

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430152

研究課題名(和文)弱毒化麻疹ウイルスの特性を利用した癌幹細胞を標的とする難治性乳癌治療法の開発

研究課題名(英文)The development of gene therapy for breast cancer using targeted measles virus vectors

研究代表者

松村 友美子(Matsumura, Yumiko)

九州大学・生体防御医学研究所・研究員

研究者番号：90594911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：核酸医薬の臨床応用においては、安全で効率的なドラッグデリバリーシステムの構築が不可欠であるが、麻疹ウイルスは癌治療用ベクターとして様々な利点を有している可能性が高いと考えられる。本研究では安全性の確立された弱毒化麻疹ウイルスに乳癌特異的な二つの分子、すなわち腫瘍細胞標的化遺伝子と発癌関連遺伝子標的RNAiを付与し、この二重の腫瘍特異的機能を有する麻疹ウイルスベクターの有効性と安全性を最大限に活用した新規乳癌治療法の基盤を完成させた。

研究成果の概要(英文)：Breast cancer contains a heterogeneous population of cells with a small percentage that have increased resistance to conventional therapies and are capable of establishing metastasis. We found that the expression of novel two genes identified the breast cancer stem cells in human cell lines. We engineered the new measles-based viral vectors which have several advantages in targeted gene therapy. In this study, we proved the potential antitumor capability of the engineered vaccine strain of the measles virus against human breast cancer.

研究分野：医学

キーワード：遺伝子治療 癌治療 分子標的薬 癌幹細胞 ウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

わが国において女性の癌罹患数でトップの乳癌は、既存の治療法で患者の3割が転移再発し、年間で一万人死亡しており、社会的影響ははかり知れない。従って、これまでにない独創的な治療アプローチが切望されている。現在世界中において、生きたウイルスを利用して癌を治療するウイルス治療に関する前臨床研究、および臨床試験が行われている。弱毒化麻疹ウイルスは種々の癌に選択的に感染し、増殖することによって強力な腫瘍溶解性を発揮している。欧米をはじめ、すでに実用化されているいくつかの種類のウイルスベクターでは、特定の細胞や組織に対する指向性がなく、非特異的にあらゆる種類の細胞に外来遺伝子を導入する。つまり治療を必要とする細胞にのみ遺伝子を導入することが困難であるため、その有効性、および安全性の低下が危惧される。我々は、それら問題点を克服すべく、麻疹ウイルスの利点を活かし、本来ワクチンとして開発された弱毒化麻疹ウイルスを用いた新規ベクター開発に取り組むこととした。

2. 研究の目的

核酸医薬の臨床応用においては安全で効率的なドラッグデリバリーシステムの構築が不可欠であるが、麻疹ウイルスは生活環が細胞質にあるため、オンコウイルスベクターで問題視されている核内染色体への遺伝子挿入変異によるゲノム毒性のリスクを回避できる可能性が高い。また、ウイルスゲノム中に外来遺伝子を複数個組込むことで、腫瘍細胞中へ治療遺伝子を運び、癌関連遺伝子発現を制御させるベクターとしても有望と考えられる。さらにスターシステム (Nat Biotech 2004, Nat Biotech 2005)を利用して、正常細胞ではなく、特定の腫瘍細胞にのみ感染するウイルスを構築することが可能である。我々は、本来ワクチンとして開発され、安全性が確立されている弱毒化麻疹ウイルスを用いた、新規麻疹ウイルスベクターの開発を進めてきている。治療標的としている PRDM14 は乳癌幹細胞性に関与し (Cancer Res 2007)、GD2 は乳癌幹細胞の発現にほぼ一致していることが既に報告されており (J Clin Invest 2012)、乳癌におけるこれら二つの分子の特性は極めて高いと考えられる。本

研究の目的は、安全性が確認されている弱毒化麻疹ウイルスをベクターとして用い、これら二分子を標的とすることで、再発・遠隔転移が問題となっている、既存治療に抵抗性の難治性乳癌に対する新規分子標的薬剤を開発することである。

