

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24 5月 11日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390536

研究課題名（和文） 口腔癌に対する腫瘍融解性ウイルス療法に関する研究

研究課題名（英文） Study of oncolytic virotherapy for oral cancer

研究代表者

由良 義明 (YURA YOSHIAKI)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：00136277

研究成果の概要（和文）：腫瘍融解性ウイルス療法は弱毒化ウイルスを腫瘍に感染させ、細胞変性効果によって腫瘍を破壊する治療である。本研究では神経毒性遺伝子 $\gamma_134.5$ を欠失した単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)R849と細胞融合能を持つHFを親株としてRH2を作製し、その抗腫瘍作用ならびに次世代高速シーケンシング技術を用いて遺伝子構造の解析を行った。RH2は強い細胞融合能を有し、口腔扁平上皮癌治療に有用と考えられる。さらに、HF10と違って神経毒性遺伝子を欠失するため、脳腫瘍にも適応できるウイルスベクターといえる。

研究成果の概要（英文）：Oncolytic virotherapy has been developed to destroy tumor cells by the cytopathic effect of virus vectors. In the present study, we produced a recombinant herpes simplex virus type 1 (HSV-1) RH2 using R849 with LacZ gene at the deleted site of neurovirulent $\gamma_134.5$ gene and strain HF with fusogenic ability. Nucleotide sequences of RH2 were determined with Genome Sequencer FLX. RH2 induced large syncytia in squamous cell carcinoma (SCC) cells and was deficient of neurovirulent gene. It can be used as a vector for the treatment of brain tumor as well as oral SCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：腫瘍融解性ウイルス療法・ヘルペスウイルス・組換え体・細胞融合・遺伝子構造

1. 研究開始当初の背景

腫瘍融解性ウイルス療法は弱毒化したウイルスを腫瘍に感染させ、その細胞変性効果によって腫瘍を破壊する治療である。本療法のベクターとして、最も研究が進んでいるのが単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)である。わが国でも名古屋大学では、HSV-1の自然変異型である HF10 を用いた臨床研究が行われており、乳癌のリンパ節転移、頭頸部癌、膵臓癌に有効とされている。ウイルス治療は臨床応用の段階に入ったといえる。

当教室では、口腔粘膜に親和性をもつ HSV-1 に着目し、神経毒性遺伝子 $\gamma_134.5$ を欠失させた複製可能型変異 HSV-1 R849 ならびに HF10 の元株である HF による口腔扁平上皮癌に対する腫瘍融解作用の研究を行ってきた。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌細胞に対するウイルスベクターによる腫瘍融解を研究する過程で、R849 を腫瘍内に投与し、2 回目に HF を投与したところ、R849 を 2 回用いた場合よりも抗腫瘍効果が顕著に増強されることを見出した。そこで、これら 2 種類の HSV-1 を培養細胞系で共感染を行い、神経毒性遺伝子 $\gamma_134.5$ がなく、しかも細胞融合で細胞間を伝播するといった両ウイルスの長所を併せ持つ組換え体ウイルスを作製して、その抗腫瘍効果を明らかにし、さらに臨床応用を念頭に置き、遺伝子構造を決定することを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 共感染による組換え体ウイルスの作製

HSV-1 として、 $\gamma_134.5$ 遺伝子を欠失させ LacZ 遺伝子を挿入した R849 と細胞融合能を有し病原性が低下した HSV-1 の HF 株を用いる。サル腎由来 Vero 細胞に感染させた場合、R849 感染では細胞は円形化し、LacZ 発現に

より X-gal 染色で青色を呈する。HF は細胞融合を誘導するが、X-gal では染色されない。Vero 細胞に R849 と HF を共感染し、産生されるウイルス量を回収する。得られたウイルスにつき、Vero 単層細胞でブラックアセイを行い、X-gal 染色陽性でしかも細胞融合型の細胞変性を示す組換え体を複数分離し、クローニングを繰返して純化する。

