

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860340

研究課題名(和文) 癌細胞を標的とする選択的増殖型遺伝子組換えレオウイルスを用いた新規癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of replication-selective oncolytic viral vector using modified mammalian orthoreovirus

研究代表者

金井 祐太 (KANAI, YUTA)

大阪大学・微生物病研究所・特任講師(常勤)

研究者番号：80506501

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)：哺乳類オルソレオウイルス(以下MRV)は様々な癌に対して殺腫瘍活性を示し、癌治療への医薬品応用が望まれている。より効果の高い遺伝子改変抗腫瘍MRVを作成する目的で、最も腫瘍溶解性の強いT3D-C株の遺伝子操作系を確立した。次にMRVのSigmaCタンパクにインテグリン結合能を有するRGD配列を挿入した組換えMRVを作製したところ、一部の癌細胞において感染性の向上が認められた。次に外来遺伝子としてルシフェラーゼを発現するNanoLuc-MRVを作製した。このNanoLuc-MRVを癌細胞を移植した担癌マウスに静脈投与したところ、癌部に限局した発光が認められ、腫瘍の生体イメージングに成功した。

研究成果の概要(英文)：Mammalian Reovirus (MRV) has important capacity that MRV show selective oncolytic activity in cancer cells. Currently, wild type T3D-C strain, which displays significant oncolytic activity, is developed as viral oncolytic agent. To develop improved oncolytic MRV reagent, we established reverse genetics system for T3D-C strain, the known strongest oncolytic strain. We generated recombinant RGD-MRV which has integrin-interactive RGD motif in MRV sigma1 protein to enable infection to MRV-resistant cancer cells via MRV receptor independent manner. This RGD-MRV exhibited enhanced infectivity and oncolysis of reovirus-resistant cancer cell. Next, we have generated reporter-MRV which express exogenous Luciferase (NanoLuc) transgene. Infection and replication site of Nanoluc-MRV in mice model could be monitored by in vivo imaging system (IVIS). Further, when NanoLuc-MRV were injected intravenously to human cancer xenograft mice, IVIS revealed that NanoLuc-MRV selectively infected in tumor.

研究分野：ウイルス学

キーワード：レオウイルス 癌 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

ウイルスによる腫瘍溶解療法は、遺伝子工学技術によりウイルス増殖機能に標的癌細胞特異性を付加することで癌細胞のみを殺傷する医薬品として、従来の遺伝子治療よりも強力な治療効果が期待されている。近年、アデノウイルス、ヘルペスウイルス (HSV) など数多くの種類のウイルスが遺伝子組み換え技術により、腫瘍細胞での特異的な増殖能、抗腫瘍因子の発現などを付加することで腫瘍溶解性ウイルスとして研究が進められている。例として、顆粒球単球コロニー刺激因子 (GM-CSF) を発現する組換え HSV は悪性黒色腫に対する治療で第三相試験が行われている。しかし、大部分の腫瘍溶解性ウイルス候補は様々な遺伝子改変が試みられているにもかかわらず安全性や効果の点で様々な問題を抱えている。

哺乳類オルソレオウイルス (MRV) は 10 分節 2 本鎖 RNA (dsRNA) をゲノムとして保持しており、dsRNA ウイルスの複製機構ならびに病態発現機序を理解する上で優れたウイルスモデルとして解析が進んでいる。野生型 MRV はヒトに対して非病原性であること、様々な培養細胞で容易に高力価のウイルスが得られること、ヒト腫瘍の約 80% で活性化している Ras 経路依存的に癌細胞のみで増幅することが報告されている (Coffey et al., 1998, Science, 282, 1332-)。そのため、MRV は選択的腫瘍溶解性ウイルスとして、頭頸部癌、メラノーマ、卵巣癌、子宮癌、大腸癌、乳癌、膵癌などに対して、カナダ、欧米の研究グループを中心に基礎ならびに臨床研究が精力的に進められている。頭頸部癌を対象とした野生型 MRV 3 型 (商品名: Reolysin) を用いた研究は第三相試験が行われている (<http://www.oncolyticsbiotech.com/clinical-trials/8>)。現在、開発が進んでいる腫瘍溶解性ウイルスの大部分は腫瘍部位に直接導入することにより、その効果が検討されている。MRV は静脈内投与により、ヒトの発癌部位において特異的に感染・複製することが報告されていることから (Adair et al., 2012, Sci. Transl. Med., 4, 138ra77) 同時に複数の異なる癌種治療にも有効と考えられる。しかし、MRV の癌治療研究では野生型未改変 MRV のみが用いられていることから安全性が懸念されている。加えて、Reolysin 単独投与では十分な効果が得られておらず、化学療法と併用されていることから、殺腫瘍効果についても改良

