

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21644

研究課題名(和文)メチオニン分解酵素遺伝子搭載によるバイスタンダー効果誘導腫瘍溶解性ウイルスの開発

研究課題名(英文)Armored oncolytic virus targeting tumor-specific amino acid metabolism

研究代表者

曾田 泰(Soda, Yasushi)

東京大学・定量生命科学研究所・特任准教授

研究者番号：00361618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：難治性悪性腫瘍に対する新規治療法として、腫瘍溶解性ウイルス(OV)療法が期待されている。これまでに、種々のウイルスについて腫瘍細胞傷害性および安全性を検討したが、抵抗性を示す腫瘍もあった。そこで本研究では、耐性克服のためにメチオニン(Met)分解酵素(METase)を利用し、(1)直接的腫瘍溶解作用、(2)Met欠乏誘導による抗腫瘍作用および(3)抗腫瘍免疫誘導作用の3作用を併せ持つ次世代OV療法の開発を試みた。種々の腫瘍細胞に対する傷害性を検討し、さらに効果を得るために改良を試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

極めて難治性のGBMは生存期間中央値約1年半で、予後の改善は数十年間ほとんど認められないため、新規治療法の開発が渴望されている。本研究で開発を目指した新規OVは、従来のOV療法が持つ作用に加え、腫瘍特異的栄養要求性を標的とした治療法である。従って、現在標準治療として行われている化学療法や放射線照射に抵抗性のGBMに対する有効性が期待される。また、METaseの利用は他のOV療法にも応用可能と考えられるので、種々の難治性腫瘍に対する有効性が期待され、学術的・社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Oncolytic virus (OV) therapy is a promising novel treatment for intractable malignant tumors. We have examined anti-tumor effect and safety of several kinds of viruses, but some tumor cells showed resistance toward them. Therefore, in this study, we targeted tumor-specific amino acid metabolism to overcome resistance, and attempted to develop next-generation OV therapies which features the following three actions: (1) direct oncolytic action, (2) anti-tumor effect by amino acid deficiency and (3) anti-tumor immunity induction. We have investigated the effect of them on various tumor cells, and are trying to improve them to obtain sufficient effect.

研究分野：腫瘍学、腫瘍治療学、遺伝子治療学、ウイルス学、血液学

キーワード：グリオブラストーマ 難治性腫瘍 腫瘍溶解ウイルス療法 腫瘍特異的栄養要求性 バイスタンダー効果

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

難治性悪性腫瘍に対して免疫チェックポイント阻害剤等様々な治療法が開発されてきたが、抵抗例も多く、新たな治療法開発は急務である。血管内皮増殖因子(VEGF)抗体等の抗血管療法は直腸癌等で生存期間を延長するが、乳癌や悪性脳腫瘍グリオブラストーマ(GBM)に対する効果は明らかで無い。GBMに対する新規治療法は、EGFRを標的とする低分子阻害剤や抗体薬、浸潤性抑制を目的としたc-Met阻害剤、免疫療法として抗PD-1抗体や免疫遺伝子治療であるキメラ抗原受容体T細胞療法等が試みられているが、十分な効果は得られていない。DNA修復酵素MGMTのプロモーター領域のメチル化は化学療法剤Temozolomide反応性の予測に有用であるが、新規治療の開発の緒とはなっていない。変異型IDHに対する阻害剤も開発されているが、IDH変異は低グレードのグリオーマや二次性GBMで頻繁に認められる一方、一次性GBMでは認められず、対象例は少ない。

