

201220058A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

マイクロRNAを指標にして癌を標的破壊する純和製抗癌ウイルス製剤
の開発とその臨床応用に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中村 貴史

平成25(2013)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

マイクロRNAを指標にして癌を標的破壊する純和製抗癌ウイルス製剤
の開発とその臨床応用に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中村 貴史

平成25（2013）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

マイクロRNAを指標にして癌を標的破壊する純和製抗癌ウイルス製剤の開発と その臨床応用に関する研究 中村貴史	----- 1
--	---------

II. 分担研究報告

1. 造血器腫瘍に対する純和製抗癌ウイルスの抗腫瘍効果と 安全性の評価に関する研究 東條 有伸	----- 8
---	---------

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 1 5
---------------------	-----------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 1 6
-----------------	-----------

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

マイクロRNAを指標にして癌を標的破壊する純和製抗癌ウイルス製剤の開発と
その臨床応用に関する研究

研究代表者 中村 貴史 鳥取大学 准教授

研究要旨

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癌ウイルス療法に関する前臨床研究、及び臨床試験が積極的に行われている。これは、ウイルスが本来持っている癌細胞に感染後、癌組織内で増殖しながら死滅させるという性質を利用する方法である。本研究では、純国産ワクシニアウイルスワクチン株の安全性に注目し、遺伝子組換え技術により改良を加え、“純和製抗癌ウイルス製剤”として活用する。これまでの研究では、正常組織と比べ肺癌、膵臓癌、乳癌、及び悪性リンパ腫などで発現が低下しているlet7aの標的配列をウイルス伝播増殖に重要であるウイルス膜蛋白B5R遺伝子の3'非翻訳領域に挿入することで、癌細胞ではB5Rを発現させる（＝ウイルスは増殖する）が、正常細胞ではB5Rを発現させない（＝ウイルスは増殖しない）ようワクチン株を改良した。本研究では、腫瘍特異性をさらに向上させるため、このmiRNA制御に加え、ウイルスTK遺伝子を欠失させた多因子制御ワクシニアウイルス（MDVV）を作成し、担癌マウスモデルにおいてMDVVの全身投与によって副作用なく転移した癌を標的破壊できることを実証した。

**研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属
研究機関における職名**

東條有伸・東京大学医科学研究所・教授

A. 研究目的

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癌ウイルス療法に関する前臨床研究、及び臨床試験が積極的に行われている。これは、ウイルスが本来持っている癌細胞に感染後、癌組織内で増殖しながら死滅させるという性質を利用する方法である。本研究の目的は、純国産ワクシニアウイルスワクチン株の安全性に注目し、遺伝子組換え技術により改良を加え、“純和製抗癌ウイルス製剤”として活用することにある。本研究では、現行の治療法

に極めて高い抵抗性を示す難治性悪性腫瘍に対する純和製抗癌ウイルスによる革新的な治療法の確立を目指す。さらに、臨床応用に向けウイルス製剤のGMP製造や品質管理に関する基盤技術を構築することによって、本研究の成果をシームレスに臨床応用へと直結させることを目指す。

B. 研究方法

これまで本研究では、純国産ワクシニアウイルスワクチン株を基に、3種類の遺伝子組換えワクシニアウイルス（無制御ワクシニアウイルス、miRNA制御ワクシニアウイルス、多因子制御ワクシニアウイルス）を作製した。無制御ウイルスでは、感染細胞内においてB5Rが恒常的に発現する。一方miRNA制御ウイルスでは、ウイルスのB5R

遺伝子の3'非翻訳領域へ、正常組織と比べ肺癌、膵臓癌、卵巣癌や造血器腫瘍などで発現が低下している let7a の標的配列が挿入されている。これより let7a によって B5R の発現が制御される。又、両者のウイルスとも、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現ユニットが HA 遺伝子に挿入され、これによって HA 遺伝子は機能しない。尚、HA 遺伝子の欠失はウイルス複製能に影響を及ぼさない。多因子制御ワクシニアウイルス (MDVV) では、この let7a による B5R の発現制御に加え、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現ユニットが HA ではなく TK 遺伝子に挿入され、これによって TK 遺伝子が機能しない。これは、miRNA によるウイルス伝播増殖能の制御に加え、ウイルス TK 遺伝子が機能を失うと、正常細胞におけるウイルスの複製能は低下するが、癌細胞にはこの遺伝子の機能を補う酵素が豊富に存在するためウイルスの複製能は低下せず、結果的に腫瘍特異性が向上したためである。