が指摘されている。これらの問題点を克服するため、遺伝子改変技術を用いた MRV の開発研究がこれまで切望されてきた。

多分節 dsRNA ウイルスにおける RG 系の開発研究はそのゲノム構造の複雑性からこれまで困難を極めていた。しかし、2007 年に申請者の研究グループが MRV における RG 系の開発を世界に先駆けて成功した (Kobayashi et al., 2007, Cell Host Microbe, 1, 147-)。MRV の RG 系は 10 分節全てのウイルス由来 cDNA を培養細胞に導入し、組換えウイルスを作製する技術であり、これまで、申請者の研究グループは MRV の RG 系を用いて外来遺伝子発現 MRV を含む様々な組換え MRV を作製し、研究を行ってきた (Kobayashi et al., 2009, J. Virol. 83, 2892- ; Kobayashi et al., 2010, Virology, 398, 194-)。

2. 研究の目的

MRV の癌治療への臨床研究は、これまで野生型の MRV を用いて行われてきたが、安全性や殺腫瘍効果の観点から改良が望まれている。本研究は、MRV で応用が困難であったウイルス遺伝子の改変技術を導入・駆使することで、遺伝子改変 MRV を作出し、組織特異性や遺伝子発現の制御が可能な、より安全で治療効果の高い腫瘍溶解性ウイルスベクターの開発研究の基盤の確立を目指した。

本研究課題では、MRV 株の選別を行い、それを基にした遺伝子操作系の確立を行った。さらに、ウイルス外層蛋白質の改変による標的細胞特異性の制御可能な MRV と外来遺伝子を発現する組換え MRV の作製を試みた。作製した組換え MRV を用いて、癌株化細胞での解析および癌細胞移植モデルマウスを用いた *in vivo* での検討を詳細に行うことで、遺伝子改変 MRV を用いた新規ウイルス癌療法の基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗腫瘍活性の強い MRV 株の選定。
MRV T1 株、T3D-C 株および T3D-F 株を用意し、株化癌細胞に対する腫瘍溶解能の検討を行った。癌細胞に対しそれぞれのウイルス株を MOI10 で感染させ、経時的にサンプルを回収し細胞生存率の測定を行った。

(2) MRV T3D-C 株の遺伝子操作系の確立。
MRV T3D-C 株の全塩基配列決定を full-length amplification of cDNAs (FLAC) により行った。単離した各ウイルス分節 (L1-S4) を T7

プロモーターの下流になるようプラスミドに挿入し、ウイルス遺伝子の 3' 側には Ribozyme 配列を挿入した。T7 RNA ポリメラーゼを発現するワクシニアウイルスを感染させた L929 細胞に構築した cDNA をトランスフェクションすることで組換え MRV を作製した

(3) RGD 配列付加ウイルスの作製。MRV T3D-C の S1 遺伝子分節にコードされている sigma1 タンパクに RGD(アルギニン(R), グリシン(G), アスパラギン酸(D))を PCR mutagenesis 法により付加した。RGD の挿入位置は、sigma1 の結晶構造を参考に、分子表面に位置する複数のループ領域および sigma1 タンパクの C 末端側を使用した。RGD を挿入した S1 遺伝子の cDNA を他 9 分節の野生型 cDNA と共に L929 細胞にトランスフェクションすることで、sigma1 の様々な箇所に RGD 配列を付加した組換え MRV(RGD-MRV_AB, CD, EF, GH および c-term) を作製した。

