫であると考えられる。ヒトは本来のウイルスのライフサイクルに含まれず、終末宿主で

ある。従って、節足動物を介するヒトへの感染は起きるが、飛沫感染、経口感染等を起こさない。腫瘍融解性ウイルスとしてのSINが持つこの性質は、従来検討されてきたオンコリティックウイルスにはないユニークな特徴であり利点である。

ヒト・ヒト感染が起こるアデノウイルス、ヘルペスウイルス、レオウイルス等を用いた腫瘍融解性ウイルス療法に比較して、このようなユニークなSINの利点からリバータントの出現、野生株との組み換え等の危険性は極めて少ないが、安全性における障害は依然として残っている。

本研究では、以上のようなSINの腫瘍融解性ウイルスとしての利点を残しつつ安全性を確保する新しいタイプの腫瘍特異的融解性レプリコンの開発を行うこととした。

## 2. 研究の目的

トガウイルス科アルファウイルスは、近年、新しいウイルスベクターとして開発研究が進んでいる。アルファウイルスの一つであるシンドビスウイルス(SIN) AR339株は、腫瘍特異的融解能を持ち、オンコリティックウイルス(腫瘍融解性ウイルス)として利用可能な性質を持つことが我々の研究により明らかになっている(Clin Cancer Res 11, 4553-4560, 2005, 「癌治療用医薬組成物(PCT/JP2004/010042) PCT出願中」, 「A PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATMENT OF CANCERS (60/493, 324) アメリカ特許出願中」)。特に、SIN AR339は他の腫瘍融解性ウイルスにないユニークな腫瘍選択的集積性を持つ。

しかしながら、腫瘍融解性ウイルス療法には、自律増殖性のウイルスを用いることによるリバータントの出現等のデメリットが存在し、臨床応用の際の問題点となっている。

そこで、本研究では、SIN AR339株の腫瘍特異的複製能およびアポトーシス誘導能に着目し、SIN AR339ゲノムの複製およびアポトーシス誘導に必要なサブウイルスゲノムRNA(以下、SINレプリコンと呼ぶ)作成および腫瘍特異的アポトーシス誘導能の高いSINレプリコン変異体を開発すると同時に、SINレプリコンの腫瘍特異的複製能の機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 腫瘍特異的融解性変異SINの選別

『腫瘍融解性』および『正常細胞非融解性』の両側面からのアプローチによる2つの異なる戦略を用いることにより、変異体の作製をより確実なものとする。具体的には、以下の

2つの戦略を用いる。

- ① 腫瘍細胞において、高い融解性を示すSINウイルス株を選別する。
- ② 正常細胞に対するアポトーシス誘導能が低いSINウイルス株を選択する。

### (2) 腫瘍特異的融解性変異SINの解析

- ① 腫瘍特異的アポトーシス誘導能を持つSIN株のcDNAを作成する。
- ② 腫瘍特異的融解能を持つSIN株cDNAの塩基配列を決定し、腫瘍特異的融解性に関与する可能性のある領域を同定する。
- ③ 5' UTR, 変異体nsp1-4, 3' UTRを含むcDNAを発現プラスミドに組み込み、レプリコン発現プラスミドを構築する。

### (3) 腫瘍特異的融解性SINレプリコンの評価

- ① *in vitro*転写したRNAレプリコンの腫瘍特異的融解能を評価する。
- ② RNAレプリコンの正常細胞(ヒト線維芽細胞、Vero細胞)に対する毒性の評価を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 腫瘍特異的融解性変異SINの選別

腫瘍融解性SINレプリコンの開発のために、増殖能が高いSINクローンを選別する戦略により変異株の選別を平成20年度に行った。その結果、HeLa細胞に対する細胞傷害性が高いクローンを選択し、ov-SINと命名した。

ov-SINは、非癌細胞であるVero細胞の増殖期に対しても細胞傷害性を示したが、静止期の正常ヒト繊維芽細胞および静止期のVero細胞に対しては細胞傷害性を示さなかったことから、SINの腫瘍特異性には、細胞周期が関連していることが明らかとなった。

