

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430155

研究課題名(和文) ガンシクロビルにより増殖制御可能な腫瘍融解RNAウイルスの開発

研究課題名(英文) Development of oncolytic RNA virus sensitive to ganciclovir

研究代表者

白澤 浩 (SHIRASAWA, Hiroshi)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00216194

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)：腫瘍融解RNAウイルスSINは、染色体への組込みを起こさず、癌細胞特異的に感染・増殖し、癌細胞を融解する腫瘍融解ウイルスである。本研究では、SINを更に安全性の高い腫瘍融解ウイルスとすることを目的として、ヘルペスウイルスtk遺伝子を発現し、抗ヘルペスウイルス薬であるガンシクロビル(GCV)により増殖抑制可能な腫瘍融解ウイルスの開発を行った。その結果、E2に1アミノ酸変異を持ちカプシド遺伝子(C)とエンベロープタンパク質遺伝子(E2)間にtkとGFPのキメラ遺伝子を挿入したSINtkGFPmE2が最も安定した組換え体ウイルスであり、GCVによりウイルスの増殖が抑制されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：An RNA virus, SIN, is an oncolytic virus, which cause no integration of viral genome into chromosome, specific infection and proliferation in cancer cells. In this study, to improve the safety of SIN as an oncolytic virus, we developed a SIN that expresses herpesvirus tk gene and is sensitive to anti-herpesvirus drug ganciclovir (GCV). A recombinant SIN, SINtkGFPmE2, which have chimera gene of tk and GFP between capsid gene (C) and envelope protein gene (E2) mutated in 1 amino acid, was the most stable among recombinants we constructed. The SINtkGFPmE2 was sensitive to GCV and the proliferation was inhibited.

研究分野：ウイルス学

キーワード：腫瘍融解ウイルス ガンシクロビル RNAウイルス HSV tk

1. 研究開始当初の背景

がん治療にウイルスを利用する目的で、アデノウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルスが非増殖性ウイルスベクター、更には、がん細胞特異的融解能を持つ腫瘍融解ウイルスとして近年注目され、研究・開発されている。

現在用いられているウイルスベクターの多くは、DNA ウイルスか複製中間体として DNA を経る RNA ウイルス(レトロウイルス)である。これらのウイルスがウイルスベクターとして用いられてきた理由は技術的に DNA ウイルスの扱いが RNA ウイルスに比較して容易であることにあるが、ウイルスゲノムの染色体への組み込みリスクがある。

一方で、最近の RNA ウイルス複製に関する知見および技術の進歩により、RNA ウイルスをウイルスベクターとして利用するための知識・技術が蓄積され、注目されてきている。しかしながら、DNA ウイルスベクターに比べて、RNA ウイルス一般の基盤知見・技術が十分に整備されていないのが現状である。

RNA ウイルスベクターの中でも、トガウイルス科アルファウイルス属のシンドビスウイルス(SIN)は、がん治療用のウイルスベクターに適した下記のような特徴を有する。

(1)増殖型ウイルスベクターあるいは腫瘍融解ウイルスとしての SIN の優位性

ゲノムは RNA であり、複製中間体として DNA を経ることがないため、宿主染色体への組み込みのリスクがない。

SIN は、ヒトに対する病原性は低く、病原性を呈しても軽微の発熱・関節痛・発疹を引き起こすのみである。

構造蛋白質をコードする mRNA の発現は、RNA 上のプロモーター様配列(subgenomic promoter, sgPr)により調節され、ウイルスがコードする RNA ポリメラーゼにより転写されるため高発現である。このため、構造蛋白

質コード領域を外来遺伝子で置換することにより、外来遺伝子の高発現系を得ることが出来る。

複数の subgenomic promoter (sgPr)をタンデムに配置し、複数の外来遺伝子をウイルスの RNA ポリメラーゼにより高発現させることができる。

腫瘍特異的な複製とアポトーシス誘導能を持つため、腫瘍での発現は高発現である一方で、一過性である。がんをターゲットとした治療では利点となる。

IFN 応答の誘発能が高く、強いアポトーシス誘導能が加わり、持続的な外来遺伝子発現系としては適さないが、細胞性免疫誘導ワクチン、腫瘍融解ウイルスとしての効果が高い。