(2) 組換え体ウイルスの性状の解析

① 口腔扁平上皮癌細胞に HSV-1 を感染させ経時的にウイルスを回収し、ウイルス産生量をブラックアセイで測定する。ウイルス感染による細胞傷害性は MTT 法と LDH 遊離法で測定する。

② ノードマウス背部皮下に SCC 細胞を接種し形成された腫瘍に、R849、HF ならびに組換え体ウイルスを投与して、経時的に腫瘍径を測定する。腫瘍内ウイルスについては、腫瘍をホモゲナイズし、遠心上清中のウイルス量をブラック法で測定する。ウイルス増殖による組織変化は、組織の X-gal 染色、H-E 染色にて観察する。

(3) ウイルス感染に対する超音波照射の効果

超音波診断用造影剤であるとマイクロバブルに超音波エネルギーを照射するとバブルが破裂してジェット流が発生し、細胞膜に一過性の小孔を生じ細胞外物質を細胞内に導入できるとされている。この手法をソノポレーションと呼ぶ。マイクロバブル存在下でソノポレーションの効果は向上する。ポリスチレンの培養プレートで増殖させた Vero 細胞、SAS 細胞に R849 を感染させ、一定時間の吸着を行ったのち、マイクロバブル存在下ならびに非存在下にプレートの底面から超音波照射を行う。形成されたブラック数からウ

イルスの導入効率を求める。

(4) 組換え体ウイルスの遺伝子構造の解析

培養液中へ産生された組換え体ウイルス RH2 を精製し、DNA を抽出する。Genome Sequencer FLX (GS-FLX) (454 Life Science Corporation) を用いてウイルス DNA の全塩基配列につき高速シーケンシングを行う。得られた塩基配列を既報の strain F ならびに HF10 と比較する。高速シーケンシングで決定できなかった gap については、その両端にプライマーを設定して、Sanger 法によるシーケンシングを行う。塩基配列の比較にはソフトウェアとして DNASIS (Hitachi software), Genious pro (Biomatters) を用いる。

4. 研究成果

(1) 組換え体ウイルスの分離

ヒト口腔扁平上皮癌に対して強い腫瘍融解性を示す HSV-1 ベクターを作製するため、R849 と HF を Vero 細胞に共感染させ、X-gal 染色陽性でしかも細胞融合を示すウイルスを分離した。これらを純化して、口腔扁平上皮癌 SAS 細胞で安定して細胞変性効果を示すウイルスを分離し、RH1、RH2 と命名した。

図 1 は R849 と RH2 を感染させた SAS 細胞で RH2 感染では広範な細胞融合部位での X-gal 染色陽性像がみられる。

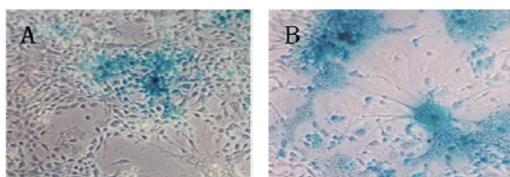


図 1 R849 (A) と RH2 (B) を感染させた口腔上皮癌細胞の形態変化と LacZ 遺伝子発現
B の感染では LacZ 遺伝子発現によって X-gal 染色陽性となった巨大な融合細胞がみられた。

(2) ウイルス DNA における LacZ の検出

組換え体ウイルス RH1、RH2 のウイルス DNA

を抽出し、LacZ ならびに $\gamma_134.5$ 遺伝子に対するプライマーを設定し、polymerase chain reaction (PCR) を行ったところ、R849、RH1、RH2 では LacZ が検出された。これに対して、 $\gamma_134.5$ 遺伝子は HF と RH1 で検出された (図 2)。したがって、RH2 は 2 コピーの $\gamma_134.5$ 遺伝子を欠失し、LacZ 遺伝子を保有する HSV-1 といえる。