本年度の研究では、この多因子制御ワクシニアウイルス MDVV の投与量と抗癌効果の関係を評価するため、免疫不全 SCID マウスの腹腔内に、正常組織と比べ let7a の発現が低下しているヒト膵臓癌細胞 BxPC-3 を投与し、その7日後に 10^5 、 10^6 、又は 10^7 pfu の MDVV を腹腔内に投与した (図1)。その後、抗癌効果 (腫瘍発育抑制効果と生存期間延長効果)、及び腫瘍特異的増殖性を評価した。尚、BxPC-3 はウミシイタケルシフェラーゼを発現しているため、セレンテラジン投与によってマウス体内の腫瘍分布を非侵襲的にモニターできる。一方、各ワクシニアウイルスはホタルルシフェラーゼを発現しているため、ルシフェリン投与によってマウス体内のウイルス分布を非侵襲的にモニターできる。

一方、MDVV の臨床応用を想定すると、天然痘撲滅に伴って 1976 年以降の予防接種は廃止されたが、それ以前に接種を受けた癌患者を対象とする場合、その抗体価は一般的に低いもののワクシニアに対する免疫を獲得しているため、MDVV による治療効果が弱まるのではと危惧される。そこで予防接種を受けた状態を再現するため、免疫能

のある C57BL/6 マウスを用いて、MDVV の全身投与による抗癌効果を評価した (図2)。C57BL/6 マウスを MDVV (10^7 pfu) でワクチネーションし、その19日後に同系マウス大腸癌細胞 (MC38) を皮下に移植した。7日後腫瘍が約 100mm^3 になった時、同量の MDVV を尾静脈内投与した。その後、生体内でのウイルス増殖を、ルシフェリン投与によって非侵襲的にモニターするとともに、抗癌効果 (腫瘍発育抑制効果) を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究を実施するにあたり、DNA 組換え実験は、鳥取大学遺伝子組換え実験安全委員会承認されている。その中の自立的な増殖力、感染力を保持した組換えワクシニアウイルスの作成・使用に関しては、文部科学省の第二種使用等拡散防止措置指針に従い、大臣確認実験承認を得ている。又、全ての動物実験は、鳥取大学動物実験委員会の承認を得ており、その実施にあたっては、同大学動物実験指針を遵守し動物愛護上の配慮を十分に行っている。

C. 研究結果

BxPC-3 腹膜播種マウスモデル (各群5匹) において、ウイルス投与2日前には同等に成長した腫瘍が、 10^5 、 10^6 、又は 10^7 pfu の多因子制御ウイルス MDVV 治療群とも治療11日後の腹腔内では、治療前の90%以上の腫瘍が消失していた (図3と図4)。一方、生理食塩水群では治療効果がなく腫瘍が増大していた (図3と図4)。これより、MDVV 治療群では、生理食塩水を投与したコントロール群と比べ、著明な生存の延長が見られた (図5)。最終的に MDVV 治療群のマウスは、再発した腫瘍によって死亡したが、全身の正常組織へ伝播増殖に伴うウイルス毒性 (急激な体重減少) は見られなかった。

一方、C57BL/6 担癌マウスモデル (各群5匹) において、MDVV は抗ウイルス抗体存在下でも、血中を介して腫瘍に到達し増殖しており (図6)、生理食塩水を投与したコントロール群と比べ著明な腫瘍発育抑制効果も確認できた (図7)。

D. 考察

BxPC-3 腹膜播種マウスモデルにおいて、 10^5 pfu の MDVV 治療群の抗癌効果が、10 倍、100 倍の MDVV 治療群のそれと同等であることは、より低い投与量でも、感染した癌細胞内で増殖しながら死滅させるというワクシニアウイルス本来の性質を利用することによって、強力な抗癌効果を期待できることを示唆している。

一方、C57BL/6 担癌マウスモデルにおいて、MDVV が抗ウイルス抗体存在下でも血中を介して腫瘍に到達し増殖できることは、転移した腫瘍に対して血中を介した治療戦略の妥当性を示すものである。