血液媒介性のウイルスとして進化したウイルスであるため、血液中に投与した際の免疫応答が弱い。

ウイルスのトロピズムが広く、様々な組織型に親和性がある。特に神経系に対する親和性が高い。

一方で、SIN は、低病原性ではあるが、ウイルス増殖を阻害する抗ウイルス薬が開発されていない。そのため、安全性に課題が残されている。

2. 研究の目的

(1)腫瘍融解ウイルスとしてのシンドビスウイルス(SIN)の課題の克服

RNA ウイルスの増殖をプロドラッグにより制御することができれば、安全性の高い腫瘍融解ウイルスとなる。効率の良いウイルス増殖抑制のメカニズムはウイルスの複製とリンクすることが望ましいことから、ウイルスゲノムの複製および転写に必須の RNA ポリメラーゼに自殺遺伝子(HSV-tk)を融合させればプロドラッグのガンシクロビルにより増殖制御可能な改変ウイルスを作製できるのではないかと考える。

SIN の RNA ポリメラーゼは一つのペプチド

として翻訳され、自身のプロテアーゼ活性により、nsp1, nsp2, nsp3, nsp4 の四つの分子となり、RNA ポリメラーゼ複合体を形成する。nsp3 は、融合タンパクとしても活性を維持出来ることが知られていることから、nsp3 に HSV-tk を融合させた改変ウイルスを作製することを試みる。

また、RNA ポリメラーゼに HSV-tk を融合させた SIN に比較して、安定性は劣ると考えられるが、自殺遺伝子(HSV-tk)を外来遺伝子として発現する増殖性の SIN も、ガンシクロビルにより増殖制御可能なウイルスになると考えられる。この改変ウイルスの実現性は高いが、HSV-tk の欠失変異体が生じる可能性が想定されるため、この点を検討する。

(2)改変 SIN の開発研究経緯と本課題の目的

我々は SIN が腫瘍特異的な融解性を持つ腫瘍融解ウイルスであることを既に報告し (Clin Cancer Res 11, 4553-4560, 2005, Br J Cancer 101, 684-890, 2009)、自己複製をする RNA 分子のシンドビスウイルス RNA レプリコンに腫瘍特異性のあることを報告し、腫瘍特異的な融解能の高い SIN AR339 株のレプリコン変異体を作製している。

本研究では、SIN AR339 株レプリコンをベースとし、がん治療に応用する際に問題となる課題を克服した増殖性ウイルスベクターおよび改変腫瘍融解ウイルスをリバー・ジェネティクスにより作製するための基盤技術確立を目的とする。

3 . 研究の方法

本研究においてはシンドビスウイルス (SIN) の腫瘍溶解性ウイルスとしての課題を克服するために、ガンシクロビル感受性改変 SIN を作製し、評価を行った。

まず、我々が開発した腫瘍融解性 SIN レプリコンをベースとして、HSV-tk を外来遺伝子として発現するレプリコンを作成し、ガンシクロビル(GCV)によるレプリコン複製抑制効果を確認した後に、ウイルスの RNA ポリメラ

ーゼにインフレームで HSV-tk を挿入したガンシクロビル(GCV)感受性レプリコンを評価する。それぞれのレプリコンをベースとして、HSV-tk を外来遺伝子として発現する改変 SIN およびウイルス RNA ポリメラーゼに HSV-tk を融合させた改変 SIN の GCV 感受性を確認・評価した。