3. 研究の方法

ワクチン株 Edmonston 麻疹ウイルスは、CD46, CD150 および Nectin4 レセプターを介して宿主細胞に感染する。腫瘍標的麻疹ウイルスを構築するためには、ウイルス親和性を排除すること、そして新しい腫瘍特異的親和性を導入する二つのステップが必要となる。そこで、H 蛋白への遺伝子変異の導入によって親和性を排除したウイルスは、すべての宿主細胞に感染することが不可能となる。これに対し、親和性の排除と同時に腫瘍特異的に結合するリガンドを導入したウイルスは、特定の標的分子を介して癌細胞にのみ感染することが可能となる。リガンドとしては、標的分子に対して高い特異性と親和性を併せ持つ一本鎖抗体 (single chain Fv: scFv) を使用することとした。この scFv は、抗体が抗原を認識するために必要な最小単位である VH(重鎖可変領域)および VL(軽鎖可変領域)から構成される可変領域 (Fv)を、フレキシブルなペプチドリンカーで結合した単鎖可変領域フラグメントである。本研究の連携研究者である中村は、野生株とワクチン株のウイルス H 蛋白の遺伝子解析やリバーシジェネティクス法を用いて、CD46 と CD150 レセプターの結合に関与するアミノ酸を同定している。これを基にして H 蛋白に点変異を導入し、乳癌幹細胞に高発現する標的分子 GD2 に結合する scFv を、リンカーとともに、この変異 H 蛋白の細胞外 C 末端に連結することとした。

(1) ヒト乳癌細胞株における PRDM14 と GD2 の発現およびその相関性の解析

ヒト臨床検体乳癌細胞で高い発現が示されている PRDM14 と GD2 について、これら二つの分子の発現に相関性がみられるかを、フローサイトメトリー法により確認した。

(2) 抗 GD2 抗体 scFv の作製

一本鎖抗体により標的分子候補を GD2 とし、マウス GD2-scFv の配列情報を Memorial Sloan-Kettering Cancer Center の Nai-Kong V. Cheung

教授よりご厚意でいただき、その情報をもとに遺伝子合成を行った。

同時に、ヒト GD2-scFv 抗体の作製を行った。

まず、抗原としてヒト GD2 (Merk Millipore)を用い、ヒト末梢血単核球に対し体外免疫した。免疫後の細胞より total RNA を抽出して逆転写反応を行い、cDNA を合成した。これより抗体遺伝子の V_H 、 V_L 領域を増幅し、一本鎖抗体遺伝子を構築した。pMAL ベクターへ一本鎖抗体遺伝子を挿入し、形質転換体を取得後、24 時間培養して集菌し、菌体破碎をしてその上清を用いて ELISA スクリーニング試験を実施した。結果をもとに Test Clone を選択し、10ml の小スケール培養を行い、Amylose Resin カラムを用いたアフィニティ精製を行った上で、さらに抗体活性を確認した。活性確認の結果から、最終的に使用する抗体を選択した。

(3) 抗 GD2 抗体 scFv の機能解析

複数の候補ヒトおよびマウス scFv を麻疹ウイルス H タンパク質発現ベクター pTNH6-H (Nakamura, Nat. Biotech., 23:209, 2005) に挿入し、これらのキメラ H 蛋白の中から、腫瘍標的麻疹ウイルスを構築するうえで、最適な変異の組み合わせをスクリーニングした。ウイルスレセプター陽性細胞に、H 蛋白と F 蛋白を発現するプラスミドをコトランスフェクションすると、細胞融合を誘導し、多核巨細胞を形成する。この特性を利用し、ウイルスレセプターである CD46、CD150 を発現する Vero 細胞、または標的分子である GD2 を発現する細胞株に、各キメラ H 蛋白と F 蛋白を発現させ、CD46、または CD150 発現 Vero 細胞ではなく、GD2 発現細胞のみで細胞融合を示すものをスクリーニングした。

(4) ウイルスの作出 (レスキュー) と増殖

麻疹ウイルスのゲノム全長をコードするプラスミドから感染性ウイルスを作出する方法 (リバースジェネティクス法) は確立されている。それゆえ、ワクチン株麻疹ウイルスの H 遺伝子を標的細胞融合キメラ H 遺伝子に変換すれば、腫瘍細胞特異的に感染するウイルスの作出が理論上可能となる。従来のリバースジェネティクス法によって作出される麻疹ウイルスは、その H 蛋白質の CD46 ウイルスレセプターへの吸着を介して、CD46 陽性 Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎臓由来) で作出、

増殖される。しかし、腫瘍標的麻疹ウイルスの場合は、H 蛋白に変異が導入され、CD46 レセプターに対する親和性を排除されているため、通常のリバースジェネティクス法はレスキュー、増殖させることはできない。この問題を解決させるため、H 蛋白にヒスチジンタグを挿入し、このタグを認識する偽レセプター分子を Vero 細胞に発現させる「スターシステム」を中村は開発している。ウイルスゲノムの H 遺伝子には、CD46 および CD150 レセプターに対する親和性を排除するための二つのアミノ酸変異の導入、標的分子 GD2 に結合する scFv をコードする遺伝子の挿入、六つのヒスチジンタグ (Hx6) をコードする遺伝子の挿入が加えられている。スターシステムでは、腫瘍標的ウイルスが CD46 (および CD150) を認識することができなくても、ヒスチジンタグを介してレセプター分子を吸着し、感染、増殖することが可能となる。

