

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430156

研究課題名(和文) がん幹細胞の根絶を目指した新規ウイルス療法の基礎開発

研究課題名(英文) Basic research on novel oncolytic virus therapy targeting glioma initiating cells

研究代表者

岩井 美和子 (IWAI, Miwako)

東京大学・医科学研究所・技術専門職員

研究者番号：50396884

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)：第三世代がん治療用遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス1型、G47 を元に、がん幹細胞をも標的とする、脳腫瘍の根絶的な治療に結びつく新規ウイルスの開発研究を実施した。BMP4分子に着目し、BMP4発現型ウイルスを作製した。膠芽腫の臨床検体から樹立した複数のがん幹細胞株において、高い殺細胞効果を示した。更に、がん幹細胞で形成したマウス脳内腫瘍モデルにて有効性を検証したところ、がん幹細胞性の高い脳腫瘍に対して、BMP4発現型G47 は高い有効性を持つ可能性が示唆された。再発率の高い悪性神経膠腫における根絶的な治療として実用性の高いウイルス療法の基礎開発が進んだ。

研究成果の概要(英文)：We performed a basic research for the development of a novel oncolytic herpes simplex virus type 1 (HSV-1) targeting glioma initiating cells (GICs). Using a third generation oncolytic HSV-1, G47, as the backbone, we constructed a novel oncolytic HSV-1, termed T-BMP4, by incorporating the human bone morphogenetic proteins 4 (BMP4) gene into the viral genome. T-BMP4 exhibited a potent efficacy in vitro for several GIC lines established from clinical glioma specimens. In mice intracranial GIC-tumor model, intratumoral injections with T-BMP4 significantly prolonged the survival compared with mock treatment. Further, T-BMP4 was significantly more efficacious than the control virus T-01. These results suggest that oncolytic HSV-1 armed with BMP4 exhibits enhanced therapeutic efficacy especially for GIC rich tumors, and may serve as a practical tool for the eradication of malignant glioma with high recurrence rate.

研究分野：医歯薬学、分子生物学

キーワード：ウイルス療法 脳腫瘍 がん幹細胞 単純ヘルペスウイルス1型

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫は原発性脳腫瘍の約 28% を占める代表的な悪性脳腫瘍で、グレード 3 以上の悪性神経膠腫は予後不良の難治性腫瘍である。悪性神経膠腫は脳実質内に浸潤性に発育するため、外科的切除のみでは高い治療効果を得ることができない。放射線治療や化学療法薬も開発されているが根治は難しく、ほとんど治療成績の改善がみられていないのが現状であり、加えて再発率が非常に高く、既存の治療法とは異なる新しい治療法が求められている。また薬剤および放射線抵抗性、再発時の腫瘍原性の要因として、脳腫瘍幹細胞の存在が挙げられる。がん細胞は全てが無限の増殖能を有した均一な細胞集団ではなく、腫瘍内に存在するがん幹細胞のみが新たに腫瘍を形成できる自己複製能と多分化能を有する。これまでに開発された抗がん剤や放射線治療はがん細胞の増殖性を標的として開発されてきたが、がん幹細胞自身は増殖性が低いいため、標的から逃れ、再発の要因となることから、こうしたがん幹細胞を標的とした治療法の確立が望まれている。

近年、脳腫瘍に対する新しい治療法として、増殖型ウイルスによってがん細胞を直接破壊するウイルス療法が注目されている。申請者の所属する研究室では、腫瘍細胞選択的に複製する遺伝子組換え HSV-1 を用いたがんのウイルス療法の開発を進めている。所属研究室で開発された、G47 Δ は、34.5 と ICP6 の 2 つのウイルス遺伝子を改変した第二世代 (G207) から作製された。34.5 は HSV-1 の病原性に関連した遺伝子で、これを欠失させると正常細胞でのウイルス複製能が著しく減弱する。また ICP6 遺伝子はウイルス DNA の合成に必要なリボヌクレオチド還元酵素 (RR) の大サブユニットをコードする遺伝子で、この遺伝子の欠失により、非分裂細胞では複製できず、増殖が盛んで RR 活性が上昇しているがん細胞でのみウイルスの欠落酵