4 . 研究成果

(1) ガンシクロビル感受性改変 SIN の作製

本研究において、SIN AR339 を親株として、下図に示す 4 種類のガンシクロビル(GCV)感受性シンドビスウイルスを作製した。

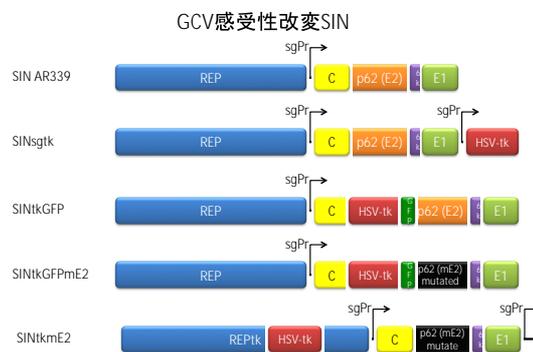


図 1 本課題で作製した GCV 感受性改変 SIN (2)3' 末端にサブジェノミックプロモーターと共に HSV-tk を持つ SINsgtk

SINsgtk は、挿入した HSV-tk 遺伝子が不安定であり、ウイルスを回収することが困難であり、継代すると HSV-tk 遺伝子が脱落してしまうことが明らかとなった。そこで、組換え体ウイルスの回収効率を上げるために、C 遺伝子下流に GFP 遺伝子と共に HSV-tk を挿入した SINtkGFP を構築した。

(3)SINtkGFP

SINtkGFP も回収することが困難であり、回収されたウイルスは SINsgtk 同様に不安定であり、HSV-tk が脱落した。HSV-tk の遺伝子配列自体が不利なのか、HSV-tk 蛋白質がウイルスの複製に不利であるのかを検討したところ、2nd ATG から HSV-tk を発現させた組換え体ウイルスを回収することが出来たものの、HSV-tk の発現は弱く、GCV 感受性が弱い

ことが分かった。この結果から、HSV-tk 発現自体がウイルスの複製にとって不利であることが想定された。

そこで、GCV 感受性を持ち、かつ増殖能の高い組換え体のクローニングを試みた結果、p62(E2)に 1 アミノ酸置換(127Lys->127Glu)のある変異体の回収率および GCV 感受性が高いことが明らかとなり、SINtkGFPmE2 を以降の実験に用いた。また、エンベロープ蛋白質である E2 がウイルスの吸着に関与することから、ウイルス粒子の産生自体に HSV-tk が不利に働き、ウイルス力価を低下させることが想定された。

(4)SINtkGFPmE2 の GCV 感受性

HeLa 細胞における SINtkGFPmE2 の GCV 感受性

SINtkGFPmE2 による細胞変性(CPE)は、GCV により明らかに抑制された(図2、矢印)。

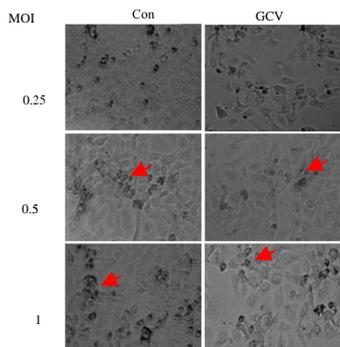


図2 SINtkGFPmE2 感染 HeLa 細胞の GCV による形態変化

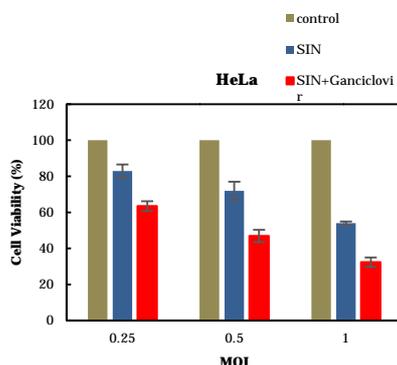


図3 HeLa 細胞に対する SINtkGFPmE2 細胞傷害性への GCV の影響

一方で、図3に示すように、HeLa 細胞に対する SINtkGFPmE2 の細胞傷害性(腫瘍融解性)

は、GCV の投与により増強することが明らかとなった。

Vero 細胞における SINtkGFPmE2 の GCV 感受性

GCV を添加した場合の正常細胞における SINtkGFPmE2 の感受性を Vero 細胞を用いて検討した。Vero 細胞においても、SINtkGFPmE2 は軽度の CPE を誘導するが、HeLa で観察された GCV の影響は Vero 細胞では観察されなかった(図4、矢印)。