E. 結論

以上より、miRNA 制御に加え、ウイルス TK 遺伝子を欠失させた多因子制御ワクシニアウイルス (MDVV) は、極めて高い腫瘍特異的増殖能を有することが実証され、より安全で効果的な抗癌ウイルスとして期待で

きる。さらに、MDVV は血中を介して効率よく腫瘍組織に到達することも確認できたことより、副作用なく全身に転移した癌を標的破壊する癌ウイルス療法として期待できる。

一方、癌における miRNA の特性を利用してウイルスを制御する本アプローチでは、ウイルスの増殖に伴う抗癌作用は細胞内の miRNA に依存する。個々の癌患者の多様性 (腫瘍内において let7a が低下していない場合) に対応するため、新たな指標になり得る miRNA を探索した。その結果、正常細胞と比べて広範な造血器腫瘍細胞において miR10a、miR150、miR199a、miR203 が低下していることを明らかにしており、今後は let7a と同様にこれらの miRNA の特性を利用しても腫瘍を標的破壊する癌ウイルス療法に成り得るかどうかを検討する予定である。

F. 健康危険情報
なし

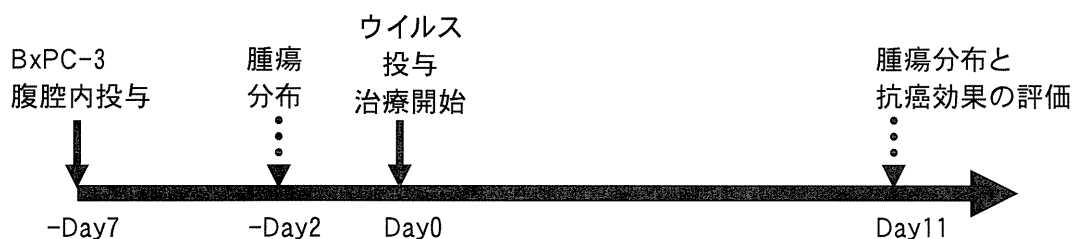


図1 BxPC-3 腹膜播種マウスモデルの実験スケジュール