素が補われて選択的にウイルス複製が可能となる。この二重変異は正常組織における病原性を著しく減弱させ、米国における悪性神経膠腫患者を対象とした臨床試験でもその高い安全性が示されたが、同時にがん細胞でのウイルス複製能も減弱させた。G47 Δ は G207 の 47 遺伝子に変異を加えた改良型である。47 は HSV-1 が宿主免疫系から逃れる防御機構として機能するが、47 を欠失させることにより感染した腫瘍細胞の免疫原性低下を防ぎ、抗腫瘍免疫による効果を増強することができる。また、本来後期発現の US11 遺伝子が 47 プロモーターの制御下となって複製最早期に発現するため、34.5 欠失で減弱したウイルスの複製能力ががん細胞選択的に回復し、親株である G207 に比して、その安全性を維持しながら、抗腫瘍効果を格段に改善した (Todo T et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 2001)。更に Bacterial artificial chromosome (BAC) を用いた遺伝子組換え技術を利用して、G47 を基本骨格として任意の機能遺伝子を効率よく組み込むことができる T-BAC システムを開発し、様々な機能を付加した「機能付加型 G47」を短期間で作製することが可能である。

2. 研究の目的

がん幹細胞をも標的とする、脳腫瘍の根絶的な治療に結びつく新規がん治療用 HSV-1 を開発し、その有効性を評価することを目的とした。所属研究室では、膠芽腫の臨床検体からがん幹細胞を樹立することに成功しており、現在も樹立を続けている。更に当研究室において G47 はこれらのがん幹細胞にも効率良く感染し破壊することを見出している (未発表データ)。一方で、がん幹細胞性を失わせる分子として TGF- β スーパーファミリーに属する骨形成因子 (bone morphogenetic protein) の一つである BMP4 分子に着目した。BMP4 は分化、増殖および

様々な細胞機能を調節することが知られているが、これまでにヒト神経膠芽腫幹細胞において増殖抑制ならびにアストロサイトへの分化を誘導し、更には BMP4 処理したヒト神経膠芽腫幹細胞をマウス脳内に移植した場合には顕著な腫瘍増殖抑制ならびに死亡率の低下が見られることが報告されている (Piccirillo S. G. M., et. al., Nature 2006)。当研究室においても、BMP4 は脳腫瘍幹細胞の in vitro での sphere 形成を抑制することが観察できており、BMP4 の作用により脳腫瘍幹細胞の腫瘍原性を強く抑制できると考えられる。従って、BMP4 発現型 G47 、 T-BMP4 を作製することにより、腫瘍細胞増殖抑制のみならず、がん幹細胞の腫瘍原性をも抑制することでより効果的にがん幹細胞を攻撃でき、がんの根絶的治療に結びつくことが期待できる。

3 . 研究の方法

(1) T-BAC システムを活用した BMP4 発現型 G47 、 T-BMP4 の作製

所属研究室で開発された任意の遺伝子カセットを確実に挿入し、短期間で作製可能な G47 を基本骨格とする T-BAC システムを利用する。最終的なウイルス株は限外希釈法にて単離する。組換えウイルスによって産生された BMP4 の活性の確認は、まず、HEK 293T 細胞に組換えウイルスを感染後、その培養上清を回収する。この培養上清を新たに準備した HEK293T 細胞に加え、数時間後に細胞を回収し、その RNA を調整後、RT 反応を行い、リアルタイム PCR にて BMP4 の下流分子である Id1 および Smad7 の発現上昇を確認する。コントロールウイルスとしては目的遺伝子のない空のカセットを同様のシステムで導入した T-01 を用いる。また遺伝子発現型 HSV-1 ウイルスは、時としてその複製・感染能力が減弱することがある。そこで作製した T-BMP4 の基本的性質である、複製能および感染効率

が T-01 と相違があるかどうかを検証する。

(2) T-BMP4 のがん幹細胞に及ぼす効果

所属研究室において、膠芽腫の臨床検体から長期培養に成功したヒト脳腫瘍がん幹細胞株 12 種類およびオハイオ大学から分与された 3 種類を用いる。複数のがん幹細胞株において、in vitro の系で T-BMP4 の殺細胞効果を T-01 と比較する。また in vivo の系としてはヒト膠芽腫由来がん幹細胞を用いたヌードマウスの脳内移植モデルにて、作製した T-BMP4 のマウス生存に及ぼす効果を検証し、T-01 の効果と比較検討する。