### (2) 腫瘍特異的融解性変異SINの解析

ov-SINゲノムのcDNA(Fig. 1A)を作成し、5' UTR, nsp1-4領域、3' UTRの塩基配列を決定した。ov-SINには、5' -UTRのnt35にG→Aの変異およびnsp2の438番アミノ酸にP→Lの変異が存在した。

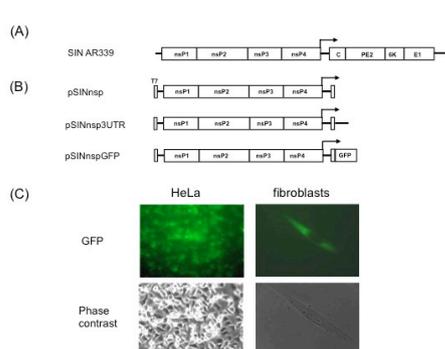


Fig.1

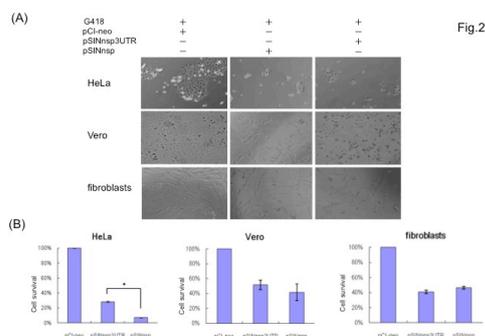
ov-SIN cDNAの5' UTR、nsp1-4およびウイルスの構造蛋白領域プロモーター (26Sプロモーター) を含む領域をT7プロモーター下流に組み込みpSINnspを構築した (Fig. 1B)。

pSINnspは、T7上流にCMVプロモーターを持ち、T7プロモーターより *in vitro* RNA合成によりSINレプリコンを作製するための鋳型であると同時に、それ自身を細胞に導入することによってもレプリコンを発現できるlayered expression vectorとして構築した。更に、3' UTRの関与、レプリコンの複製をモニターするために26Sプロモーター下流にGFPを組み込んだpSINnsp3UTRおよびpSINnspGFPを構築した。

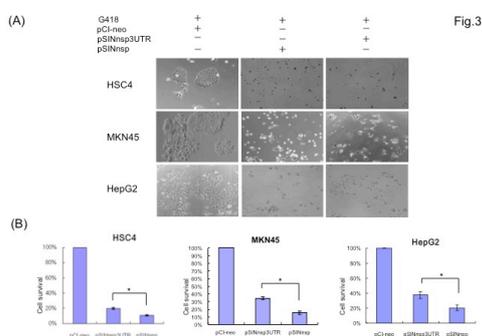
pSINnspGFPをHeLa細胞およびヒト線維芽細胞に導入したところ、各細胞においてGFP発現が確認されたことから、本レプリコンcDNAから発現したRNAが複製することにより、マイナスRNA上の26Sプロモーターが機能していることを確認した (Fig. 1C)。

まず、pSINnsp, pSINnsp3UTRを細胞に導入し、G418で選択することにより、レプリコン発現が癌細胞および正常細胞 (ヒト線維芽細胞、Vero細胞) におよぼす影響を検討した。

その結果、レプリコン発現はHeLa細胞に対して強い毒性を示したものの、Vero細胞およびヒト線維芽細胞に対しても少なからず毒性が観察された。興味深いことに、HeLa細胞に対する毒性はpSINnsp > pSINnsp3UTRであったが、Vero細胞およびヒト線維芽細胞において両者の差は観察されなかった (Fig. 2)。



このことから、3' UTRが癌細胞におけるレプリコンの細胞毒性に関与していることが示唆された。更に、ヒト口腔癌細胞株のHSC4、胃癌細胞株のMKN45、肝癌細胞株のHepG2に対するSINレプリコン発現の毒性を検討したところ、HeLa細胞と同様にpSINnsp >



