

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290056

研究課題名(和文) 癌間質を標的とした抗腫瘍ウイルス封入血小板ベクターによる癌標的治療の新戦略

研究課題名(英文) New cancer-targeting therapy using platelet vector containing viral particles with anti-tumor activities

研究代表者

金田 安史 (Kaneda, Yasufumi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10177537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、血小板をベクターにすれば癌組織への特異的な集積が可能になるのではないかと考え、血小板ベクターに抗腫瘍免疫活性のある不活性化したセンダイウイルス粒子(HVJ envelope;HVJ-E)を封入し、メラノーマを移植したマウスの尾静脈より投与することにより腫瘍抑制に成功した。さらにGFP遺伝子を発現させたマウスメラノーマ細胞株B16-F10を尾静脈より注入して肺転移モデルを作成し、HVJ-E封入血小板の尾静脈投与により、明らかな転移巣の抑制が認められた。NK細胞のケモカインであるCXCL10(IP-10)を封入した血小板ベクターを作成し腫瘍抑制に成功した。

研究成果の概要(英文)：Inactivated Sendai virus (hemagglutinating virus of Japan; HVJ) envelope (HVJ-E) with anti-tumor activities were incorporated into mouse platelets. The hemagglutination activity which disturbs systemic administration of HVJ-E was dramatically attenuated by incorporation into platelets. Then, platelets incorporating HVJ-E (PH complex) were injected into the tail veins of B16F10 melanoma-bearing mice. The PH complex dominantly accumulated in tumor tissues and significantly suppressed melanoma growth in mice. Lung metastasis was also suppressed by systemic administration of PH complex. Chemokine, IP-10, was also incorporated into platelet vector. The IP-10/platelet also suppressed melanoma growth in mice by systemic administration. Thus, the platelet vector incorporating anti-tumor reagents will provide a new approach for cancer-targeting therapy using oncolytic viruses.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：腫瘍標的ベクター HVJ envelope 血小板 抗腫瘍免疫

1. 研究開発当初の背景

(1) 癌による死亡率は我が国においてもこの30年間依然としてトップであり、肺癌や前立腺癌などはさらに増加することが予測されている。様々な治療法が開発されてきた中で、癌に対しては多角的な治療が必要で、そのためには様式の異なる種々の治療法を兼ね備えケースバイケースで使い分け、組み合わせるといった対処法が望ましいのではないかと考えられる。その1つとしてリポソームやナノミセルなどの drug delivery system (DDS) が注目され、腫瘍血管の高い透過性を利用した腫瘍への集積、腫瘍特異性の高い抗体やリガンドを利用した標的化によって癌特異性の高い抗癌剤治療が期待されている。しかしこのような人工粒子による DDS は、癌以外にも生体の網内上皮系に多くが捕捉されてしまう(文献1)。そこで生体材料を利用する DDS も考案され、主として骨髄間葉系幹細胞 (MSC) や癌に対する Cytotoxic T cell (CTL) が利用されている。しかし MSC は、免疫反応を減弱する欠点があり、CTL は大量調整の問題や regulatory T cell などによる腫瘍への集積抑制や殺傷作用も報告されている(文献2)。一方、古くからウイルスを用いた癌治療も注目され、近年は癌細胞で特異的に増殖する腫瘍溶解ウイルスが発見或いは構築されるようになり、さらに治療遺伝子を発現できるように改変したヘルペスウイルス、ワクシニアウイルスなどは成果を収めつつある。しかし全身投与による毒性も指摘されている(文献3)。

(2) 癌間質では癌細胞の血管内への浸潤や腫瘍血管自体の脆弱性のため微小出血が様々な場所で繰り返しおこっている(文献4)。ここではフィブリンのポリマーができ血栓が形成されている。血小板は、その部位に集積し、

かつそこで分泌されるトロンビンで活性化されて内部に蓄えた凝固因子を放出する。したがって血小板をベクターにすれば、癌間質に集積し、そこで封入物を放出できる癌治療用の DDS を開発できると考えられる。

2. 研究の目的

癌に対する新しいコンセプトに基づく DDS として抗腫瘍活性を有するウイルスを封入した血小板ベクターを開発する。これは癌間質での多数の微小出血部位に血小板が集積し、活性化されて凝固因子を放出するということからヒントを得た癌間質標的 DDS である。抗腫瘍活性を有するウイルスとしては臨床応用されている不活性化 HVJ (HVJ envelope; HVJ-E) を用いる。また、NK 細胞を腫瘍組織に呼び寄せるケモカイン CXCL-10(IP-10)の封入も試みる。このような抗腫瘍作用のある治療剤封入の血小板の血中内投与後、封入治療剤がどのようにして腫瘍組織内で機能して抗腫瘍活性を発揮するのか、その機構を解明する。それをもとにして転移癌モデルでの全身投与による治療効果や毒性の有無を評価することにより臨床応用をめざすための proof of concept を取得する。