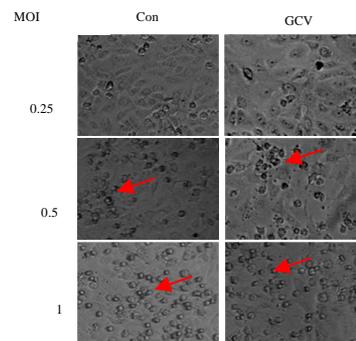


図4 SINtkGFPmE2 感染 Vero 細胞の GCV による形態変化

一方、図5に示すように Vero 細胞に対する細胞傷害性は、GCV により増強するが HeLa 細胞に対する場合に比較して軽度であることが観察された。

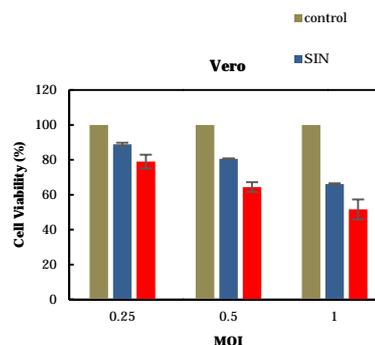


図5 Vero細胞に対する SINtkGFPmE2 細胞傷害性への影響

(5)RNA ポリメラーゼ nsp3 と HSV-tk 融合タンパクを発現する SINtkmE2

SINtkGFPmE2 は、ウイルス後期蛋白質と共に HSV-tk を発現する組換え体であったが、HSV-tk をウイルスの初期蛋白質である RNA ポリメラーゼと共に発現する組換え体は、更に GCV によるウイルス増殖抑制が強いことが想

定される。そこで、RNA ポリメラーゼのコンポーネントの一つである nsp3 と HSV-tk の融合蛋白質を発現する組換え体の作製を試みた。その結果、HeLa 細胞より回収されるウイルスでは HSV-tk が欠落し、組換え体ウイルスが不安定であることが想定された。

(6)考察

本研究では、ウイルスの 3' 末端に付加したサブジェノミックプロモーター (sgPr) より HSV-tk を発現する SINsgtk、カプシド遺伝子(C)とエンベロープタンパク質遺伝子(E2)間に HSV-tk と GFP のキメラ遺伝子を挿入した SINtkGFP、E2 に 1 アミノ酸変異 (127Lys->127Glu)を持つ SINtkGFPmE2、および nsp3 と HSV-tk のキメラ遺伝子を持つ SINtkmE2 を作製することに成功し、これらの HSV-tk 発現組換え SIN を用いて GCV に対する感受性について検討を行った。

その結果、SINtkGFPmE2 が最も安定した組換え体ウイルスであり、GCV によりウイルスの増殖が抑制されることを確認した。また、GCV 添加によるウイルスの増殖抑制と共に見られる細胞毒性は、正常細胞の Vero 細胞では低い一方で、癌細胞の HeLa 細胞で顕著であることを見出した。この現象は、腫瘍融解ウイルスとして好ましい性質であるが、癌細胞である HeLa 細胞において SIN の複製・発現が高く HSV-tk の発現が癌細胞において高いためであると考えられた。一方で、HSV-tk が組みこまれた SIN は野生型 SIN と比較して不安定であることが明らかとなり、増殖安定株の選択を試み、E2 に 1 アミノ酸変異を持つ変異体のクローニングに成功した。この変異を持つ SINtkGFPmE2 および SINtkmE2 を得たが、SINtkGFPmE2 のみが安定した株となり、HSV-tk 発現 SIN の安定性が今後の課題となった。

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 10 件)

Win NN, Kanda T, Nakamoto S, Yokosuka O, Shirasawa H. Hepatitis C virus genotypes in Myanmar. World J Gastroenterol. 査読有 2016;22:6095-9.

Wu S, Kanda T, Nakamoto S, Jiang X, Nakamura M, Sasaki R, Haga Y, Shirasawa H, Yokosuka O. Cooperative effects of hepatitis B virus and TNF may play important roles in the activation of metabolic pathways through the activation of NF- κ B. Int J Mol Med. 査読有 2016;38:475-81.

