

機関番号：84409

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591772

研究課題名（和文）ウイルス工学を応用した肉腫標的医薬の開発

研究課題名（英文）Development of sarcoma-targeting agents utilizing viral engineering

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）・研究所・研究員

研究者番号：50342994

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、難治性肉腫に対する新治療法の開発を目指して、均一なウイルスゲノムもつ腫瘍溶解性ウイルスシードストックの新規精製方法を確立することにある。カルポニン陽性肉腫を標的化する $d12.CALPf\Delta RR$ と固形腫瘍の腫瘍内微小環境を標的化し得る新規腫瘍溶解性 HSV-1 ウイルス（国際特許出願中） $d12ODD\Delta RR$ の BACmid 挿入ウイルスの単一クローンを分離した。大腸菌にトランスフォームして均一なウイルスゲノム DNA を Maxi-prep し、遺伝子配列を決定した。BAC への挿入前後で TK 遺伝子に一塩基の変異もないことを確認した。さらに、BACmid 配列を除去した $d12.CALPf\Delta RR$ と $d12ODD\Delta RR$ ウイルスを限界希釈法により精製した。精製した $d12ODD\Delta RR$ のウイルスが、中皮腫幹(起源)細胞分画に対して、腫瘍溶解作用をもつことを確認した。さらに、抗がん剤や分子標的薬に抵抗性を示した腫瘍から樹立した培養平滑筋肉腫細胞に対して、 $d12ODD\Delta RR$ が強い腫瘍溶解作用をもつことを確認した。

研究成果の概要（英文）：

Toward the development of a novel therapeutic strategy for sarcoma, the purpose of this study is to develop a novel procedure for purification of oncolytic viral seed stock with homogeneous viral genome DNA. Single viral genome DNA was cloned into BACmid and was purified from HSV-1 oncolytic viruses, $d12.CALPf\Delta RR$ targeting calponin-expressing sarcoma and $d12ODD\Delta RR$ targeting hypoxic microenvironment of tumor. The BACmid containing clonal viral genome was transformed into *E. Coli*, maxi-prep'ed and sequenced. No mutation, even in the single nucleotide was detected in the sequence of Thymidine kinase gene through cloning into BACmid and preparation in *E. Coli*. $d12.CALPf\Delta RR$ and $d12ODD\Delta RR$ viruses without BACmid sequence were purified by limited dilution methods. We confirmed that the purified $d12ODD\Delta RR$ virus destroyed stem (tumot-initiating) cell fraction of sarcomatous mesothelioma, and also effective for destruction of cultured leiomyosarcoma cells which were established from tumors resistant to both chemotherapy- and molecular targeted therapy.

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	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：肉腫、腫瘍溶解性ウイルス、標的遺伝子療法

1. 研究開始当初の背景

肉腫の病因、病態に関連する遺伝子解析は、DNA マイクロアレーなどを用いて国内外で進められているが、まだ治療に応用できる段階にはない。また、これまでの動物実験で、*p53* やサイトカイン、自殺遺伝子である HSV-1 チミジンキナーゼ遺伝子 (HSV-tk) などを種々のベクターを用いて肉腫細胞に直接導入する遺伝子治療法が試みられたが、十分な治療効果が得られていない。

一方、これまでに発表された細胞特異的に複製可能なウイルスには、米国ハーバード大の Martuza らによる、アルブミンプロモーターを用いた肝腫瘍選択的な制限増殖型 HSV-1 (J. Virol. 71, 5124-5132, 1997 ; 米国特許 5 7 2 8 3 7 9) や E1A 遺伝子を種々の細胞特異的プロモーターで発現制御するアデノウイルス (米国特許 5 9 9 8 2 0 5) がある。研究代表者らが開発したカルボニンおよび低酸素標的化腫瘍溶解性 HSV-1 は、TK を温存した細胞特異的増殖ウイルスであり、アシクロビル (aciclovir) やガンシクロビル (ganciclovir) によってその感染細胞とともにウイルスを死滅させることが可能であり、予期せぬウイルス感染の拡大を防ぐという安全対策の面で優れた特性を有している。したがって、TK を欠失することを特徴とする Martuza らの HSV-1 ウイルスは、ヒトの治療への応用には適さない。また、このウイルスは外来遺伝子を発現させることはできないが、研究代表者らが開発した腫瘍溶解性 HSV-1 の基本骨格は細胞特異的プロモーターの制御下に種々の標識遺伝子や治療効果を増幅する遺伝子あるいは siRNA 等を搭載することが可能であり、発現ベクターとしての機能も備えている。