(4) RGD-MRV による抗腫瘍効果の検討。ヒト癌細胞株 (OVCAR3 (ヒト卵巣癌) および HS578T (ヒト乳癌)) を用意し、野生型 MRV T3D-C 株および 5 種類の RGD-MRV を MOI(multiplicity of infection) 10 で感染し、経時的に細胞生存率を測定し、抗腫瘍活性の比較を行った。

(5) ルシフェラーゼ発現 MRV T1L の作製。ルシフェラーゼとして NanoLuc (Promega) 遺伝子の MRV 遺伝子分節への挿入を試みた。ここでは MRV T1L 株を用いた。Bi-cistronic な発現を可能にするために Nano-Luc 遺伝子と MRV の各遺伝子 ORF を Porcine Teshiovirus 由来の 2A ペプチド配列で結合した。NanoLuc の挿入箇所として、各遺伝子分節にコードされた MRV タンパクの ORF のそれぞれ N および C 末端側へ挿入した。NanoLuc を挿入した変異型 cDNA を、他 9 分節の野生型 cDNA と共に L929 細胞にトランスフェクションすること NanoLuc 活性をもつ組換え MRV(NanoLuc_MRV) の作製を試みた。

(6) NanoLuc-MRV によるマウスでの感染動態の可視化。ヌードマウス (Balb/cAJcl-nu) に NanoLuc-MRV を経鼻もしくは経口ルートで感染し、経時的にマウス体内におけるルシフェラーゼ活性の生体イメージングを行った。MRV 感染マウスに NanoLuc の基質 (Nanoglo, Promega) を静脈内投与し、IVIS (In Vivo Imaging System) を用いた可視化を行った。

(7) NanoLuc-MRV の腫瘍の生体イメージング。ヌードマウスの皮下にヒト前立腺癌由来細胞株 Du145 を移植し、腫瘍のサイズが

5mm 超になったところで NanoLuc-MRV を静脈内投与した。感染後、経時的に IVIS を用いたイメージングを行った。また経時的にマウスを安楽殺し、臓器 (肺、肝臓、腸管、脾臓、血液) におけるウイルス量とルシフェラーゼ活性の測定を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子改変による改良型 MRV 作成の基盤とするウイルス選定のため、複数の MRV 株の抗腫瘍活性を比較した。MRV T1L 株、T3D-F 株および T3D-C 株を用いて、ヒト由来癌細胞株に対する抗腫瘍活性を調べたところ、T3D-C 株が最も抗腫瘍活性が強く、次いで T3D-F 株、T1L 株の順であった (図 1)。この結果から T3D-C 株を基盤にした遺伝子操作系の確立を試みた。

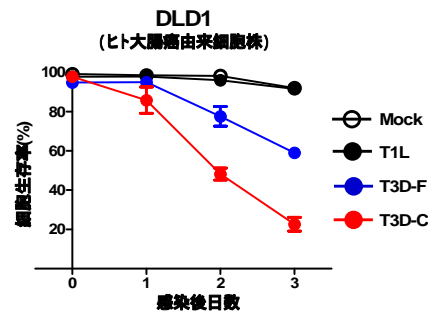


図1. MRV株間の抗腫瘍活性の比較

(2) 次に最も腫瘍溶解性の強かった T3D-C 株をベースにした遺伝子操作系 (RG 系) の確立を行った。T3D-C 株の各遺伝子分節をプラスミドにクローニングし、L929 細胞内でウイルス遺伝子の発現を行ったところ、感染性のある T3D-C 株を得ることが出来た。この人工遺伝子由来の T3D-C 株は株化癌細胞に対して野生型と同程度の抗腫瘍活性を示し、さらに A253 細胞 (頭頸部癌由来) を用いた癌細胞移植マウスモデルにおける腫瘍溶解能の試験においても野生型同様に強い抗腫瘍活性を示した。(図 2)。ここで確立された T3D-C 株の遺伝子操作系を用いて、より抗腫瘍活性の