一方、治療抵抗性の原因である浸潤・転移病巣や癌幹細胞(CSC)にも有効な治療法として、腫瘍溶解性ウイルス(OV)療法が開発されており、その腫瘍溶解作用に加え抗腫瘍免疫誘導作用が注目されている。GBMに対しても単純ヘルペスウイルス等を用いたOV療法が開発されており、有効性が示唆されている(Todo T, et. al., Nat Med 2022)。我々の研究室でもこれまでに、麻疹ウイルス(MV)や種々のエンテロウイルス(EV)がOVとして有用であることを見出し、開発を進めてきた(Meng X, et. al., Mol Ther 2010; Miyamoto S, et. al., Cancer Res 2012)。また、宿主免疫による排除を抑制するため高分子コーティングし、抗腫瘍効果を増強させたMVや、毒性を低減したEVの開発に成功した。一方、これらのOV療法耐性の腫瘍もあり、GBM細胞株を用いた検討でも感受性の低いものを認めた。OV療法はウイルス感染の生活環を利用したものであるため、細胞内への侵入や複製の過程において標的細胞(宿主細胞)側の要因に効果が左右され、非感受性腫瘍細胞の残存・増殖や抗腫瘍免疫からの逃避が耐性の原因となる。この問題を克服するためには、OV元来の抗腫瘍作用とは異なる作用を付与する事が有効と考えられ、種々の遺伝子改変が行われているが、耐性克服は困難である。一方、OV療法の抗腫瘍免疫誘導作用を増強するため、GM-CSFやIL-12遺伝子等の搭載が試みられている。また、シトシンデアミナーゼ搭載により、感染細胞で5-FCから5-FUへの転換による抗腫瘍効果増強を狙ったOV療法も開発されており、周囲の細胞にもある程度抑制効果を及ぼすと報告されているが、5-FUはCSCには有効でない。

そこで新たな治療標的として、腫瘍細胞特異的な高メチオニン(Met)要求性に着目した。この性質の一因としてDNAメチル化にMetが必要な事が挙げられ、Met制限は腫瘍細胞でメチル化を抑制し、増殖抑制やアポトーシスを誘導する。さらに細胞周期をS/G2期に集積させて抗癌剤感受性を増強するが、最近、Met制限食や遺伝子組み換えMETaseが抗癌剤および放射線照射の抗腫瘍効果を増強することが報告された(Gao X, et. al., Nature 2019)。我々のこれまでの検討でも、Met制限により種々の腫瘍細胞に対して傷害性が認められたが、正常細胞への影響は僅かであった。以上より、Met欠乏状態を誘導するOV療法は、従来のOV療法耐性を克服する新規治療法となることが期待された。

2. 研究の目的

最近、Met制限食による抗癌剤の効果増強作用が報告されたが、臨床応用に際してはMet分解酵素(METase)の利用により腫瘍局所でのMet欠乏状態を強力に誘導することが有効と考えた。METaseは細菌や真菌等の微生物が持つ酵素であり、微生物種によりMet分解活性や器質選択性(Homocysteine等の分解活性の有無)が異なる様々なものが存在する。しかし、今までの非増殖型ベクターを用いた遺伝子導入研究の報告では、腫瘍内で広汎かつ強力にMETaseを発現させることは難しく、明らかな効果を得ることは困難であった。一方、OV療法は増殖型ウイルスを使用するため、腫瘍内で感染が広がり、効果発現に十分な発現量が得られる可能性がある。そこで本研究では、OVにメチオニン(Met)分解酵素(METase)遺伝子を搭載した効果増強型OV(OV-MET)の開発を目指すこととした。すなわち、感染細胞中でウイルス増殖時に大量発現したMETaseが、細胞溶解時に放出されると、腫瘍環境のMetが分解され、周囲の非感染細胞は局所的Met欠乏状態になり傷害を受ける。一方で、正常細胞は腫瘍選択性の高いOVにもMet欠乏にも耐性であり、さらにMETase自体は毒性を持たないため、安全性は高いと考えられる。従って、OV-MET療法は、(1)直接的腫瘍溶解作用に加え、バイスタンダー効果として(2)Met欠乏誘導による抗腫瘍作用と(3)抗腫瘍免疫誘導作用の3つの異なる作用を併せ持つ強力な次世代OV療法となることが期待される。以上より、本研究で抗腫瘍効果が証明されれば、臨床応用に繋げることも可能と考えられる。さらに、METaseの利用は様々なOV療法に応用可能と考えられるため、幅広い癌種に対する有効性が期待され、臨床的にも重要な意義を有する。

3. 研究の方法

本研究では、OV-METを開発することを目的とし、以下に記した方法で検討を行った。

(1) Met制限による細胞傷害性の検討

①腫瘍細胞株：U-87MG, A172 等のヒト GBM 細胞、H1299 等の肺癌細胞および Jurkat 等の造血器腫瘍細胞は ATCC より入手し、FBS 添加 DMEM, MEM または RPMI1640 培地で維持した。マウス GBM 幹細胞 (GSC) は GBM マウスモデルより樹立し、N-2 supplement、EGF および bFGF を添加した DMEM/F12 (1:1) 培地 (N2 培地) を用いたスフェロイド形成培養で維持した (Marumoto T, et. al., Nat Med. 2009)。