腫瘍細胞を標的化する増殖型アデノウイルスが報告されているが、腫瘍溶解性ウイルスとして、HSV-1 はアデノウイルスに対して以下の優位性をもつ。1) HSV-1 ウイルスのゲノムサイズは 150kb でアデノウイルスの 35kb に比して大きく、外来遺伝子の挿入など遺伝子組換え操作が容易である、2) HSV-1 ウイルスはアデノウイルスよりも増殖速度が大きく、容易に高力価のウイルスストックを得ることができる。また、それだけが細胞破壊効果も大きい、3) HSV-1 ウイルスは細胞から細胞への細胞膜を介する感染が可能で、中和抗体存在下でも感染領域を拡大することが

できるがアデノウイルスはできない、4) アデノウイルスは生体内で強い免疫原性を持ち、アレルギー反応等を惹起し易い、5) HSV-1 ウイルスに対してはアシクロビルやパラシクロビルなどの抗ウイルス剤が市販されており、臨床応用の際の安全対策の面で優れているが、アデノウイルスには特効薬がない。研究代表者らが開発した腫瘍溶解性 HSV-1 は内在性の TK 遺伝子をもつため PET と ¹²⁴I でラベルしたウラシル誘導體 FIAU によって体内でのウイルスの増殖部位をトレースすることが可能であり、安全性のさらなる向上に役立つ。

腫瘍溶解性ウイルス遺伝子治療薬の GMP 準拠製造は、国内での実績はまだなく、既にウイルス産生細胞の GMP 準拠製造とバンキングを終了し、国内初の無菌環境下閉鎖系セルベクタープロセッシングアイソレーターの設置を完了した研究代表者らのグループは、その先端に位置しているといえる。

2. 研究の目的

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、研究代表者らは遺伝子操作で、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) 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。本研究の目的は、全体構想の実現のため、国内初の無菌環境下閉鎖系セルベクタープロセッシングアイソレーターを用いて、均一なウイルスゲノムもつウイルスシードストックの GMP に準拠した迅速な製造を可能にする新規ウイルス精製方法を確立することにある。

3. 研究の方法

ウイルスゲノム DNA の BACmid へのクローニング

薬剤としてのウイルス医薬品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。

ヘルペスウイルスゲノムの UL3 と UL4 遺伝子の polyA シグナルの中間点に BAC ベクターを挿入するための 14453bp の全人工合成 BACmid 挿入ベクターは既に作製済みである。BACmid 挿入ベクターを制限酵素の ClaI でカットし、リニアライズした後、精製したウイルスゲノム DNA と連結し、大腸菌にトランスフォームする。大腸菌の FRT/Flp リコンビナーゼ系を用いて BACmid から HSV-1 ゲノムを切り出しウイルスゲノム DNA のみを大量精製する。

HSV-1 ゲノム DNA の Vero 細胞への導入とウイルスシードストックの作製

ウイルス DNA を、既に研究代表者と研究分担者らが作製済み (GMP 準拠) で、米国での生物学的評価試験を終了した ICP4 発現 Vero デザイナーセルにリポフェクション法を用いて導入する。デザイナーセルを VP-SFM 無血清培地で培養し、単一プラークからのウイルス精製を 3 回繰り返し、ウイルスシードストックとする。ウイルスシードストックを上記 ICP4 発現 Vero デザイナーセルに感染させ、1 回のプレパレーションにつき培養ボトルごとの CPE (Cytopathic effects) を均一に維持し記録した上で、培養上清を採取し、遠心後-80℃の超低温フリーザーに保存する。

4. 研究成果

ウイルスゲノム DNA の BACmid へのクローニング

ウイルス臨床ロット製造のため、*d12*. CALPf ΔRR と固形腫瘍の腫瘍内微小環境を標的化し得る新規腫瘍溶解性 HSV-1 ウイルス (国際特許出願中) *d120DD* ΔRR の BACmid 挿入ウイルスの単一クローンを分離し、大腸菌にトランスフォームして均一なウイルスゲノム DNA を Maxi-prep した。パルスフィールド電気泳動法で BACmid ウイルスゲノム DNA のサイズを確認したのち、pCAGGS-FLPe 発現ベクターと BACmid 挿入ウイルスゲノム DNA を Vero 細胞に co-transfection し、培養上清より BACmid 配列を除去した *d12*. CALPf ΔRR と *d120DD* ΔRR ウイルスを限界希釈法により精製した。これにより、これまで国内で調整されたどの腫瘍溶解性ウイルスの試験薬よりも均一なウイルス試験薬を GMP レベルで製造するための準備が整った。