RH2 は親株よりも大きな細胞融合体を形成し、 $\gamma_134.5$ 遺伝子を欠失するため、口腔扁平上皮癌治療用ベクターとして有用性が高いと考えられた。

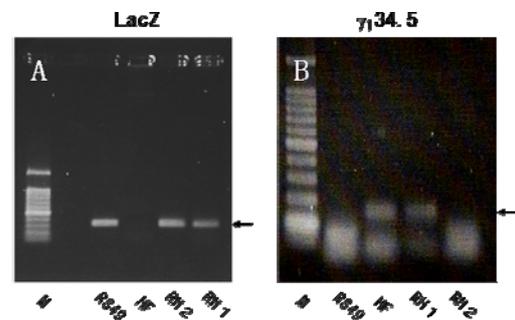


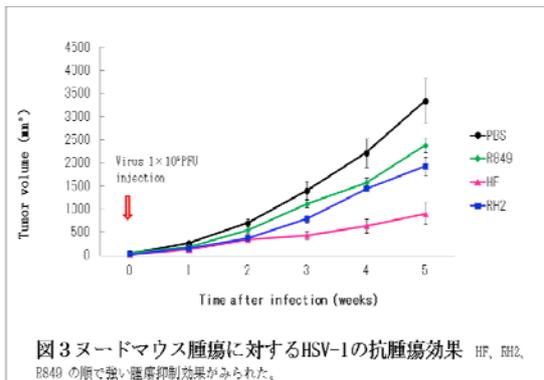
図 2 PCR による LacZ (A) と $\gamma_134.5$ (B) の検出
RH2 では LacZ は検出されるが、 $\gamma_134.5$ 遺伝子は検出されなかった。矢印は増幅産物を示す。

(3) 組換え体 RH2 の腫瘍抑制効果

RH2 の腫瘍組織における増殖様式を検討した。SAS 細胞 1×10^6 個をヌードマウス皮下に接種し、腫瘍径が 5 mm に達したところで、 1×10^6 plaque forming unit (PFU) の RH2 を腫瘍内へ投与した。腫瘍内の感染ウイルス量を経時的に測定したところ、7 日まで次第に減少するが 14 日目ではやや増加がみられ、腫瘍内でも増殖能を発揮するものと考えられた。

ヌードマウス腫瘍に PBS を投与した対照群では経時的に腫瘍体積は増加したが、HSV-1 を投与した群ではいずれも腫瘍体積の増加は抑制され、対照よりも低値となった (図 3)。HSV-1 として RH2、HF を投与したものでは、対照との間で有意差がみられ

た。RH2 よりも HF で低値となったが、両群間で有意差はなかった。



(4) 超音波照射による感染効率の向上

腫瘍融解性ウイルス療法では、腫瘍内に接種したのち、短時間でウイルスを腫瘍細胞に感染させる必要がある。R849 を Vero 細胞ならびに SAS 細胞に感染させ、10、30 分間の吸着後に超音波照射すなわちソノポレーションを行い、洗浄にて未吸着ウイルスを除去してブラック形成を行ったところ、ブラック数は非処理対照と比較して超音波照射群で有意に増加した。マイクロバブル存在下で効果はより顕著であった。したがって、ソノポレーションはヒト口腔扁平上皮癌細胞に対して、感染効率を向上させることが示された。

(5) 組換え体ウイルス RH2 の遺伝子構造の決定

次世代シーケンサーGS-FLXを用いてRH2のシーケンシングを行い、得られたデータを集合して contig を作成した。gap について PCR を行い Sanger 法で決定した。その結果、RH2 の総塩基数は 149,643 bp であった。HSV-1 遺伝子は unique long (UL) と unique short (US) 領域とこれらの両端に存在する反復配列からなる。PCR で増幅困難であった反復領域の一部を除き、遺伝子をコードする 71 個の open reading frame (ORF) はすべて塩基配列を決定することができた。株間で 100% 一致するもの

