

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2008-2009
 課題番号： 20790297
 研究課題名 (和文)
 シンドビスウイルスの腫瘍選択的溶解性機構の解明
 研究課題名 (英文)
 Elucidation of oncolytic mechanisms of sindbis virus
 研究代表者
 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

研究成果の概要 (和文) : 癌の新規治療法を開発するために、選択的腫瘍溶解性を示すシンドビスウイルス AR339 株を分離同定し、腫瘍溶解責任遺伝子の解析を行った。このウイルスには 3 つの構造蛋白遺伝子 (カプシド蛋白遺伝子 capsid、エンベロープ蛋白遺伝子 E1, E2) があり、腫瘍細胞傷害性を検索した結果、E1、E2 に高い傷害性があった。E1 による細胞傷害性の報告はなく新しい機能と考えられ、E1 タンパクが新たながん治療薬と期待できた。

研究成果の概要 (英文) :

I identified sindbis virus (SIN) has remarkable oncolytic effects on human cancer cell lines, and examined the involvement of the major components of SIN structural proteins, capsid, E2, and E1, in the oncolysis. E1 was shown to play an important role in the oncolysis. This finding suggested that the E1 protein may be used as an agent for cancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理

キーワード：腫瘍

1. 研究開始当初の背景

近年の腫瘍溶解性ウイルスは、主に制限増殖型ウイルスを用いて、低毒性化や腫瘍選択性の向上による遺伝子治療の応用として開発されてきたが、遺伝子組み換えが必要ないワイルドタイプの腫瘍溶解性ウイルスも確認されている。

トガウイルス科アルファウイルス属のシンドビスウイルスは、従来 **Oncolytic virus** として認識されていなかったが、*in vivo* で腫瘍溶解性のあることが我々の研究により最近明らかになった (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。同ウイルスは、蚊が媒介して、ヒトに感染するが、軽微な発熱が見られるだけで、低病原性ウイルスであることが知られている。

シンドビスウイルスの腫瘍溶解性メカニズムの解明は、シンドビスウイルスを腫瘍溶解性ウイルスとして治療へ応用するだけでなく、シンドビスウイルスのコンポーネントを癌治療に応用するために必要である。

しかし、現在までに、シンドビスウイルスの腫瘍溶解性は、アポトーシス誘導によることは明らかになっているが、詳しい分子メカニズムは解明されていない。

2. 研究の目的

我々は、各種悪性腫瘍細胞株（子宮頸癌、神経芽腫、肝細胞癌、口腔癌、肺癌、胃癌）（Unno et.al. Clin Cancer Res 11, 4553-4560, 2005）で、腫瘍選択的に増殖し、腫瘍溶解性を示すシンドビスウイルス AR339 株を分離している。

J. Jan 等 (J Virol. 1999 Dec;73(12):10296-302.) は、紫外線で不活化したシンドビスウイルスが腫瘍細胞融解能を持つことを報告している。我々も神経芽細胞腫株にて同様の現象を確認している（未発表データ）。このことから、シンドビスウイルスの選択的腫瘍細胞融解性には、ウイルスの複製が必須ではなく、ウイルス構造蛋白質のアポトーシス誘導能が関連していることが推測され、その分子メカニズム解明のために以下の事項を明らかにする。

3. 研究の方法

シンドビスウイルスの選択的腫瘍細胞融解性には、ウイルスの複製が必須ではなく、ウイルス構造蛋白質の腫瘍融解能が関連していることが推測されている。そこで、その責任部位の解明と、同部位の蛋白質を精製分離して、製剤としての機能の解析を、以下のように行う。

(1)シンドビスウイルスの構造蛋白質の塩基配列の解析を行い、プロトタイプの新シンドビスウイルスの塩基配列と比較検討する。塩基配列の相違と選択的腫瘍融解性との関連を推察する。

(2)シンドビスウイルスの各構造蛋白質遺伝子（カプシド蛋白質遺伝子 capsid、エンベロープ蛋白質遺伝子 E1, E2）の発現ベクターを作製する。

(3)各種正常組織初代培養細胞（角化上皮細胞、唾液腺細胞など）と、各種悪性腫瘍由来細胞株（扁平上皮癌、悪性黒色腫、唾液腺腫瘍、骨肉腫、線維肉腫、その他の腫瘍）にシ