4 . 研究成果

(1) BMP4 発現型 G47 、 T-BMP4 の作製

T-BAC システムを利用して、ヒト BMP4 の cDNA を CMV プロモーター下に発現するカセットを G47 ゲノムに挿入することで、T-BMP4 を作製した。まず、作製したウイルスの BMP4 発現の確認を行った。T-BMP4 および T-01 を HEK293T 細胞に感染後、その培養上清を回収し、別に準備した HEK293T 細胞の培養上清に加えて更に培養後、細胞を回収し、RNA を抽出後、BMP4 下流分子である Id1 および Smad7 のリアルタイム PCR を行ったところ、T-BMP4 の培養上清を加えた場合のみ Id1 および Smad7 の mRNA の発現誘導が確認できた。このことから、T-BMP4 は目的通り BMP4 を発現するウイルスであることが確認できた。

次に、作製したウイルスの基本的性能である、Vero 細胞における殺細胞効果とウイルス複製能および感染効率を T-01 と比較したところ、T-01 とほぼ同等の殺細胞効果およびウイルス複製能、感染効率が認められ、BMP4 発現機能を付加することによりウイルスの基本的性能に影響がないことを確認した。

(2) 脳腫瘍幹細胞株における殺細胞効果

膠芽腫の臨床検体から樹立したヒト脳腫瘍幹細胞株における in vitro の系で T-BMP4 のウイルス複製能および殺細胞効果を検証

した。15 種類の脳腫瘍幹細胞株中、11 種類においては T-BMP4, T-01 とともに高い殺細胞効果を示した。残りの 4 種類については、T-01 に比べ、T-BMP4 の方が高い殺細胞効果を示した。

(3) マウス脳内腫瘍モデルにおける T-BMP4 の治療効果

In vivo の評価系としてヒト膠芽腫由来がん幹細胞を用いたヌードマウスの脳内移植モデルにて、T-BMP4 のマウス生存に及ぼす効果を検証し、T-01 の効果と比較検討したところ、in vitro で、T-BMP4 と T-01 の殺細胞効果に差が見られなかった脳腫瘍幹細胞株においては、ウイルス投与群は mock 群に比べて有意に生存を延長したものの、T-01 と T-BMP4 に差は認められなかった。一方、In vitro の系で T-01 に比べ T-BMP4 が高い殺細胞効果を示した細胞株を用いた脳腫瘍モデルにおいては、mock 群に比べ、ウイルス投与群は有意に生存期間の延長効果が認められ、更に T-01 投与群に比べ T-BMP4 は有意に生存期間の延長を示した。以上から、がん幹細胞性の高い脳腫瘍に対しては特に、BMP4 発現型 G47 が高い有効性を持つ可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

岩井美和子、藤堂具紀：次世代がん治療用 HSV-1 の開発。遺伝子医学、査読無、MOOK30: 57-62, 2016.

田中実、岩井美和子、藤堂具紀：がんのウイルス療法。実験医学、査読無、34(12): 2052-2055, 2016.

〔学会発表〕(計 2 件)

岩井美和子、稲生靖、渡部徹朗、宮園浩平、藤堂具紀 がん幹細胞が豊富な腫瘍に対する TGF- 阻害分子発現型 HSV-1 の治療効果、

第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 27 日、横浜

岩井美和子、稲生靖、渡部徹朗、宮園浩平、藤堂具紀 脳腫瘍幹細胞を標的とした BMP4 発現型 HSV-1 の治療効果、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 8 日、横浜

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/cancer/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

岩井 美和子 (Iwai, Miwako)

東京大学・医科学研究所・技術専門職員

研究者番号：50396884

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

藤堂 具紀 (Todo, Tomoki)

稲生 靖 (Ino, Yasushi)

宮園 浩平 (Miyazono, Kohei)

渡部 徹郎 (Watabe, Tetsuro)