を探索したところ、UL 領域では RH2 と strain F あるいは HF10 との一致率はそれぞれ 36.2% と 45.3%、US 領域ではそれぞれ 7.7% と 69.2% であり、特に US 領域は HF10 に近似した構造であった。これら遺伝子の ORF をアミノ酸に翻訳して親株と比較すると RH2 でに特有のアミノ酸変化を認める遺伝子が 12 個認められた。UL27 (gB) 以外に US4、US6 といった糖蛋白質も含まれていた。細胞融合に関与する遺伝子 UL27 (gB) は HF10 と同様 817 番の Leu が Pro に変異しており、RH2 の強い細胞融合性に関与すると考えられた。一方、HF10 のような遺伝子 UL56 の欠失はみられなかった。これら遺伝子解析結果から、塩基配列全体が決定された第 5 番目の HSV-1 株として RH2 を日本遺伝子データバンク (DNA Bank of Japan: DDB) に登録 (アクセス名 RH2 ACCESSION AB618031) 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 20 件)

- ① Shintani M, Takahashi G, Hamada M, Okunaga S, Iwai S, Yura Y: Effect of ultrasound on herpes simplex virus infection in cell culture. *Virology Journal* 8:446, 2011. 査読有
10.1186/1743-422X-8-446
- ② Takaoka H, Takahashi G, Ogawa F, Imai T, Iwai S, Yura Y: A novel fusogenic herpes simplex virus for oncolytic virotherapy of squamous cell carcinoma. *Virology Journal* 8:294, 2011. 査読有
10.1186/1743-422X-8-294
- ③ Fujita Y, Yamamoto N, Kato I, Iwai S, Ono K, Sakurai Y, Ohnishi K, Ohnishi T, Yura Y: Induction of multinucleation in oral squamous cell carcinoma tissue

with mutated p53 surviving boron neutron capture therapy.

International Journal of Radiation Biology 87(3) 293-301, 2011. 査読有

- ④ Hamada M, Miki T, Iwai S, Shimizu H, Yura Y: Involvement of RhoA and RalB in geranylgeranyltransferase I inhibitor-mediated inhibition of proliferation and migration of human oral squamous cell carcinoma cells. Cancer Chemotherapy and Pharmacology 68(3):559-569, 2011. 査読有
- ⑤ Iwai S, Yonekawa A, Harada C, Hamada M, Katagiri W, Nakazawa M, Yura Y: Involvement of the Wnt- β -catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells. International Journal of Oncology 37(5):1095-1103, 2010. 査読有
- ⑥ Fujita Y, Kato I, Iwai S, Ono K, Suzuki M, Sakurai Y, Ohnishi K, Ohnishi T, Yura Y: Role of p53 mutation in the effect of boron neutron capture therapy on oral squamous cell carcinoma. Radiation Oncology 4(1):63, 2009. 査読有 10.1186/1748-717X-4-63
- ⑦ Noda T, Iwai S, Hamada M, Fujita Y, Yura Y: Induction of apoptosis of detached oral squamous cell carcinoma cells by safingol. Possible role of Bim, focal adhesion kinase and endonuclease G. 14(3):287-297, 2009. 査読有
- ⑧ Katsura T, Iwai S, Ota Y, Shimizu H, Ikuta K, Yura Y: The effects of trichostatin A on the oncolytic ability of herpes simplex virus for oral squamous cell carcinoma cells. Cancer Gene Therapy 16 (3), 237-245,

2009. 査読有

[学会発表] (計 32 件)

- ① 若林 健、濱田正和、竹下彰範、飯井孝年、奥長秀介、岩井聡一、由良義明: PKC alpha 阻害剤 safingol による細胞死にけるミトコンドリア分裂の関与. 第 48 回日本口腔組織培養学会学術大会 2011.11.19. 浦安市
- ② 飯井孝年、高橋 元、新谷素子、若林 健、奥長秀介、竹下彰範、岩井聡一、由良義明: 扁平上皮癌に対する腫瘍融解ウイルス療法の抗腫瘍効果. 第 56 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2011.10.22. 大阪市
- ③ 濱田正和、岩井聡一、米川敦子、森田祥弘、由良義明: 口腔扁平上皮癌に対するゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ阻害剤とプロテインキナーゼ阻害剤の併用効果の検討. 第 70 回日本癌学会学術総会 2011.10.3. 名古屋市
- ④ Takahashi G, Okunaga S, Meshii N, Shintani M, Yura Y: Induction of syncytia in squamous cell carcinoma tissue by oncolytic herpes simplex virus type 1. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress International Congress of Virology 2011.9.13. Sapporo City
- ⑤ 高橋 元、飯井孝年、濱田正和、山本直典、岩井聡一、由良義明: 複製可能型腫瘍融解性ヘルペスウイルス (HSV-1) の作製および腫瘍内増殖様式の検討. 第 35 回日本頭頸部癌学会 2011.6.9. 名古屋市
- ⑥ 高橋 元、飯井孝年、新谷素子、由良義明: 変異型単純ヘルペスウイルス 1 型 RH2 の遺伝子解析と腫瘍内増殖様式. 第 58 回日