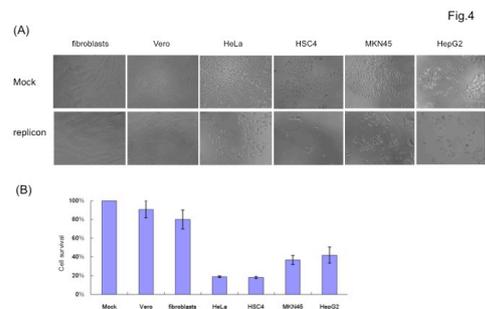
pSINnsp3UTRの細胞毒性があることを確認した (Fig. 3)。

### (3) 腫瘍特異的融解性SINレプリコンの評価

3' UTRの関与を検討するために、pSINnsp3UTRを鋳型として、*in vitro*転写したRNAレプリコンを正常細胞 (Vero細胞、ヒト線維芽細胞) および癌細胞に導入し、SIN RNAレプリコンの細胞毒性の評価を行った。

その結果、ov-SINレプリコンは、HeLa細胞に対してアポトーシスを誘導するが、Vero細胞および正常ヒト線維芽細胞に対するアポトーシス誘導能が極めて低く、ov-SIN自体よりも腫瘍融解特異性の高いことを確認した (Fig. 4)。

また、CMVプロモーターにより強制発現させたSINレプリコンよりも *in vitro*合成したSIN RNAレプリコンの方が非癌細胞に対する傷害性が低く、腫瘍融解特異性の高いこと



が明らかとなった。更に、3' UTRを組み込んだRNAレプリコンは細胞傷害性が低くなるが正常細胞への毒性が低く、3' UTRは腫瘍融解特異性を高めることが明らかとなった。

## 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9件)

1. Shiiba M, Nomura H, Shinozuka K, Saito K, Kouzu Y, Kasamatsu A, Sakamoto Y, Murano A, Ono K, Ogawara K, Uzawa K, Tanzawa H. Down-regulated expression of SERPIN genes located on chromosome 18q21 in oral squamous cell carcinomas. *Oncol Rep.* 2010; 24 :241-249. (査読有)
2. Saito K, Shirasawa H, Isegawa N, Shiiba M, Uzawa K, Tanzawa H. Oncolytic virotherapy for oral squamous cell carcinoma using replication-competent viruses. *Oral Oncol.* 2009;45:1021-1027. (査読有)