BxPC-3 はウミシイタケルシフェラーゼを発現しているので、セレンテラジン投与によってマウス体内の腫瘍分布・増殖を非侵襲的にモニターできる。

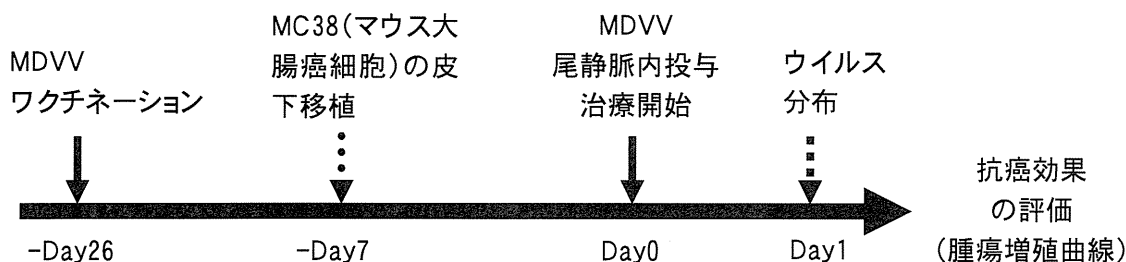


図2 C57BL/6 担癌マウスモデルの実験スケジュール

MDVV は感染細胞内でホタルルシフェラーゼを発現するので、ルシフェリンを投与することにより、マウス体内のウイルス分布を非侵襲的にモニターできる。

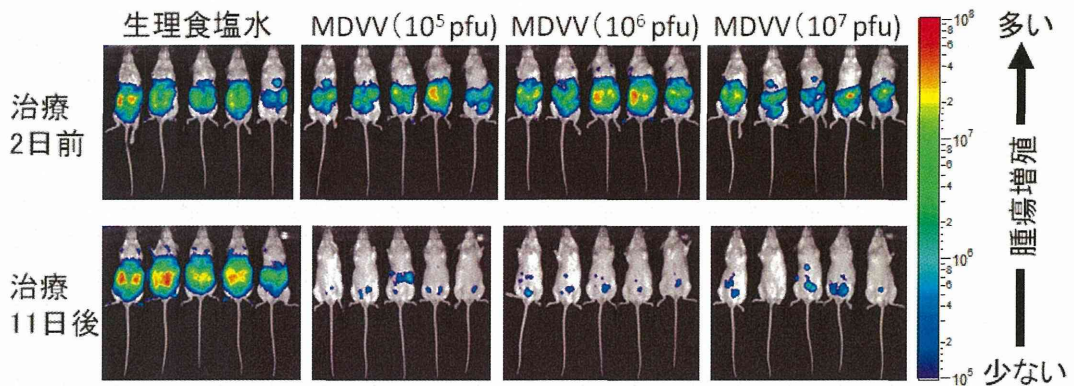


図3 腫瘍イメージングによるMDVVの投与量と抗癌効果の解析

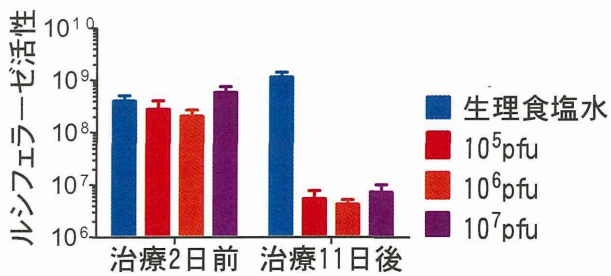


図4 MDVVの抗癌効果

図3におけるルシフェラーゼ活性を数値化した。数値が高いほど癌細胞数は多くなる。

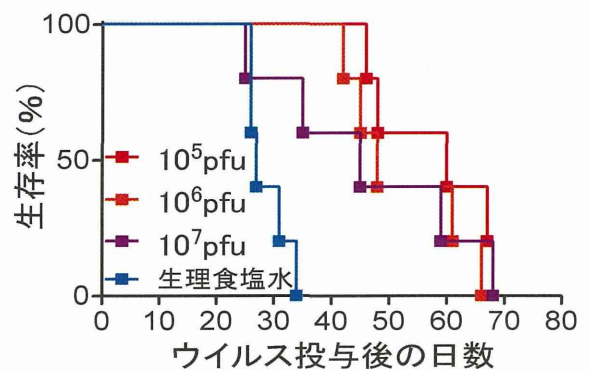


図5 MDVVの生存期間延長効果

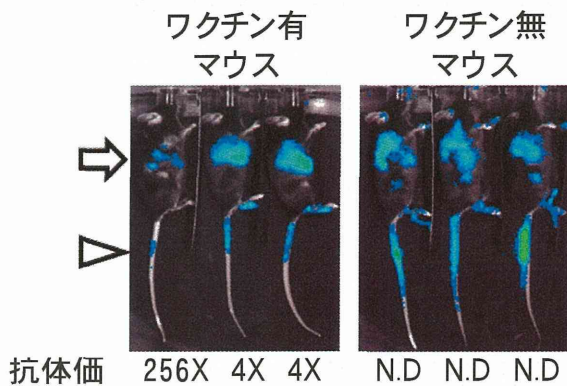


図6 抗ワクチン抗体存在下における血中を介したMDVVの腫瘍特異的伝播と増殖

抗体価はMDVV投与前に測定した値を示し、 \Rightarrow は腫瘍組織、 \triangleright は正常組織(投与部位)でのウイルス増殖を示す。N. D=検出限界以下