②正常細胞：正常マウス脳より分離したマウス神経系前駆細胞 (mNPC) は N2 培地で培養した。ヒト神経系前駆細胞 (hNPC) は iPS 細胞由来細胞を購入し (Elixirgen Scientific)、プロトコールに従って培養した。ヒト正常肺線維芽細胞 MRC-5 は FBS 添加 MEM で培養した。CD34 陽性ヒト造血前駆細胞 (HPC) は SCF, Flt-3L, IL-3 存在下で培養した。

③Met 制限培養：Met 不含 DMEM, RPMI1640 培地に透析 FBS およびビタミン B12 を添加した培地に、Met を最終濃度 0~30 μ M になるように添加した。マウス GSC については、透析 FBS の代わりに N-2 supplement、EGF および bFGF を添加した。

④細胞傷害性の評価：ヒト GBM 細胞、肺癌細胞および造血器腫瘍細胞を 96 ウェルプレートに播種し、各濃度のメチオニン存在下で培養し、3-7 日後に生細胞数を計測した。マウス GSC はポリ L リジン処理 96 ウェルプレートに播種して計測した。生細胞数の計測は WST 法またはプレートイメジャーによる自動計測法により行った。低酸素状態での検討はマルチガスインキュベーターを用いて、2%O₂ で行った。

(2) METase 遺伝子導入による細胞傷害性の検討

①METase 遺伝子：種々の微生物の METase について、酵素活性および選択性を指標にして抗腫瘍効果が期待されるものを選択し、組み換えベクターを作製した。

②METase 遺伝子発現レンチウイルスベクター (LV-MET) の作製：第三世代自己不活化レンチウイルスベクタープラスミドに METase 遺伝子を組み換え、パッケージングプラスミドと共に 293T 細胞にトランスフェクションした。2-3 日後に上清を回収し、超遠心で濃縮した。力価はマーカーとして用いた GFP の発現を指標に決定した。コントロールベクターとして GFP のみ発現するレンチウイルスベクター (LV-GFP) も同様に作製した。

③METase 活性の評価：METase 活性は遺伝子導入細胞内の酵素活性および Met 濃度低下により評価した。酵素活性は、METase による代謝産物である α ケト酪酸の濃度を測定することにより行った。細胞内 Met 濃度は高速液体クロマトグラフィー法により測定した (SRL)。

④METase 遺伝子導入による各種細胞への影響の検討：各種 GBM 細胞株、肺癌細胞、造血器腫瘍細胞株ならびに正常細胞に LV-MET または LV-GFP を感染させ、細胞傷害について評価した。細胞は 96 ウェルプレートに播種し、各濃度のメチオニン存在下で培養し、3-7 日後に生細胞数を計測した。生細胞数の計測は上記と同様の方法で行った。

(3) OV-MET の作製と抗腫瘍効果の検討

①OV-MET の作製：各種 OV プラスミドに METase 遺伝子を挿入し、ヒトまたは動物培養細胞にトランスフェクションし、数日後にウイルスを含む上清を回収した。これを培養細胞に接種し、感染細胞の上清または細胞を回収・処理後、ウイルスストックとして回収し、凍結保存した。

②OV-MET 感染による各種細胞への影響の検討：GBM 細胞株、肺癌細胞株ならびに NPC 等正常細胞に OV-MET または元の OV を接種し、2-4 日後に細胞傷害性について評価した。

③*in vivo* の抗腫瘍効果検討：免疫不全マウスへの GBM 細胞移植モデルおよび正常免疫 GFAP-Cre マウスを使用した遺伝子導入モデル (Marumoto T, et. al., Nat Med 2009) を使用する。遺伝子導入 GBM モデルに必要な Tomo-Ras-sh53 LV は LV-MET と同様の方法で作製した。