3. Saito K, Uzawa K, Kasamatsu A, Shinozuka K, Sakuma K, Yamatoji M, Shiiba M, Shino Y, Shirasawa H, Tanzawa H. Oncolytic activity of Sindbis virus in human oral squamous carcinoma cells. *Br J Cancer*. 2009;101:684-890. (査読有)
  4. Stefanie J. Klug, Meike Rensing, Jochem Koenig, Martin C Abba, Theodoros Agorastos, Sylvia MF Brenna, Marco Ciotti, BR Das, Annarosa Del-Mistro, Aleksandra Dybikowska, Anna R Giuliano, Zivile Gudleviciene, Ulf Gyllensten, Andrea LF Haws, Aslaug Helland, Simon C Herrington, Alan Hildesheim, Olivier Humbey, Sun H Jee, Jae W Kim, Margaret M Madeleine, Joseph Menczer, Hextan YS Ngan, Akira Nishikawa, Yoshimitsu Niwa, Rosemary Pegoraro, MR Pillai, Gulielmina Ranzani, Giovanni Rezza, Adam N Rosenthal, Susanta Roychoudhury, Dhananjaya Saranath, Virginia M Schmitt, Sharmila Sengupta, Wannapa Settheetham-Ishida, Hiroshi Shirasawa, Peter JF Snijders, Mark H Stoler, Angel E Suarez-Rincon, Krisztina Szarka, Ruth Tachezy, Masatsugu Ueda, Ate GJ van der Zee, Magnus von Knebel Doeberitz, Ming-Tsang Wu, Tsuyoshi Yamashita, Ingeborg Zehbe, Maria Blettner. TP53 codon 72 polymorphism and cervical cancer: pooled analysis of individual data of 15 834 women from 49 studies. *Lancet Oncology*, 10, 772-784, 2009. (査読有)
  5. Yamano Y, Uzawa K, Saito K, Nakashima D, Kasamatsu A, Koike H, Kouzu Y, Shinozuka K, Nakatani K, Negoro K, Fujita S, Tanzawa H. Identification of cisplatin-resistance related genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 126:437-449, 2009. (査読有)
  6. Negoro K, Yamano Y, Nakashima D, Saito K, Nakatani K, Shiiba M, Bukawa H, Yokoe H, Uzawa K, Wada T, Tanzawa H, Fujita S. Cross-resistance of platinum derivatives in H-1R, a cisplatin-resistant cell line. *Oncol Rep*. ;21:443-449, 2009. (査読有)
  7. Iesato, K., Tatsumi, K., Saito, K., Ogasawara, T., Sakao, S., Tada, Y., Kasahara, Y., Kurosu, K., Tanabe, N., Takiguchi, Y., Kuriyama, T., Shirasawa, H. (2008) Tiotropium bromide attenuates respiratory syncytial virus replication in epithelial cells. *Respiration*, 76, 434-441. (査読有)
  8. Hiroshi Shirasawa. (2008) Human papillomavirus vaccine. *Virus Report*, 5, 40-48. (査読有)
  9. Hayashi, Y., Shino, Y., Saito, K., Tanzawa, H., Shirasawa, H. (2008) c-Jun-mediated repression and transactivation of fibronectin. *Molecular Medicine Reports*, 1, 99-103. (査読有)
- [学会発表] (計 19 件)
1. 元 清華、齋藤 謙悟、中本 晋吾、武藤 利彦、山端 渚、白澤 浩 (2010/11/7) シンドビスウイルスRNA レプリコンのがん特異的細胞誘拐能、第58回日本ウイルス学会学術集会. 徳島.
  2. 中本 晋吾、齋藤 謙悟、元 清華、武藤 利彦、山端 渚、神田 哲郎、呉 霜、今関 文夫、横須賀 収、白澤 浩 (2010/11/7) HCVコア領域変異と治療効果との関連の検討、第58回日本ウイルス学会学術集会. 徳島.
  3. 山端 渚、齋藤 謙悟、中本 晋吾、元 清華、武藤 利彦、菱木知郎、吉田英生、白澤 浩 (2010/9/22) ヒト神経芽腫細胞におけるシンドビスウイルス構造蛋白の抗腫瘍効果、第69回日本癌学会学術総会. 大阪.
  4. 武藤 利彦、齋藤 謙悟、中本 晋吾、元 清華、山端 渚、白澤 浩 (2010/9/22) シンドビスウイルスRNA レプリコン腫瘍溶解性 第69回日本癌学会学術総会. 大阪.
  5. 齋藤 謙悟、鶴沢 一弘、元 清華、椎葉 正史、丹沢 秀樹、白澤 浩 (2010/9/22) シスプラチン含有ウイルスタンパク結合リポソームを用いた腫瘍標的治療、第69回日本癌学会学術総会. 大阪.
  6. 齋藤 謙悟、白澤 浩、丹沢 秀樹 (2009/11/7) 抗癌剤含有標的ウイルスタンパクハイブリッドリポソームの効果、第30回口腔外科例会. 千葉.