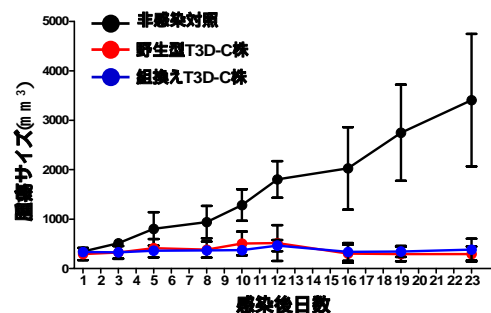


図2. 組換え MRV T3D-C 株による腫瘍溶解能の検討

強い組換え MRV の作製を試みた。

(3) 次に MRV のカプシドタンパクである sigma1 へ変異を導入することによる、感染性を改変した組換え MRV の作製を試みた。野生型 MRV は細胞表面に発現する JAM-A 分子と結合し感染することが知られており、JAM-A の発現が低下した癌細胞は MRV に対し感染抵抗性となっていることが知られている。そこで、JAM-A 発現が低下した癌細胞を標的とするために、MRV の sigma1 タンパクに RGD 配列を付加した RGD-MRV の作製を行った。RGD 配列は細胞表面に発現する特定のインテグリン ($\alpha_3 \beta_1$ 型もしくは $\alpha_5 \beta_1$ 型) に結合することが知られており、RGD 配列を付加することでインテグリン依存的な感染が期待された。MRV T3D-C 株の sigma1 に複数あるループ構造に RGD 配列を付加した MRV を作製したところ、JAM-A が発現している OVCAR3 細胞においては野生型と同様の増殖能および抗腫瘍活性を示したが、JAM-A の発現低下が認められた HS578T 細胞においては野生型 MRV がほとんど感染しないのに対し、RGD-MRV は効率よく感染し、高い抗腫瘍活性を示した (図 3,4)。

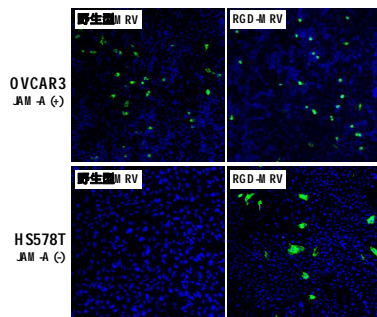


図3. RGD-MRV による癌細胞への感染の亢進

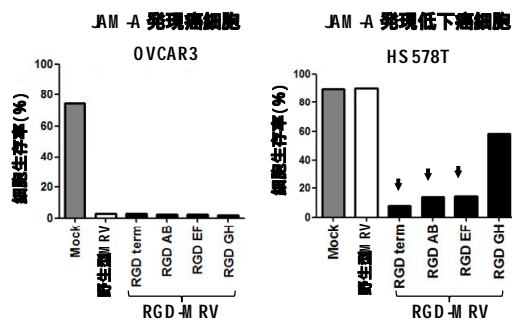


図4. RGD-MRV による抗腫瘍活性の亢進

RGD-MRV はこれまで MRV 抵抗性であった癌細胞も標的とできるため、今後の腫瘍溶解性 MRV の基盤となることが期待される。今後は RGD を付加したことによる病原性への影響を検討し、*in vivo* における抗腫瘍活性についての解析を行う予定である。

(4) 次に外来遺伝子を発現する MRV の作製を試みた。MRV の遺伝子操作系ではこれまで比較的サイズの大きな (>500bp) 機能的タンパク質を外来遺伝子として発現する組換え MRV は報告されていなかったが、我々は外来遺伝子としてルシフェラーゼの一種である NanoLuc 遺伝子を、MRV の L1 遺伝子分節に挿入し、NanoLuc 遺伝子と MRV の lamda1 遺伝子を 2A ペプチドで結合することで、NanoLuc を発現するレポーターMRV (NanoLuc_MRV) を作製した。NanoLuc_MRV に感染した細胞は強いルシフェラーゼ活性を示し、ウイルスの増殖とルシフェラーゼ活性には相関が認められ (図 5)、*in vitro* におけるレポーターウイルスとしての実験系に有用であることが示された。