4. 研究成果

(1) Met 制限による細胞傷害作用

U87 等 GBM 細胞、H1299 等肺癌細胞株や Jurkat 等造血器腫瘍細胞株に対して強い細胞傷害性を及ぼすことが確認された。また、U251 や SUP-B19 等、一部の GBM または造血器腫瘍細胞株も Met 制限により傷害されたが、効果は比較的弱いものであった。一方、正常の線維芽細胞、NPC や HPC に対する Met 制限の影響は軽微なものであった。

(2) METase 遺伝子導入による細胞傷害性の検討

①METase 遺伝子発現レンチウイルスベクター (LV-MET) の作製：LV-MET を作製したところ、十分な力価のベクターが得られていることが確認された。また、微生物 X 由来の METase について、導入細胞内で Met 濃度の著明な低下が確認された。

②LV-MET 導入による細胞傷害性の検討：これまでの報告では、非増殖型ベクターによる METase 遺伝子導入は細胞傷害性をほとんど誘導しないことが知られているが、本研究でも H1299 や U87 等多くの細胞で明らかな細胞傷害性は認められなかった。一方、一部の造血系細胞において著明な細胞傷害が認められた。

これらの結果より、我々が選択した微生物 X 由来 METase の酵素活性と細胞傷害性が確認され、OV 療法への応用が可能と考えられ、以下の検討を行うこととした。