(5) 麻疹ウイルスによる PRDM14-RNAi の検討

RNA 干渉 (RNAi) 法とは、相補的な塩基配列をもつ遺伝子の機能を抑制する方法であり、これを応用した RNAi 医薬は次世代の分子標的治療として大きく期待されている。合成 small interfering RNA (siRNA) の導入では RNAi の効果が一過性であるため、RNAi の効果を高効率でかつ長期的に持続させることを期待するため、short hairpin RNA (shRNA) を麻疹ウイルスベクターに組み込み、細胞内へ導入する計画を立てた。通常、shRNA は核外に輸送されたのち Dicer によってループ配列が切断されて二本鎖 siRNA となり、RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれ、RNAi の効果をもつと考えられている。しかしながら、麻疹ウイルスベクターは細胞質内でのみ増殖するため、Dicer による切断が期待できない。そこで、麻疹ウイルスベクターを用いた PRDM14-shRNA が RISC に取り込まれるために、リボザイム (Ribozyme) の配列を用いて shRNA が切断されるようにデザインすることにした。リボザイムとは、触媒作用をもつリボ核酸 (RNA) のことで、RNA 分子を特定の部位で切断したり、低分子の物質と結合させる働きを持つ。Cech らの発見以降、1987 年ころまでに多くの新しいタイプのリボザイムが発見されているが、そのうちの一つに自己

切断 RNA があり、その代表的なものとしてハンマーヘッド型またはヘアピン型リボザイムと呼ばれるものがある。この特性を利用して、PRDM14-shRNA を設計することとした。つまり、PRDM14-shRNA 配列の 5 末端側にハンマーヘッドリボザイム (Hammerhead ribozyme: HHRz)、そして 3 末端側に D 型肝炎ウイルスリボザイム (Hepatitis delta virus ribozyme: HDVRz) を配する RNA を設計し、自己切断後に shRNA が放出され、RISC に取り込まれるようにするものである。

本研究の連携研究者である谷口は、複数の PRDM14 に対する shRNA 配列候補を見出しており、その情報をもとに、麻疹ウイルスに組込むのに最適な条件を検討し、発現プラスミドコンストラクトを作成した。

また、国立感染症研究所の駒瀬勝啓ウイルス第三部室長より麻疹ウイルス AIK-C 株を供与いただき、Edmonston 株とは別に、PRDM14-shRNA を配する設計を組んだ。AIK-C 株は、我が国でワクチンに改良する目的で Edmonston 株より選別分離された株であり、より安全性が高いと考えられる。

(6) 標的レセプター依存的感染性と抗腫瘍効果
作成した遺伝子改変麻疹ウイルスについて、二つの標的分子の発現を確認した CA1d 細胞を用い、*in vitro* において感染特異性を検討した。

また、CA1d 乳癌細胞異種移植を施したマウス腫瘍内または静脈内に投与し、特異的な受容体を介した抗腫瘍活性を試験した。

4. 研究成果

(1) ヒト乳癌細胞株における PRDM14 と GD2 の発現およびその相関性の解析

フローサイトメトリー法により CA1d 細胞における PRDM14 および GD2 タンパクの発現解析

正常乳腺細胞株 MCF-10A に癌遺伝子である Ha-ras 遺伝子を導入した CA1d 細胞において、GD2 発現は PRDM14 発現の高い細胞に多く認められ、またそれら PRDM14^{hi} GD2^{hi} 分画は、癌幹細胞に特徴的とされている CD44^{hi}CD24^{lo} を表していた。一方で、PRDM14^{lo} GD2^{lo} 分画は、CD44^{lo}CD24^{hi} であった。逆に、CA1d 細胞の CD44^{hi}CD24^{lo} 分画には、PRDM14^{hi} GD2^{hi} 発現細胞が多く、一方で CD44^{lo}CD24^{hi} 分画には、PRDM14^{hi} GD2^{hi} の細胞がほとんど認められなかった。

(2) 抗 GD2 抗体 scFv の作製

GD2 抗原により体外免疫より得られた菌体破碎液 96 サンプルに対し、GD2 と BSA を抗原とした ELISA スクリーニング試験を実施したところ、複数クローンにて GD2 抗原に陽性反応が認められ、かつそれらは BSA 抗原については反応性が低いことを確認した。

反応性の高いクローンについて Amylose Resin カラムを用いたアフィニティ精製を行い、SDS PAGE にてタンパクを確認したところ、MBP-scFv の存在を示す約 70kDa サイズの蛋白を認めることができた。

さらに、それらの塩基配列を解析し、IgBLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)にて解析したところ、それらが軽鎖および重鎖を併せ持つ一本鎖抗体の構造を呈していることが確認できた。