Sasaki R, Kanda T, Nakamura M, Nakamoto S, Haga Y, Wu S, Shirasawa H, Yokosuka O. Possible Involvement of Hepatitis B Virus Infection of Hepatocytes in the Attenuation of Apoptosis in Hepatic Stellate Cells. PLoS One. 査読有 2016;11:e0146314.

Suganami A, Iwadate Y, Shibata S, Yamashita M, Tanaka T, Shinozaki N, Aoki I, Saeki N, Shirasawa H, Okamoto Y, Tamura Y. Liposomally formulated phospholipid-conjugated indocyanine green for intra-operative brain tumor detection and resection. Int J Pharm. 査読有 2015;496:401-6.

Kanda T, Sasaki R, Nakamoto S, Haga Y, Nakamura M, Shirasawa H, Okamoto H, Yokosuka O. The sirtuin inhibitor sirtinol inhibits hepatitis A virus (HAV) replication by inhibiting HAV internal ribosomal entry site activity. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 2015;446:567-71.

Nakamoto S, Imazeki F, Arai M, Yasui S, Nakamura M, Haga Y, Sasaki R, Kanda T, Shirasawa H, Yokosuka O. Effect of Hepatitis C Virus Genotype 1b Core and NS5A Mutations on Response to Peginterferon Plus Ribavirin Combination Therapy. Int J Mol Sci. 査読有 2015;16:21177-90.

Takenouchi A, Saito K, Saito E, Saito T, Hishiki T, Matsunaga T, Isegawa N, Yoshida H, Ohnuma N, Shirasawa H. Oncolytic viral therapy for neuroblastoma cells with Sindbis virus AR339 strain. Pediatr Surg Int. 査読有 2015;31:1151-9.

Sasaki R, Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Haga Y, Jiang X, Nakamura M, Shirasawa H, Yokosuka O. Association between hepatitis B virus and MHC class I polypeptide-related chain A in human hepatocytes derived from human-mouse chimeric mouse liver. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 2015;464:1192-5.

Yi R, Saito K, Isegawa N, Shirasawa H. Alteration of cell cycle progression by Sindbis virus infection. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 2015;462:426-32.

Nakamoto S, Kanda T, Shirasawa H, Yokosuka O. Antiviral therapies for chronic hepatitis C virus infection with cirrhosis. World J Hepatol. 査読有 2015;7:1133-41.

[学会発表](計3件)

Yoshifumi Ohno, Yi Ruirong, Chen Weiwei, Tian Zheng, Guo Shuhan, Qisen Li, Ma Xue, Akiko Suganami, Kengo Saito,

Yutaka Tamura, Naohisa Isegawa, Hiroshi Shirasawa (2016) Alteration of cell cycle progression by Sindbis virus infection. The 64th annual meeting of the Japanese society for virology. October 24, 2016. Sapporo Convention Center (Hokkaido, Sapporo)

大野 吉史、蟻 瑞栄、陳 偉巍、田 錚、郭 書翰、馬 雪、菅波 晃子、齋藤 謙悟、伊勢川 直久、田村 裕、白澤 浩 (2015) 腫瘍溶解ウイルスSindbis virusは癌細胞をS期に誘導する、2015年10月9日、第74回日本癌学会学術総会。名古屋国際会議場 愛知県名古屋市

Yoshifumi Ohno, Yi Ruirong, Chen Weiwei, Tian Zheng, Guo Shuhan, Ma Xue, Akiko Suganami, Kengo Saito, Yutaka Tamura, Hiroshi Shirasawa (2015) Screening and identification of compounds with antiviral activity against human respiratory syncytial virus. The 63rd annual meeting of the Japanese society for virology. November 22, 2015. Fukuoka Convention Center (Fukuoka, Hakata-ku)

6. 研究組織

(1)研究代表者

白澤 浩 (SHIRASAWA, Hiroshi)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：00216194

(2)研究分担者

齋藤 謙悟 (SAITO, Kengo)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：70451755

(3)研究分担者

菅波 晃子 (SUGANAMI, Akiko)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：10527922