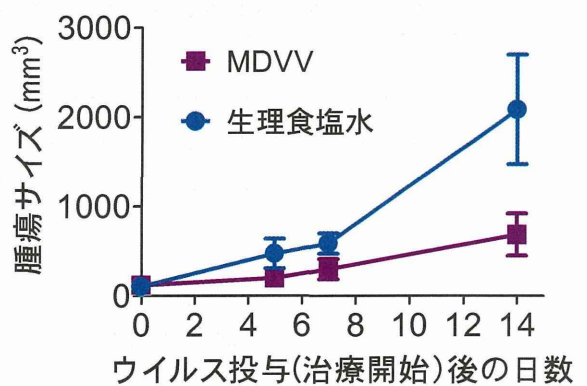


図7 MDVVの抗癌効果

MDVVの尾静脈内投与は、抗ウイルス抗体存在下でも、生理食塩水の尾静脈内投与と比べて、強力な腫瘍増殖抑制効果を示した。

G. 研究発表

1. 論文発表
1. Miyamoto S, Inoue H, Nakamura T, Yamada M, Sakamoto C, Urata Y, Okazaki T, Marumoto T, Takahashi A, Takayama K, Nakanishi Y, Shimizu H and Tani K. Coxsackievirus B3 Is an Oncolytic Virus with Immunostimulatory Properties that Is Active Against Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res.* 15: 2609-2621, 2012.
2. Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimaru K. The CD3 versus CD7 Plot in Multicolor Flow Cytometry Reflects Progression of Disease Stage in Patients Infected with HTLV-I. *PLoS One.* 2013;8(1):e53728.
3. Yamamoto S, Ebihara Y, Mochizuki S, Kawakita T, Kato S, Ooi J, Takahashi S, Tojo A, Yusa N, Furukawa Y, Oyaizu N, Watanabe J, Sato K, Kimura F, Tsuji K. Quantitative PCR detection of CEP110-FGFR1 fusion gene in a patient with 8p11 syndrome (letter to the editor). *Leuk Lymphoma.* 2013 Jan 18. [Epub ahead of print]
4. Mae H, Ooi J, Takahashi S, Kato S, Kawakita T, Ebihara Y, Tsuji K, Nagamura F, Echizen H, Tojo A. Acute kidney injury after myeloablative cord blood transplantation in adults: the efficacy of strict monitoring of vancomycin serum trough concentrations. *Transplant Infectious Disease.* 2012 Dec 20. [Epub ahead of print]
5. Morimoto A, Shimazaki C, Takahashi S, Yoshikawa K, Nishimura R, Wakita H, Kobayashi Y, Kanegane H, Tojo A, Imamura T, Imashuku S; Japan LCH Study Group. Therapeutic outcome of multifocal Langerhans cell histiocytosis in adults treated with the Special C regimen formulated by the Japan LCH Study Group. *Int J Hematol.* 97:103-8, 2013.
6. Ebihara Y, Takedani H, Ishige I, Nagamura-Inoue T, Wakitani S, Tojo A, Tsuji K. Feasibility of autologous bone marrow mesenchymal stem cells cultured with autologous serum for treatment of hemophilic arthropathy. *Hemophilia.* 19:e87-9, 2013.
7. Chi HT, Ly BT, Kano Y, Tojo A, Watanabe T, Sato Y. ETV6-NTRK3 as a therapeutic target of small molecule inhibitor PKC412. *Biochem Biophys Res Commun.* 429:87-92, 2012.
8. Yamamoto S, Ebihara Y, Mochiduki S, Tsuda M, Yuji K, Uchimaru, Tojo A, Tsuji K. Acute Lymphoblastic Leukemia with t(1;19)(q23;p13)/TCF3 -PBX1 Fusion in an Adult Male with Down Syndrome. *Acta Haematol.* 128:242-243, 2012.
9. Oshima Y, Yuji K, Tojo A. Eltrombopag in refractory aplastic anemia. *New Engl J Med.* 367:1162-3, 2012.
10. Oshima Y, Tsukamoto H, Tojo A. Association of hepatitis B with antirheumatic drugs: a case-control study. *Mod Rheumatol.* 2012 Jul 18. [Epub ahead of print]
11. Agata H, Yamazaki M, Uehara M, Hori A, Sumita Y, Tojo A, Kagami H. Characteristic differences among osteogenic cell populations of rat bone marrow stromal cells isolated from untreated, hemolyzed, or Ficoll-treated marrow. *Cytotherapy.* 14:791-801, 2012.
12. Hinohara K, Kobayashi S, Kanauchi H, Simizu S, Nishioka K, Tsuji E, Tada K, Umezawa K, Mori M, Ogawa T, Inoue J, Tojo A, Gotoh N. ErbB/NF-κB signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109:6584-9, 2012.
13. Usuki K, Tojo A, Maeda Y, Kobayashi Y, Matsuda A, Ohyashiki K, Nakaseko C, Kawaguchi T, Tanaka H, Miyamura K, Miyazaki Y, Okamoto S, Oritani K, Okada M, Usui N, Nagai T, Amagasaki T, Wanajo A, Naoe T. Efficacy and safety of nilotinib in Japanese patients with imatinib-resistant