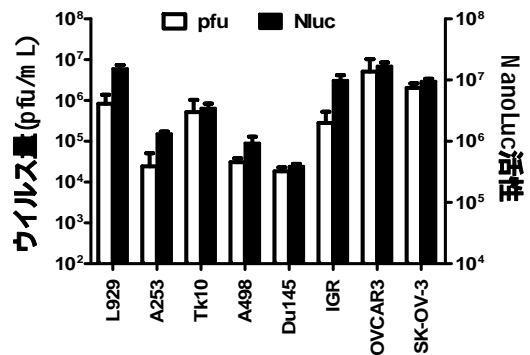


図5. 培養細胞におけるNanoLuc_MRVの増殖とルシフェラーゼ活性の相関

この NanoLuc_MRV をマウスに経鼻感染したところ、感染部位 (肺および腸管) に強いルシフェラーゼ活性が認められ、動物における MRV の感染動態を非侵襲的に観察できることが可能となった。(図 6)。

NanoLuc_MRV 野生型MRV

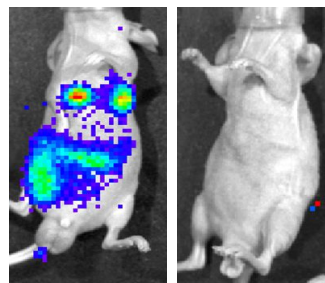


図6. NanoLuc_MRVによる感染部位の生体イメージング

さらに Du145 細胞 (ヒト前立腺癌) を移植した担癌マウスに NanoLuc_MRV を静脈投与したところ癌部に限局した発光が認められ、MRV

による腫瘍組織への感染動態の生体イメージングに成功した(図7)。

NanoLuc_MRV 野生型MRV

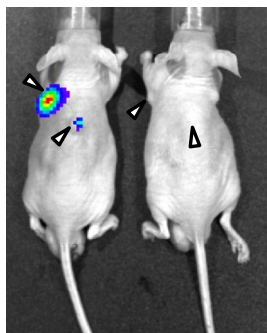


図7. NanoLuc_MRVによる腫瘍の生体イメージング

Nanoluc_MRVは腫瘍の検出だけでなく、MRVの感染動態の研究に非常に有用であると考えられる。また2Aペプチドを用いた外来遺伝子発現系を応用し、抗腫瘍因子として知られているGM-CSFやIL-12などのサイトカインを発現する組換えMRVの作製も可能であると考えられた。

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)

〔学会発表〕(計 4件)

金井祐太、川岸崇裕、小林剛、他1名、Oncolytic virotherapy using genetically engineered mammalian reoviruses, 第21回日本遺伝子治療学会(大阪) 2015年7月25日

金井祐太、川岸崇裕、小林剛、他1名、遺伝子改変オルソレオウイルスを用いた新規腫瘍溶解ベクターの開発、第62回日本ウイルス学会学術集会(大阪) 2014年11月12日

金井祐太、川岸崇裕、小林剛、他1名、レポーター遺伝子発現オルソレオウイルスの構築、第61回日本ウイルス学会学術集会(神戸) 2013年11月10日

川岸崇裕、金井祐太、小林剛、他2名、哺乳類オルソレオウイルスの腫瘍細胞溶解能の検討と遺伝子操作系の確立、第61回日本ウイルス学会学術集会(神戸) 2013年11月10日

〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページ
(<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/viral-replication/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 祐太 (Kanai, Yuta)
大阪大学 微生物病研究所 感染症国際研究センター ウイルス複製研究グループ、特任講師(常勤)
研究者番号: 80506501

(3) 連携研究者

小林 剛 (Kobayashi, Takeshi)
大阪大学 微生物病研究所 感染症国際研究センター ウイルス複製研究グループ、特任准教授
研究者番号: 90324847

(4) 研究協力者

川岸 崇裕 (Kawagishi, Takahiro)
大阪大学 微生物病研究所 感染症国際研究センター ウイルス複製研究グループ、学振特別研究員
研究者番号: 無し

松浦 善治 (Matsuura, Yoshiharu)
大阪大学 微生物病研究所 分子ウイルス分野、教授
研究者番号: 50157252

岡本 徹 (Okamoto, Toru)
大阪大学 微生物病研究所 分子ウイルス分野、助教
研究者番号: 80628595