ンドビスウイルスの構造タンパク質を発現させ、細胞生存率、形態変化、増殖性変化を調べ、正常細胞に対する毒性と、悪性腫瘍に対する腫瘍融解性を検証する。

(4)シンドビスウイルス構造蛋白質のうちの同定した選択的腫瘍融解性をもつコンポーネントの蛋白質の発現系を作成して精製を行う。

(5)精製したコンポーネント蛋白を各種悪性腫瘍由来細胞株に添加、あるいは、導入を行い、細胞変性と生存率を調べ、細胞レベルでの腫瘍溶解効果を評価する。

4. 結果

(1)シンドビスウイルスの塩基配列解析 シークエンス用プライマーを 16 個作成し、PRISM310Genetic Analyzer (ABI)で行った。プロトタイプと比較して、全構造蛋白遺伝子の塩基数は、12塩基塩長い 4117 塩基であった。変異は全部で 3 箇所あり、すべて E2 領域で起きていた。図 1 に示すように、12 塩基の挿入と、点変異が 2 か所にあり、アミノ酸が Asp から Gly へと、Val から Glu へと変化していた。現在までに、点変異の報告はあるが、挿入の報告はないため、データベースへ、Sindbis virus genomic RNA, 26S messenger RNA region, complete sequence, ov-100 variation (Accession number AB372876)として登録をした。

```

SIN      GGATCGTCTGGCAGAAGCAAAGAAGCGTCATTGACGCGTTTACCCGTGACCGCCCTAC
ov-SIN   GGATCGTCTGGCAGAAGCAAAGAAGCGTCATTGACGCGTTTACCCGTGACCGCCCTAC
SIN      TTGGGCACATGCTCGTACTGCCACCATACTGTACCGTCTTCAGCCCTGTTAAGATCGAG
ov-SIN   TTGGGCACATGCTCGTACTGCCACCATACTGTACCGTCTTCAGCCCTGTTAAGATCGAG
SIN      CAGGTCTGGGACGAAGCGGACGATAACACCATACGCATACAGACTTCGCCCGCAGTTTGA
ov-SIN   CAGGTCTGGGACGAAGCGGACGATAACACCATACGCATACAGACTTCGCCCGCAGTTTGA
SIN      TACGACCAAGCGGAGCAGCAAGCGCAAAACAAGTACCGCTACATGTCGCTTAAGCAGGAT
ov-SIN   TACGACCAAGCGGAGCAGCAAGCGCAAAACAAGTACCGCTACATGTCGCTTAAGCAGGAT
SIN      CACACCGTTAAAGAAGGCCACCATGGATGACATCAAGATTAGCACCTCAGGACCGGTGAGA
ov-SIN   CACACCGTTAAAGAAGGCCACCATGGATGACATCAAGATTAGCACCTCAGGACCGGTGAGA
SIN      AGGCTTAGCTACAAGGATACTTCTCTCGCAAAATGCCCTCCAGGGGACAGCGTAAAG
ov-SIN   AGGCTTAGCTACAAGGATACTTCTCTCGCAAAATGCCCTCCAGGGGACAGCGTAAAG
SIN      GTTAGCATAGTGAGTAGCAAGTGGCTCATTCTCAGCAACGTCATGTACACTGGCCCGC
ov-SIN   GTTAGCATAGTGAGTAGCAAGTGGCTCATTCTCAGCAACGTCATGTACACTGGCCCGC
SIN      AAGATAAAACAAAATTCGTGGGACGGGAAAAATATGATCTACCTCCCGTTCACGGTAAA
ov-SIN   AAGATAAAACAAAATTCGTGGGACGGGAAAAATATGATCTACCTCCCGTTCACGGTAAA
    
```

図 1. E2 (8631-9087) 領域シークエンス結果

(2)シンドビスウイルスの各構造蛋白質の発現ベクターの作製

各構造蛋白遺伝子を PCR 法 TA クローニングを行い、最終的に pCI-neo Manmalian Expression Vector へ導入した。

(3)シンドビスウイルスの各構造蛋白質の腫瘍溶解効果の検討

リポフェクション法にて、正常組織初代培養細胞（線維芽細胞）、各種悪性腫瘍細胞株（扁

扁平上皮癌、神経芽腫)に遺伝子導入し、蛋白を発現させ、細胞形態の観察と、生存率の測定を行った。結果は、コントロールと比較して、細胞傷害性が有意に高かった遺伝子は、扁平上皮癌ではE1とE2で、神経芽腫ではE1であった(図2)。形態観察とカスパーゼの誘導があることからE1遺伝子が細胞内でのアポトーシスを誘導していると推測できた(図3)。

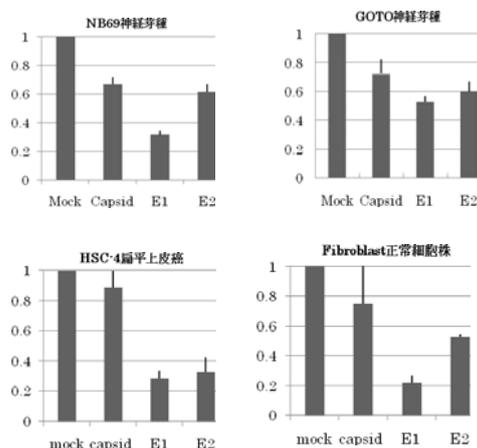


図2. 各構造蛋白導入時の細胞生存率

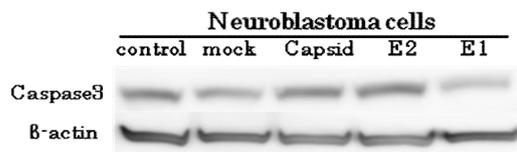


図3. カスパーゼ3の開裂状態

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2件)

1. Saito K, Shirasawa H, Isegawa N, Shiiba M, Uzawa K, Tanzawa H. Oncolytic virotherapy for oral squamous cell carcinoma using replication-competent viruses. Oral Oncology 2009 Dec;45(12):1021-7 査読有
2. 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 Aug 18;101(4):684-90. 査読有

[学会発表] (計2件)

1. Saito K., Shirasawa H., Uzawa K., Tanzawa H. The effect of a cisplatin-encapsulating cancer-targeted liposome with viral proteins on cancer cells. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Yokohama 2009.10.3
2. Saito k., Shirasawa H., Shiiba M., Uzawa K., Tanzawa H. Oncolytic activity of sindbis virus for oral cancer cells; 3th World Congress on Advances in Oncology and 11th International Symposium on Molecular Medicine: Greece Krete, 2008.10.9

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称: 腫瘍特異性を有する新型リポソーム
 発明者: 齋藤謙悟、丹沢秀樹、白澤浩、山本恵司、森部久仁一、鶴沢一弘、椎葉正史
 権利者: 千葉大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2010-086071 号
 取得年月日: 平成 22 年 4 月 2 日
 国内外の別: 国内

[その他]

DNA DATA BANK 登録

Accession number AB372876

Sindbis virus genomic RNA, 26S messenger RNA region, complete sequence, ov-100 variant.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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