- or -intolerant Ph+ CML or relapsed/refractory Ph+ ALL: a 36-month analysis of a phase I and II study. *Int J Hematol.* 95:409-19, 2012.
14. Kawamata T, Jun L, Sato T, Tanaka M, Nagaoka H, Agata Y, Toyoshima T, Yokoyama K, Oyaizu N, Nakamura N, Ando K, Tojo A, Kotani A. Imatinib mesylate directly impairs class switch recombination through downregulation of AID. *Blood.* 119:3123-7, 2012.
 15. Dong Y, Kobayashi S, Tian Y, Ozawa M, Hiramoto T, Izawa K, Bai Y, Soda Y, Sasaki E, Itoh T, Maru Y, Takahashi S, Uchamaru K, Oyaizu N, Tojo A, Kai C, Tani K. Leukemogenic fusion gene (p190 BCR-ABL) transduction into hematopoietic stem/progenitor cells in the common marmoset. *Open J Blood Dis.* 2:1-10, 2012.
 16. Kawamata T, Tojo A. Helicobacter pylori-induced thrombocytosis clinically indistinguishable from essential thrombocythemia. *Leuk. Lymphoma.* 53: 1423-4, 2012.
 17. Ebihara Y, Takahashi S, Mochizuki S, Kato S, Kawakita T, Ooi J, Yokoyama K, Nagamura F, Tojo A, Asano S, Tsuji K. Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning regimen in adolescent patients with hematologic malignancies: a single institute analysis. *Leuk Res.* 6:128-31, 2012.
 18. 中村貴史. miRNA 制御ウイルスによるがん細胞特異的治療法の開発. 遺伝子医学, M00K23 号, 176-181, 2012.
2. 学会発表
(海外)
1. Mina Hikichi and Takafumi Nakamura. Systemic cancer virotherapy with MDVV, a combined miRNA-regulated and thymidine kinase-deleted oncolytic vaccinia virus : The 15th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy, Philadelphia, USA, 2011/5/17.
 2. 臼杵憲祐、東條有伸、他. 「Sustained molecular response with maintenance dose of interferon alfa after imatinib discontinuation in patients with chronic myeloid leukemia」第 54 回米国血液学会学術集会, 2012/12/08.
 3. 幸谷 愛、東條有伸、他. 「Mir-126 and Mir-195-mediated control of B cell fate in leukemic and normal cells as a potential alternative for transcriptional factor」第 54 回米国血液学会学術集会, 2012/12/10.
 4. 湯地晃一郎、東條有伸、他. 「Possible association between acute myelogenous leukemia and thrombopoietin receptor agonist in immune thrombocytopenia patients: a preliminary signal report」第 54 回米国血液学会学術集会, 2012/12/10.
- (国内)
1. Mina Hikichi, Minoru Kidokoro, Hisatoshi Shida, Hideaki Tahara and Takafumi Nakamura. SYSTEMIC ONCOLYTIC VIROTHERAPY WITH TUMOR-SPECIFIC REPLICATING VACINIA VIRUSES: The 18th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 熊本, 2012/6/29.
 2. 中村貴史. 「マイクロ RNA によって制御されるウイルスベクターの開発」第 14 回日本 RNA 学会年会, 仙台, 2012/7/18.
 3. Takafumi Nakamura. Systemic cancer therapy with MDVV, a combined miRNA-regulated and thymidine kinase-deleted oncolytic vaccinia virus: 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012/9/19.
 4. Takafumi Nakamura. MicroRNA regulation of viral replication for oncolytic virotherapy: The 2nd Meeting on RNA and Biofunctions-ASIA Study “RNA Biofunctions and Viruses”, 福岡, 2013/1/9.
 5. 小林誠一郎、東條有伸、他. 「CD7 vs CADM1 in FACS reflects multi-step oncogenesis of ATL and discriminates HTLV-1 infected cells」第74回日本血液学会学術集会, 2012/10/19.