7. 齋藤 謙悟、金 忠日、亀山 雄樹、小川 知子、武藤 利彦、山端 渚、富田 善身、白澤 浩 (2009/10/25) ウシパピローマウイルスE5 (E8) の形質転換能及びMHC class I 抑制能、第57回日本ウイルス学会学術集会. 東京.
  8. 元 清華、齋藤 謙悟、八幡 江里子、武藤 利彦、山端 渚、白澤 浩 (2009/10/25) シンドビスウイルスRNAレプリコンの癌細胞特異的CPE誘導能第57回日本ウイルス学会学術集会. 東京.
  9. 森 功次、秋葉 哲哉、林志直、白澤 浩、永野 美由紀、田中 達也、保坂 三継、甲斐 明美 (2009/10/25) 急性胃炎事例におけるreal-time PCR法を用いたウイルスの迅速検索について、第57回日本ウイルス学会学術集会. 東京.
  10. 齋藤 謙悟、八幡 江里子、元 清華、武藤 利彦、山端 渚、鶴沢 一弘、丹沢 秀樹、白澤 浩 (2009/10/1) The effect of a cisplatin-encapsulating cancer-targeted liposome with viral proteins on cancer cells; シスプラチン含有腫瘍標的ウイルスタンパク結合リポソームの効果、第68回日本癌学会学術総会. 横浜.
  11. 元 清華、齋藤 謙悟、八幡 江里子、武藤 利彦、山端 渚、白澤 浩 (2009/10/1) Cancer-specific cytotoxicity of Sindbis virus RNA replicon; シンドビスウイルスRNAレプリコンのがん特異的細胞毒性、第68回日本癌学会学術総会. 横浜.
  12. 八幡江里子、齋藤謙悟、元 清華、武藤利彦、山端渚、菱木知郎、吉田英生、白澤 浩 (2009/10/1) Oncolytic effects of structural proteins of Sindbis virus on human neuroblastoma cells. ヒト神経芽腫細胞におけるシンドビスウイルス構造蛋白の抗腫瘍効果、第68回日本癌学会学術総会. 横浜.
  13. 八幡 江里子、齋藤 謙悟、白澤 浩、(2009/1/10) UV不活化シンドビスウイルスのヒト神経芽細胞に対する細胞障害性第33回小児外科学講座例会. 千葉.
  14. 齋藤 謙悟、白澤 浩 (2008/12/6) 腫瘍標的ハイブリッドリポソームの開発、第1179回千葉医学会、第29回歯科口腔外科例会. 千葉.
  15. 齋藤 謙悟、八幡 江里子、元 清華、金 忠日、鶴沢 一弘、丹沢 秀樹、白澤 浩 (2008/10/28) 腫瘍標的ウイルス蛋白結合リポソーム、第67回日本癌学会学術総会. 名古屋.
  16. 八幡 江里子、齋藤 謙悟、元 清華、金 忠日、菱木 知郎、吉田 英生、白澤 浩 (2008/10/28) 不活性シンドビスウイルスの神経芽腫に対する抗腫瘍効果、第67回日本癌学会学術総会. 名古屋.
  17. 亀山 雄樹、金 忠日、富田 善身、小川 知子、白澤 浩 (2008/10/26) ウシパピローマウイルスE5 (E8) の形質転換能及びMHC class I 抑制能、第56回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
  18. 森 功次、大貫 文、狩野 文雄、林志直、貞升 健志、永野 美由紀、秋場 哲哉、野口 やよい、仲間 晶子、矢口 久美子、白澤 浩、矢野 一好 (2008/10/26) Norovirusの塵埃感染に関する基礎的検討ーチャンパー内に噴霧したウイルス液の時間経過ともなう粒子径分布と滞留状況及び床材からの飛散についてー、第56回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
  19. Kengo Saito, M. A. Imai, K. Uzawa, K. Ogawa, H. Tanzawa, H. Shirasawa (2008/10/9) Oncolytic activity of Sindbis virus for oral cancer cells. 13<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology and 11<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine. Crete, Greece.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
白澤 浩 (SHIRASAWA HIROSHI)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：00216194
  - (2) 研究分担者  
齋藤 謙悟 (SAITO KENGO)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：70451755