- 本ウイルス学会学術集会 2010. 11. 9 徳島市
- ⑦ 新谷素子, 高橋 元, 濱田正和, 山本直典, 青田桂子, 岩井聡一, 由良義明: Sonoporationが腫瘍融解性ウイルスの感染に及ぼす影響. 第55回日本口腔外科学会総会・学術大会 2010. 10. 18. 千葉市
- ⑧ Hamada M, Miki T, Iwai S, Yura Y: Involvement of GTPase RhoA and RalB in geranylgeranyltransferase I inhibitor-mediated inhibition of proliferation and migration of human oral squamous cell carcinoma cells. 第69回日本癌学会学術総会 2010. 9. 22 大阪市
- ⑨ 高橋 元, 新谷素子, 濱田正和, 山本直典, 飯井孝年, 由良義明: 細胞融合性ヘルペスウイルスの腫瘍内増殖様式の検討. 第64回日本口腔科学会学術集会 2010. 6. 24. 札幌市
- ⑩ 新谷素子, 三木哲英, 濱田正和, 青田桂子, 岩井聡一, 由良義明: 超音波照射が腫瘍融解性ウイルス療法への感染に及ぼす影響. 第64回日本口腔科学会学術集会 2010. 6. 24. 札幌市
- ⑪ 高橋 元, 新谷素子, 由良義明: 腫瘍融解性ヘルペスウイルスの腫瘍内増殖様式の検討. 第57回日本ウイルス学会 2009. 10. 25. 東京都
- ⑫ 三木哲英, 濱田正和, 赤垣俊輔, 新谷素子, 野田隆之, 青田桂子, 岩井聡一, 由良義明: GGTase I 阻害剤が口腔扁平上皮癌細胞の増殖ならびに遊走能に及ぼす影響. 第54回日本口腔外科学会総会 2009. 10. 9. 札幌市
- ⑬ Yura Y, Takaoka H, Ogawa F, Shintani M, Iwai S: A novel fusogenic herpes simplex virus mutant for oncolytic

virotherapy of oral squamous cell carcinoma. 2nd World Congress of the International Academy of Oral Oncology (IAOO) 2009. 7. 11 Tronnto

- ⑭ 新谷素子, 高岡洋生, 濱田正和, 青田桂子, 岩井聡一, 由良義明: 新規細胞融合性ウイルスの口腔扁平上皮癌細胞と担癌動物における抗腫瘍効果の検討. 第63回日本口腔科学会学術集会 2009. 4. 17. 浜松市
- ⑮ 三木哲英, 野田隆之, 濱田正和, 青田桂子, 岩井聡一, 由良義明: グラニルグラニルトランスフェラーゼ阻害剤GGTI-298とsafingol併用による口腔扁平上皮癌細胞のアポトーシス誘導. 第63回日本口腔科学会学術集会 2009. 4. 16. 浜松市

〔図書〕(計2件)

- ① 由良義明, 岩井聡一 全日本病院出版会 歯科・口腔外科疾患、特集・口腔内ウイルス感染の診断と治療、ENTONI 2011, 55-60.
- ② 由良義明 医歯薬出版 口腔粘膜疾患、口腔外科学第3版、2010、163-181.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

由良 義明 (YURA YOSHIKI)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 00136277

(3) 連携研究者

岩井 聡一 (IWAI SOICHI)
大阪大学・歯学研究科・助教
研究者番号: 10362675

濱田 正和 (HAMADA MASAKAZU)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号: 80506361