6. 塚田端夫、東條有伸、他。「リウマチ性多発筋肉痛症を合併したt(1;7)を伴う骨髄異形成症候群の一例」第74回日本血液学会学術集会, 2012/10/19.
7. 何 海萍、東條有伸、他。
「Characterization of stem cell in human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells」第74回日本血液学会学術集会, 2012/10/19.
8. Chanda Bidisha、東條有伸、他。
「Impairment of T cell development in chronic myeloid leukemia, partial explanation by in vitro model」第74回日本血液学会学術集会, 2012/10/20.
9. 大野伸広、東條有伸、他。「CD3とCD7の展開によるATL細胞の同定：急性型ATLの治療反応性とTCRレパトア解析」第74回日本血液学会学術集会, 2012/10/20.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

造血器腫瘍に対する純和製抗癌ウイルスの抗腫瘍効果と
安全性の評価に関する研究

研究分担者 東條 有伸 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

感染した癌細胞内で増殖しながら死滅させるというウイルス本来の性質（腫瘍溶解性）を利用する癌ウイルス療法は、従来の化学療法や放射線療法と比較して、様々なメカニズムによって腫瘍を攻撃できる利点がある。本研究では、純国産ワクシニアウイルスワクチン株の安全性に注目し、遺伝子組換え技術により改良を加え、造血器腫瘍を対象とした“純和製抗癌ウイルス製剤”として活用する。

A. 研究目的

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癌ウイルス療法に関する前臨床研究、及び臨床試験が積極的に行われている。これは、ウイルスが本来持っている癌細胞に感染後、癌組織内で増殖しながら死滅させるという性質を利用する方法である。本研究の目的は、純国産ワクシニアウイルスワクチン株の安全性に注目し、遺伝子組換え技術により改良を加え、“純和製抗癌ウイルス製剤”として活用することにある。

B. 研究方法

天然痘予防ウイルスとして開発され、弱毒化された純国産ワクシニアウイルスワクチン株 LC16m8 は、表面膜蛋白質をコードする B5R 遺伝子のフレームシフト変異により、増殖伝播能力が著しく低下している。従って、腫瘍細胞では B5R を発現するが、正常細胞では B5R を発現しないように LC16m8 を改良すれば、強力な腫瘍溶解性と高い安全性を兼ね備えたウイルス療法に使用できる。真核細胞に遍在する 20-25 塩基長の短い miRNA は、特定の遺伝子のメッセンジャー

RNA の 3' 非翻訳領域に存在する標的配列に結合し、その発現を抑制する。腫瘍細胞は正常細胞と異なる miRNA 発現様式を示すため、正常細胞で発現が高く腫瘍細胞で著減している miRNA の標的配列をワクシニアウイルスの B5R 遺伝子下流に挿入すれば、腫瘍細胞選択的に B5R が発現してウイルスによる細胞溶解を起こすことが可能と考えられる。miRNA 制御性ワクシニアウイルスは、破壊したいがん細胞の miRNA 発現プロフィールに応じて自由に塩基配列を交換できるため、極めて合理的に設計できる汎用性を有する。

本研究では、miRNA の発現レベルを定量 RT-PCR 法を用いて測定し、正常細胞において高発現し造血器腫瘍細胞において著減している miRNA のスクリーニングを行った。また、miRNA の標的配列を遺伝子の 3' UTR に組み込み、その miRNA 細胞を高発現する細胞では内在性 miRNA より遺伝子発現が抑制されることをルシフェラーゼアッセイを用いて確認した。また miRNA 制御性ワクシニアウイルスを各造血器腫瘍由来細胞株（慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、

急性リンパ性白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫)に感染させ、最適な対象疾患のスクリーニングを行った。

(倫理面への配慮)

本研究を実施するにあたり、DNA 組換え実験は、東京大学医科学研究所遺伝子組換え生物等安全委員会承認されている。その中の自立的な増殖力、感染力を保持した組換えワクシニアウイルスの作成・使用に関しては、文部科学省の第二種使用等拡散防止措置指針に従い、大臣確認実験承認を得ている。