3. 研究の方法

(1) 抗腫瘍ウイルスとしてメカニズムの解明が進み臨床応用されている HVJ envelope (HVJ-E)を封入した血小板ベクターについて、その物理化学的性質をさらに詳細に解析するため血小板の表面に HVJ 由来の膜蛋白 HN, F が検出されるかを赤血球凝集反応で調べる。また HVJ-E 封入後の血小板を活性化状態におく (thrombin や thromboxan A2などを添加することにより封入した HVJ-E が放出される

かを調べる。

(2) HVJ-E 封入血小板ベクターの各種培養細胞に対する作用を検証し、その機構を解明するためHVJ-E封入血小板ベクターを癌細胞や非癌細胞に作用させたときの細胞生存率をMTS assay、TUNEL stainingなどで調べる。HVJ-E 封入血小板を樹状細胞、リンパ球、マクロファージ、各種癌細胞に作用させたときのCytokine arrayを行い、候補分子についてRT-PCR, ELISAで確認する。

(3) 血小板ベクターの正常マウス及び担癌マウスでの動態を解明する。CD62P抗体による免疫染色により活性化血小板の各臓器や腫瘍への集積を検証する。

(4) HVJ-E 封入血小板ベクターの癌治療効果の評価のため、HVJ-E 封入血小板ベクターを癌転移モデル(メラノーマの肺転移)に全身投与し、治療効果や毒性の有無について評価する。

(5) HVJ-E 以外の治療剤を封入した血小板ベクターの治療効果を調べるためケモカインのIP-10封入血小板ベクターを作成し、血小板への取り込みや活性化による放出について調べる。またIP-10封入血小板をマウスメラノーマB16F10細胞の皮内移植マウスの尾静脈から注入し治療効果について検証する。

4. 研究成果

(1) マウスの血液より分離した血小板の活性化を防ぎつつHVJ-EとTyrode buffer中で37度で2時間作用させると血小板中に取り込まれることが分かった。1血小板あたり数十の粒子が取り込まれ、電顕でも確認できた。血小板をトロンビンで活性化するとトロンビンの濃度依存的にHVJ-Eが放出された(図1)。

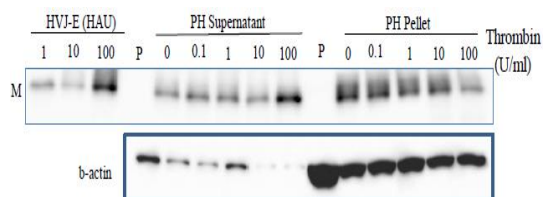


図1: Thrombinによる血小板からのHVJ-Eの放出。PHSupernatant: 培地中に放出されたHVJ-E。HVJ-EのM蛋白をWestern blotで検出。

(2) HVJ-Eを取り込んだ血小板(PH complex)は赤血球凝集能を示さなかった(図2)。

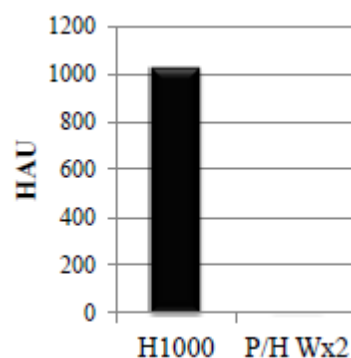


図2: HVJ-E1000 HAUと1000 HAUのHVJ-Eを封入した血小板(調整後2回洗浄)(P/H Wx2)の赤血球凝集反応。

(3) PH complexをマウスメラノーマ細胞B16F10と作用させると24時間以降、B16F10の生存率が低下した。しかしマウスの腫瘍組織から採取して培養した腫瘍血管内皮細胞の生存率は変化しなかった。PH complexをB16F10の腫瘍を皮内にもつマウスの尾静脈から投与し、24時間後に各組織の切片を作成して、血小板やHVJ-Eを検出すると腫瘍組織に特異的に集積しており、腎臓、肝臓、脾臓にはほとんど認められなかった。腫瘍組織では

フィブリン塊の部位に集積しており、多くは腫瘍組織内の血管に沿って検出され、一部HVJ-Eが腫瘍内に入っていることが明らかになった。腫瘍内ではPH complexの血小板が活性化されていることがCD62P抗体を用いた免疫染色で確認された。

(4) マウスメラノーマ B16F10 を皮内移植したマウスの尾静脈からHVJ-E封入血小板ベクター(PH)を投与すると、HVJ-E単独、血小板単独(Plt)やNaCl投与群と比較して有意に腫瘍の縮小が認められた(図3)。

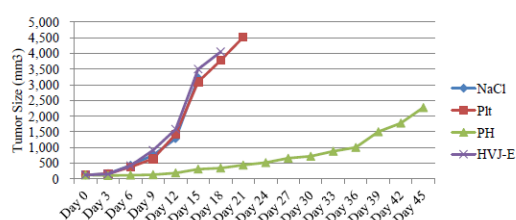


図3：HVJ-E封入血小板ベクターの静脈内投与による抗腫瘍効果。

(5) GFP遺伝子を発現させたマウスメラノーマ細胞株B16-F10を尾静脈より注入して肺転移モデルを作成した。癌細胞5日後に腫瘍が肺に生着し転移巣が認められるので、その後HVJ-E封入血小板を2週間に5回尾静脈より投与した。PBS投与群や血小板のみの投与群と比較して明らかな転移巣の抑制が認められた。PBS群と比較してHVJ-Eを含まない血小板投与群でも腫瘍の抑制効果が見られた。