(3) OV-MET の作製と細胞傷害性の検討

- ①OV-MET の作製：OV プラスミドに METase 遺伝子を挿入しウイルスを作製したところ、十分な力価を持つ OV の作製が確認された。一方で当初、感染細胞での METase 活性が不十分であることが疑われた。METase 失活の可能性等について検討を加え、最終的に METase 発現を誘導するウイルスの産生が確認された。
- ②OV-MET 感染による各種細胞への影響の検討：GBM 細胞株および肺癌細胞株に OV-MET を接種したところ、MOI 依存性の細胞傷害性が認められた。さらに、NPC 等正常細胞に対する影響について検討を行っている。
- ③OV 抵抗性腫瘍細胞に対する影響の検討：腫瘍中に混在する OV 抵抗性細胞に対する OV-MET の影響を検討するため、OV 高感受性細胞 (U87 等) および OV 低感受性細胞 (A172 等) の混合培養系を用いて、上記と同様に検討した。
- ④OV-MET の改良：OV-MET の非感受性細胞に対する効果を増強するため、遺伝子改変 METase (eMETase) の作製を行った。まず、eMETase 発現 LV を作製し、各種腫瘍細胞株に導入したところ、より強力な Met 制限効果が認められた。今後、eMETase 発現 OV を作製し、抗腫瘍効果について検討を行う。
- ⑤GBM マウスモデル作製の準備：レンチウイルスベクターによる遺伝子導入 GBM モデル作製に必要な GFAP-Cre マウスの導入・繁殖を行った。また、注入するレンチウイルスベクター Tomo-Ras-shp53 LV の作製を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Sakamoto Akira, Inoue Hiroyuki, Miyamoto Shohei, Ito Shun, Soda Yasushi, Tani Kenzaburo	4. 巻 13
2. 論文標題 Coxsackievirus A11 is an immunostimulatory oncolytic virus that induces complete tumor regression in a human non-small cell lung cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5924
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-33126-x	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 SAGARA MIYAKO, MIYAMOTO SHOHEI, ITOH SHUN, SODA YASUSHI, TANI KENZABURO	4. 巻 41
2. 論文標題 Development of New Oncolytic Virotherapy Targeting Breast Cancer Using Coxsackievirus B3	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 81～89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancer.14753	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirose Lisa, Hiramoto Takafumi, Tian Yamin, Kohara Hiroshi, Kobayashi Seiichiro, Nagai Etsuko, Denda Tamami, Tanaka Yukihisa, Ota Yasunori, Jiyan Liao, Miyamoto Shohei, Miura Yoshie, Hijikata Yasuki, Soda Yasushi, Inoue Takashi, Okahara Norio, Itoh Toshio, Sasaki Erika, Tojo Arinobu, Uchimaru Kaoru, Tani Kenzaburo	4. 巻 49
2. 論文標題 A pilot study to establish human T cell leukemia virus type 1 (HTLV 1) carrier model using common marmoset (Callithrix jacchus)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medical Primatology	6. 最初と最後の頁 86～94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jmp.12454	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kodama K, Soda Y, Liao J, Miyamoto S, Yotsuyanagi H, Tani K.
2. 発表標題 5-ALA combined with SFC improves anemia in SCD mouse models.
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sagara M, Miyamoto S, Ito S, Sakamoto A, Soda Y, Akiyama T, Tani K.
2. 発表標題 Preclinical studies of a second-generation recombinant coxsackievirus B3.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本 将平、相良 京、伊藤 駿、坂本 旭、曾田 泰、谷 憲三朗
2. 発表標題 第二世代遺伝子改変 miRNA 標的配列搭載コクサッキーウイルス B 群 3 型の非臨床毒性試験
3. 学会等名 第28回日本遺伝子治療学会学術集
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sakamoto A, Miyamoto S, Sagara M, Ito S, Soda Y, Akiyama T, Tani K.
2. 発表標題 A novel echovirus 4 shows noticeable oncolytic activity against esophageal cancer.
3. 学会等名 第27回日本遺伝子治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ito S, Miyamoto S, Sagara M, Sakamoto A, Soda Y, Akiyama T, Tani K.
2. 発表標題 Development of gene modified oncolytic coxsackievirus for clinical trial.
3. 学会等名 第27回日本遺伝子治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kodama K, Soda Y, Ohno H, Liao J, Miyamoto S, Yotsuyanagi H, Tani K.
2. 発表標題 5-Aminolevulinic acid combined with sodium ferrous citrate prevents bleeding stress and LPS-induced lethality in sickle cell disease mouse models.
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sakamoto A, Miyamoto S, Sagara M, Ito S, Soda Y, Akiyama T, Tani K.
2. 発表標題 A novel echovirus 4 shows remarkable oncolytic capacity against esophageal cancer.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ito S, Miyamoto S, Sagara M, Sakamoto A, Soda Y, Akiyama T, Tani K.
2. 発表標題 Development and manufacturing of miRNA-regulated oncolytic virus for clinical trial.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 児玉健、曾田泰、廖紀元、宮本将平、四柳宏、谷憲三朗
2. 発表標題 5-アミノレブリン酸とクエン酸第一鉄ナトリウムの併用は鎌状赤血球症モデルマウスの貧血を改善し、LPS誘発致死を防ぐ
3. 学会等名 第10回ポルフィリン-ALA学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Liao J, Soda Y, Sugawara A, Miura Y, Hiramoto T, Tahara M, Takishima Y, Miyamoto S, Takeda M, Tani K
2. 発表標題 Non-Integrating Measles Virus Vector is a Promising Tool for Naive iPSCs Generation and T-cell Engineering
3. 学会等名 23rd Annual Meeting of the American-Society-for-Gene-and-Cell-Therapy (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hara K, Miyamoto S, Sagara M, Hirose-Yotsuya L, Sakamoto A, Soda Y, Tani K
2. 発表標題 Oncolytic Coxsackievirus Therapy as an Immunostimulator
3. 学会等名 23rd Annual Meeting of the American-Society-for-Gene-and-Cell-Therapy (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kodama K, Soda Y, Liao J, Miyamoto S, Yotsuyanagi H, Tani K
2. 発表標題 Inhibition of sickling by 5-Aminolevulinic Acid in Sickle Cell Disease Mouse Models
3. 学会等名 第82回日本血液学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miyamoto S, Itoh S, Sagara M, Soda Y, Hara K, Sakamoto A, Liao J, Kodama K, Tani K
2. 発表標題 MicroRNA-Targeted Oncolytic Virotherapy for Triple-Negative Breast Cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔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
研究 分担者	宮本 将平 (Miyamoto Shohei) (20758536)	東京大学・定量生命科学研究所・特任講師 (12601)	
研究 分担者	廖 紀元 (Liao Jiyuan) (90781857)	東京大学・定量生命科学研究所・特任研究員 (12601)	

	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
研究 協力者	谷 憲三朗 (Tani Kenzaburo)		
研究 協力者	坂元 宏行 (Sakamoto Hiroyuki)		
研究 協力者	伊藤 駿 (Ito Shun)		
研究 協力者	相良 京 (Sagara Miyako)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	坂本 旭 (Sakamoto Akira)		
研究協力者	児玉 健 (Kodama Ken)		

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