HSV-1 ゲノム DNA の Vero 細胞への導入と精製

ウイルスの効力試験

上記 BACmid 配列を除去したウイルスを、米国での生物学的評価試験を終了した ICP4 発現 Vero デザイナーセルに、リポフェクション法を用いて導入した。デザイナーセルを VP-SFM 無血清培地で培養し、培養上清からウイルスを回収し、ウイルスシードストックとした。それぞれのウイルスにつき、大腸菌の系で精製したゲノム DNA の繰り返し配列を除く領域をショットガンシーケンスし、HSV-1 のチミジンキナーゼ遺伝子の塩基配列を決定し、BACmid の挿入や大腸菌内での遺伝子増幅を経ても TK 遺伝子 (UL23) の塩基配列が一塩基も変異していないことを確認した。

BACmid を含む *d12*. CALPf ΔRR と *d120DD* ΔRR のウイルス DNA を大腸菌で Maxi-prep し、次世代シーケンサーを用いた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の決定を継続した。遺伝子挿入領域は PCR によるダイレクトシーケンスを行い、部分配列を決定した。特に昨年度配列決定した HSV-1 のチミジンキナーゼ遺伝子以外の塩基配列につき、次世代シーケンサーを用いた配列決定とショットガンシーケンス法により、ICP6 遺伝子の組み換え配列挿入部位の塩基配列を *d12*. CALPf ΔRR と *d120DD* ΔRR のウイルス DNA について解析した。

BACmid を用いて増幅し精製した *d120DD* ΔRR のウイルス粒子が、FACS で分離した CD133 (Low/-)/CD44 (+) 分画の培養中皮腫幹細胞分画に対して、腫瘍溶解作用をもつことを確認した。さらに、抗がん剤や分子標的薬に抵抗性を示した培養肉腫細胞 (平滑筋肉腫) に対して、*d120DD* ΔRR が強力な腫瘍溶解作用をもつことも確認した。

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高橋克仁、がん遺伝子治療の可能性—標的遺伝子療法による平滑筋肉腫の治療、がん治療最前線、査読無、69, 25-27, 2010
- ②高橋克仁、山村倫子、腫瘍溶解性ウイルスによる次世代のがん遺伝子治療、クリニックマガジン、査読無、479, 24-25, 2009
- ③草間俊行、山村倫子、高橋克仁他、CYVADIC 療法が奏功した肉腫型腹膜悪性上皮腫の 1 例 癌と化学療法、査読有、36, 475-478, 2009

〔学会発表〕（計7件）

- ① 山村倫子、高橋克仁、ウイルス工学を応用したがん細胞標的医薬の前臨床試験；腫瘍内低酸素微小環境の標的化、日本薬学会総会第131年会、2011年3月30日、静岡
- ② 山村倫子、村井淳、玉越智樹、高橋克仁、ウイルス工学を応用したがん細胞標的医薬の開発；がん幹細胞の標的化、第67回日本癌学会学術総会、2009年10月1日、横浜
- ③ 山村倫子、玉越智樹、村井 淳、高橋克仁、カルポニン標的化腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルスによる悪性中皮腫に対する新治療法の開発、第129回日本薬学会総会3月27日、2009年、京都
- ④ 山村倫子、高橋克仁、GIST stem cells 第66回日本癌学会学術総会、10月29日、2008年、横浜
- ⑤ 高橋克仁、山村倫子 ウイルス工学を応用した肉腫標的医薬の開発。第41回日本整形外科学会 骨軟部腫瘍学術総会、シンポジウム3、浜松、7月18日、2008（招待講演）
- ⑥ Takahashi K, Tamakoshi, T, Yamamura H Physiological role of calponin in smooth muscle regulation: A lesson from knockout mice. Experimental Biology 2008 Symposium on Calponin and Smooth Muscle Thin Filament. (San Diego, USA), April 5-9, 2008 (Invited lecture)
- ⑦ Takahashi K, Yamamura H, GIST stem cells. The 5th Biannual Kuningas Foundation GIST Symposium, Helsinki, January 18-19, 2008 (Invited lecture)

〔図書〕（計1件）

高橋克仁、山村倫子 未来の医療遺伝子治療とは、がんを治すチカラ（大阪府立成人病センター編）142-143, 2009

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：低酸素状態にある細胞で増殖するウイルスまたは遺伝子を発現するウイルスベクター

発明者：高橋克仁、山村倫子

権利者：科学技術振興機構(JST)

種類：特許

番号：特願 2008-007179、PCT/JP2009/050299

出願年月日：2009年1月13日

国内外の別：国際

○取得状況（計1件）

名称：細胞特異的発現複製ベクター

発明者：高橋克仁、山村倫子

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：第4107919号

取得年月日：2008年4月11日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mc.pref.osaka.jp/omc2/pathophysiology.html>

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）・研究所・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）・研究所・部長

研究者番号：40211338