(3) 抗 GD2 抗体 scFv の機能解析

麻疹ウイルスは、そのエンベロープの全面に、H (ヘマグルチニン又は血球凝集素) タンパク質と F (膜融合) タンパク質とがスパイク状に突起して存在する。麻疹ウイルスエンベロープタンパク質は、麻疹ウイルスとその細胞受容体との相互作用に関わり、特に H タンパク質が、細胞受容体に結合する性質を持ち、F タンパク質は、細胞膜との融合に関わる。H/F タンパク質発現プラスミドをトランスフェクトすると、細胞表面に発現した H/F タンパク質の作用により隣接する細胞との間で融合が起き、多核細胞 (合胞体) が生じる。481 番目のアミノ酸をアスパラギンからアラニンに、533 番目のアミノ酸をアルギニンからアラニンに置換したキメラ蛋白は、CD46 または CD150 ではなく、標的分子に対する scFv を介した効率のよい標的細胞融合を示した。この結果から、細胞の表面には機能的な H/F タンパク質が発現していることが確認された。

(4) 麻疹ウイルスによる PRDM14-RNAi の検討

PRDM14 遺伝子の発現阻害作用を介して、癌細胞の増殖を抑制するとともに、抗癌剤に対する感受性を増大させて抗癌剤により惹起される癌細胞のアポトーシスを増強する効果を目的に、PRDM14 遺伝子の発現を阻害する shRNA を麻疹ウイルスベクターに組み込み、細胞に感染させることによって、

細胞内に遺伝子を導入する。

我々の麻疹ウイルスアンチゲノムの N 遺伝子 3' 側の non-coding 領域に enhanced green fluorescent protein (eGFP) 遺伝子が挿入されており、eGFP 遺伝子と shRNA 配列を入れ替えることは容易で、下流の蛋白発現への影響を最小限に押さえることが可能となる。さらに、shRNA の 3' 側にハンマーヘッド型リボザイム (HHRz) を、5' 側に D 型肝炎ウイルスリボザイム (HDVRz) を挿入し、その自己切断により shRNA が遊離され、RNA-induced silencing complex (RISC) に捕捉されて silencing 効果が発揮されることを想定し、PRDM14-RNAi のためのコンストラクトを決定した。

また、国立感染症研究所の駒瀬勝啓ウイルス第三部室長より供与いただいた麻疹ウイルス AIK-C 株についても、PRDM14-RNAi のためのコンストラクトをデザインし作製した。

(5) 作製した組換え麻疹ウイルスについて、ヒト乳癌株化細胞を用いた in vitro での有効性と毒性の評価、および担ヒト癌免疫不全マウスモデルを用いた抗腫瘍トロピズムの検討を継続して遂行している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

Narusawa, M., Inoue, H., Sakamoto, C., Matsumura, Y., Takahashi, A., Inoue, T., Watanabe, A., Miyamoto, S., Miura, Y., Hijikata, Y., Tanaka, Y., Inoue, M., Takayama, K., Okazaki, T., Hasegawa, M., Nakanishi, Y., Tani, K. TLR7 ligand augments GM-CSF-initiated antitumor immunity through activation of plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Immunology Research*. 2(6), 568-580, 2014

Yokota, Y., Inoue, H., Matsumura, Y., Nabeta, H., Narusawa, M., Watanabe, A., Sakamoto, C., Hijikata, Y., Iga-Murahashi, M., Takayama, K., Sasaki, F., Nakanishi, Y., Yokomizo, T., Tani, K. Absence of LTB4/BLT1 axis facilitates generation of mouse GM-CSF-induced long-lasting antitumor immunological memory by enhancing innate and adaptive immune systems. *Blood* 120:3444-3543, 2012

〔学会発表〕 (計 2 件)

Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Yumiko Matsumura, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani (2014, 11/7-11/8). The role of plasmacytoid dendritic cells in GM-CSF-based antitumor immunity. The 24th Hot Spring Harbor International Symposium, Fukuoka.

Chika Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Yumiko Matsumura, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani (2014, 5/21-5/24). Therapeutic vaccination with irradiated GM-CSF gene-transduced cancer side population cells effectively suppress tumor growth and lung metastasis.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕 なし

〔その他〕 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村友美子 (MATSUMURA, Yumiko)
九州大学・生体防御医学研究所・助教
研究者番号：90594911

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

中村 貴史 (NAKAMURA, Takafumi)
鳥取大学・医学学研究所・准教授
研究者番号：70432911

谷口 博昭 (TANIGUCHI, Hiroaki)
東京大学 医科学研究所 特任准教授
研究者番号：90563289

(4) 研究協力者

なし