

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09170

研究課題名(和文) 不活化ウイルス粒子を用いた悪性髄膜腫に対する革新的核酸療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel oligonucleotide therapy for malignant meningioma using inactivated viral particle

研究代表者

松田 真秀 (Matsuda, Masahide)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：30614333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：HVJ-E (HVJ envelope) はセンダイウイルス (HVJ: hemagglutinating virus of Japan) のゲノムRNAを破壊し複製能力を失わせた不活化粒子である。HVJ-Eは内部に封入した治療分子を標的細胞に導入することが可能なベクターであるとともに、それ自身が抗腫瘍効果をもたらすという特徴を有する。本研究では、HVJ-Eを用いてmiR-34aを治療核酸分子として悪性髄膜腫細胞に導入することが、survivin抑制を介したアポトーシスを誘導し、悪性髄膜腫に対する強力な抗腫瘍効果を発揮することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性髄膜腫に対しては手術と放射線治療以外の標準的薬物療法が全く存在せず、新たな治療法の開発が急務となっている。近年髄膜腫における腫瘍発生や悪性化に関わる数多くの分子遺伝学的背景が明らかになってきたなかで、分子標的療法の開発が期待されている。本研究は、悪性髄膜腫の生物学的特性に関わるmiRNAをベクター自身が抗腫瘍効果を発揮するHVJ-Eを用いて導入するというこれまでにない新たなアプローチである。このような核酸を治療分子として用いる新規分子標的療法は、今後新たに同定されるであろう様々な治療標的分子への応用可能性も秘めており、悪性髄膜腫治療におけるブレイクスルーになると期待される。

研究成果の概要(英文)：Hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E) is a replication-defective inactivated virus particle made from Sendai virus (HVJ) by treating with ultraviolet irradiation to destroy the viral genome RNA. HVJ-E itself has antitumor activity, although it was originally developed as a versatile drug delivery system. In the present study, we have demonstrated that introduction of miR-34a as a therapeutic nucleic acid molecule into malignant meningioma cells using HVJ-E induces apoptosis via survivin suppression and exerts a potent antitumor effect against malignant meningiomas.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：不活化ウイルス粒子 悪性髄膜腫 核酸医薬療法 miR-34a

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1). 悪性髄膜腫は手術治療による根治が期待できず短期間に再発を繰り返す予後不良な疾患であるが、他の悪性脳腫瘍とは異なり手術と放射線治療以外の標準的薬物療法が全く存在せず、新しい治療法の開発が急務となっている。そのような中で、近年の次世代シーケンズの導入に伴って髄膜腫のゲノムスクリーニングが活発に行われた結果、髄膜腫における腫瘍発生や悪性化に関わる数多くの遺伝子異常が明らかになってきた。そして、それらの遺伝子異常に基づく分子生物学的解析から、いくつかの治療標的分子が同定されている。また、髄膜腫の microRNA (miRNA) 発現に関する網羅的な解析も多数行われ、悪性髄膜腫に特有な miRNA 発現異常が明らかにされてきている。

(2). HVJ-E (Hemagglutinating Virus of Japan-Envelope) は紫外線照射によって HVJ のゲノム RNA を破壊し複製能力を失わせた不活化粒子であり、ウイルスエンベロープの内部に RNA、DNA、蛋白質、薬物などを封入し、ウイルス粒子表面の糖蛋白質 F、HN による膜融合能を利用して、腫瘍細胞に高効率に治療分子を導入できる。HVJ-E のもうひとつの注目すべき特徴として、タイプインターフェロン (IFN) の誘導を介した腫瘍細胞に対する直接的傷害能力や、腫瘍特異的な免疫反応を賦活化する能力などにより粒子自体が抗腫瘍効果を発揮することが挙げられる。

2. 研究の目的

悪性髄膜腫において近年解明された遺伝子異常背景や miRNA 制御機構をもとに、腫瘍発生、腫瘍増殖、腫瘍浸潤、腫瘍悪性化などにおける基盤分子を直接制御する核酸を HVJ-E を用いて導入することで、悪性髄膜腫を治癒へ導く新規治療法を開発することである。

3. 研究の方法

- ・HVJ-E は HVJ に 99mJ/cm² の紫外線を照射して作製する。
- ・ヒト悪性髄膜腫細胞株である IOMM-Lee および HKBMM を用いて、HVJ-E の髄膜腫細胞への膜融合能および核酸分子導入効率の評価を行う。
- ・髄膜腫臨床検体から初代培養細胞株を作製し、以後の実験に用いる。
- ・髄膜腫細胞に対する HVJ-E 自身の抗腫瘍効果を、WST-8 アッセイを用いて評価する。
- ・治療核酸分子の候補として、siRNA (TERT、PTK2、FOXM1 を標的) および miRNA (miR-34a、miR-200a、let-7) を用いる。
- ・siRNA および miRNA 封入 HVJ-E による髄膜腫細胞への抗腫瘍効果を、WST-8 アッセイを用いて解析する。
- ・抗腫瘍効果を発揮する治療核酸分子を同定し、各標的分子の機能に応じて、増殖能、浸潤能、アポトーシス誘導などを解析する。
- ・マウス髄膜腫皮下腫瘍モデルへの核酸封入 HVJ-E 投与実験を行い、経時的腫瘍サイズ計測による腫瘍増殖抑制効果を中心とした抗腫瘍効果の評価を行う。
- ・皮下腫瘍モデルでの抗腫瘍効果をもたらした各治療群において、治療後に腫瘍を摘出し、治療効果の基盤となる分子生物学的機序を検証する。