(6) この方法をHVJ-E以外の治療薬にも応用するため、NK細胞のケモカインであるCXCL10(IP-10)を封入した血小板ベクターを作成した。IP10はalpha-granuleに取り込まれdense granuleには取り込まれておらず、thrombinの刺激により培地中に放出された。IP-10封入血小板を皮内にメラノーマを移植したマウスの尾静脈から投与し、腫瘍組織でIP-10の放出を示唆する画像が得られた。2週間に5回投与する方法によりPBS群やIP-10単

独投与群と比較して有意な腫瘍抑制が見られた(図4)。

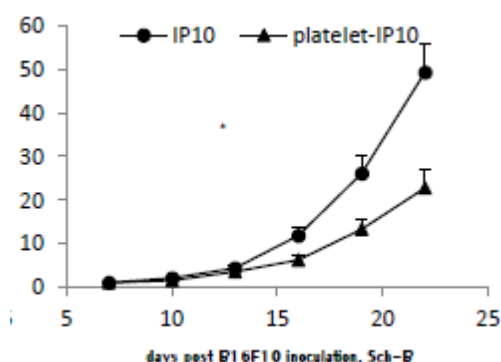


図4：IP-10封入血小板ベクターの尾静脈投与による抗腫瘍効果。

(6) 一方、血小板単独投与群と比較するとIP-10封入群のほうが抑制傾向はあったが、有意差はつかなかった。血小板自身に抗腫瘍作用があることが明らかになり、それを解析した結果、腫瘍組織中のFoxP3陽性の制御性T細胞が血小板の投与で抑制されることがわかった。しかしこの抑制効果は、健常マウスの血小板では認められたが、担癌マウスの血小板には認められなかった。健常マウスと担癌マウスで血小板の成分を比較するとCD40Lの発現が前者では高かった。CD40とCD40Lの作用により制御性T細胞が抑制されるという報告があり、健常血小板での抗腫瘍効果はCD40Lを介した制御性T細胞の抑制であることが示唆された。

<引用文献>

1. Al-Dosari MS, Gao X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. AAPS J. 11 (4) 611-81, 2009.
2. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. Nature Rev. Immunol. 523-532, 2008.
3. Danielsson A, Elgue G, Nilsson BM, Nilsson B, Lambris JD, Tottelman TH,

Kochanek S, Kreppel F, Essand M. An ex vivo loop system models the toxicity and efficacy of PEGylated and unmodified adenovirus serotype 5 in whole human blood. Gene Ther. 2010; 17, 752-762

4. Stein PD, Beemath A, Meyers FA, Skaf E, Sanchez J, Olson RE. Incidence of venous thromboembolism in patients hospitalized with cancer. Am J Med. 119, 60-68, 2006.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Nishikawa, T., Tung L-Y, Kaneda Y. Systemic administration of platelets incorporating inactivated Sendai virus eradicates melanoma in mice. Mol. Therapy, 22(12):2046-55, 2014.
- ② Liu, L-W, Nishikawa, T., Kaneda Y. An RNA molecule derived from Sendai virus DI particles induces anti-tumor immunity and cancer-selective apoptosis. Mol. Therapy, 24(1):135-45, 2016.
- ③ Li, Y-T., Nishikawa, T., Kaneda Y. Platelet-cytokine Complex Suppresses Tumour Growth by Exploiting Intratumoural Thrombin-dependent Platelet Aggregation. Scientific Reports, in press.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 金田安史 第 19 回日本遺伝子治療学会 理事長講演 “What will be needed for cancer therapy in Japan?” 2013/7/14 岡山
- ② 金田安史 第 11 回日本中性子捕捉療法学会 教育講演 “ウイルスに学ぶ癌治療戦略” 2014/7/6 大阪
- ③ 金田安史 第 20 回日本遺伝子治療学会

理事長講演 “Development of anti-cancer strategies using Sendai virus envelope (HVJ-E) and current status of clinical applications to treat cancer patients” 2014/8/7 東京

- ④ Yasufumi Kaneda 第 8 回韓国遺伝子細胞治療学会 招待講演 “Virus-mediated cancer treatment ~from basic to clinic~” 2014/10/11 Osong (Korea)
- ⑤ Nishikawa T, Kaneda Y. 第 18 回欧州遺伝子細胞治療学会 “Utility of platelet vector containing inactivated Sendai virus particles for multi-modal cancer therapy” 2015/9/18 Helsinki (Finland)
- ⑥ 金田安史 第 74 回日本癌学会学術総会 “A novel cancer therapy based on cancer-selective cell death activity of inactivated Sendai virus particles (HVJ-E)” 2015/10/9 名古屋

[その他]

研究室ホームページ

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gts/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 安史 (KANEDA, Yasufumi)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10177537

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者
なし