4. 研究成果

- ・悪性髄膜腫細胞株および髄膜腫初代培養細胞株に対して、HVJ-E に蛍光標識核酸分子を封入して投与し治療分子導入効率を検討した結果、HVJ-E は髄膜腫細胞に対して強力な融合能を有しており、その結果核酸分子を高効率で導入できることが示された。
- ・悪性髄膜腫細胞株および髄膜腫初代培養細胞株への HVJ-E 単独での治療効果を評価するために WST-8 アッセイを行ったところ、用量依存性の細胞増殖抑制効果が認められた。
- ・TERT・PTK2・FOXM1 に対する siRNA や miR-200a・let7a などの miRNA を HVJ-E に封入して悪性髄膜腫細胞株に導入したが、これらの治療核酸分子による明らかな抗腫瘍効果は示されなかった。一方で、miR-34a を導入したところ、HVJ-E 単独に比べて腫瘍細胞増殖抑制効果の著明な増強が誘導された。この効果は、既存細胞株である IOMM-Lee および HKBMM のみならず、初代培養細胞株においても認められた。
- ・IOMM-Lee を用いたマウス髄膜腫皮下腫瘍モデルを作製し、HVJ-E 単独治療実験を行ったところ、HVJ-E 単独投与による腫瘍増大抑制効果が確認された。
- ・Annexin V アッセイによるアポトーシス解析を行ったところ、HVJ-E 単独でもアポトーシスを誘導するものの、miR-34a を導入することで HVJ-E 単独よりも有意にアポトーシス細胞が増殖することが明らかになった。
- ・miR-34a によるアポトーシス誘導の機序に関しては、miR-34a 導入により悪性髄膜腫細胞株において survivin 発現が低下することが示され、survivin を介したアポトーシス誘導の可能性が示唆された。
- ・IOMM-Lee によるマウス髄膜腫皮下腫瘍モデルを用いて治療実験を行ったところ、HVJ-E + miR-34a 治療群は、HVJ-E 単独治療群および PBS 治療群に比べて有意に腫瘍増大が抑制される

ことが明らかになった。

・本研究によって、HVJ-E は悪性髄膜腫細胞に対して膜融合能および核酸分子導入能を有しており、HVJ-E 単独による髄膜腫細胞増殖抑制効果がみられることが示された。さらに、悪性髄膜腫に対して HVJ-E を用いて miR-34a を導入することにより、survivin 抑制を介したアポトーシス誘導が生じ、細胞レベルおよび腫瘍レベルでの強力な抗腫瘍効果が発揮されることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuda Masahide, Kohzuki Hidehiro, Tsurubuchi Takao, Ishikawa Eiichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Timing of bevacizumab administration after biopsy for unresectable newly diagnosed glioblastoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surgical Neurology International	6. 最初と最後の頁 583 ~ 583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.25259/SNI_959_2022	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 Matsuda Masahide, Mizumoto Masashi, Kohzuki Hidehiro, Sugii Narushi, Sakurai Hideyuki, Ishikawa Eiichi	4. 巻 18
2. 論文標題 High-dose proton beam therapy versus conventional fractionated radiation therapy for newly diagnosed glioblastoma: a propensity score matching analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Radiation Oncology	6. 最初と最後の頁 38 ~ 38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13014-023-02236-1	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川隆昭、松田真秀、石川博、石川栄一
2. 発表標題 患者由来髄膜腫細胞の低酸素培養による神経系細胞への誘導
3. 学会等名 第40回日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川隆昭、松田真秀、石川博、杉井成志、石川栄一
2. 発表標題 Hemagglutinating virus of Japan envelope による悪性髄膜腫に対する新規拡散療法の開発
3. 学会等名 第41回筑波脳神経外科研究会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川隆昭、松田真秀、石川博、石川栄一
2. 発表標題 WHO grade 2 Oligodendroglioma 細胞株樹立
3. 学会等名 第41回日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川隆昭、松田真秀、石川博、石川栄一
2. 発表標題 Hemagglutinating virus of Japan envelope を用いた髄膜腫に対する新規核酸療法の開発
3. 学会等名 第42回筑波脳神経外科研究会学術集会
4. 発表年 2024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	石川 博 (Ishikawa Hiroshi) (30089784)	筑波大学・医学医療系・研究員 (12102)	

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
---------	---------