C. 研究結果

本研究の基礎実験として、慢性骨髄性白血病などの造血器腫瘍で発現が低いとされる miR-203, miR-10a, miR-150, miR-199a が正常細胞で高発現しているかを確認した。健常の BALB/c マウスの脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、胃、小腸、腎臓、卵巣、骨髄単核球、尾から組織を採取し、定量 RT-PCR 法にて各 miRNA の発現を測定した。なおこれらの miRNA はヒトとマウスで配列が完全一致であるため、生物種の違いが問題にならない。図 1A に示すとおり、これらの miRNA はほぼ全ての臓器で骨髄単核球細胞よりも高発現していた。また、ヒトの臍帯血由来正常造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) と慢性骨髄性白血病患者の CD34 陽性細胞とで比較すると、CML 患者細胞で miRNA の発現がより低下していた (図 1B)。

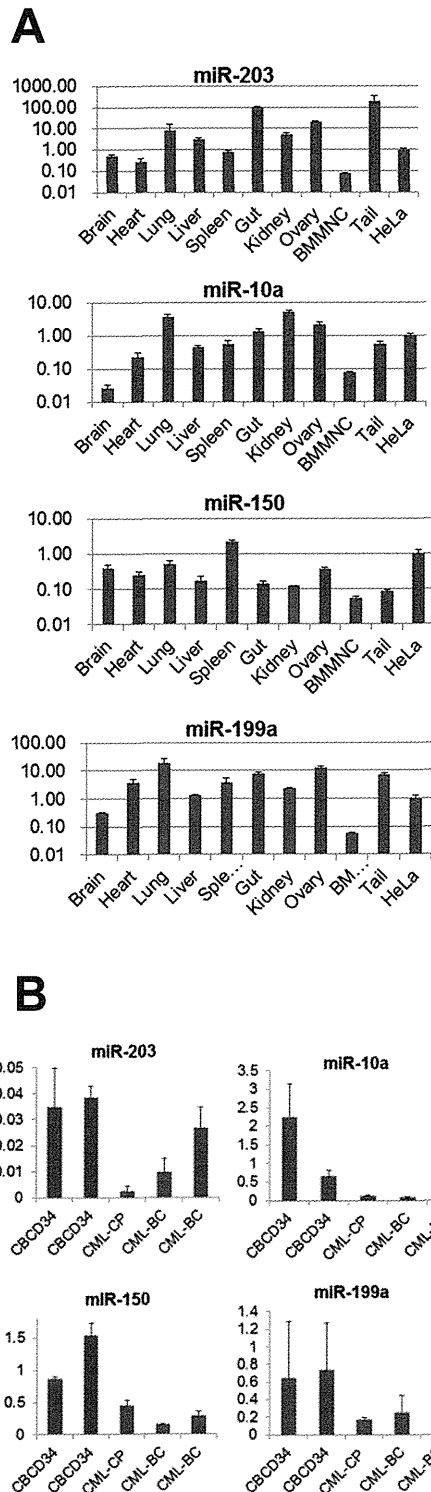


図 1. miRNA の定量 RT-PCR.
(A) BALB/c マウスの各組織における発現. (B) 正常臍帯血由来造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) および CML 患者 CD34 陽性細胞における発現。

次に、これらの miRNA 標的配列を遺伝子下流に挿入することで遺伝子抑制効果が得られるかをレポーターアッセイで確認した。まず、図 2A のようにルシフェラーゼ遺伝子の 3' 非翻訳領域に各、miRNA 標的配列を様々な組み合わせで挿入したプラスミドベクターを作製し、miRNA 高発現のコントロール細胞株 (HeLa 細胞) と miRNA 低発現の慢性骨髄性白血病細胞株 (K562 細胞) にトランスフェクションし、24 時間後にルシフェラーゼの発現量を測定した。

図 2B に示すように、各 miRNA を高発現する HeLa 細胞では miR-199a を除く全ての miRNA の組み合わせで遺伝子発現の低下がみられた。特に miR-10a の標的配列を挿入した場合、ルシフェラーゼ発現レベルは 10% 以下まで抑制された。一方、各 miRNA の発現レベルが低い K562 細胞では HeLa 細胞と比べ抑制が軽度であり最大でも 50% 程度であった。また、これらの miRNA は慢性骨髄性白血病のみならず、造血器腫瘍全般に発現が著減していることが分かった (図 3)。つまり、miR-203, miR-10a, miR-150 の標的配列をワクシニアウイルスの B5R 遺伝子下流に挿入すれば、造血器腫瘍に対しては腫瘍溶解作用を保ちつつ正常臓器ではウイルス増殖が抑えられる可能性が唆された。

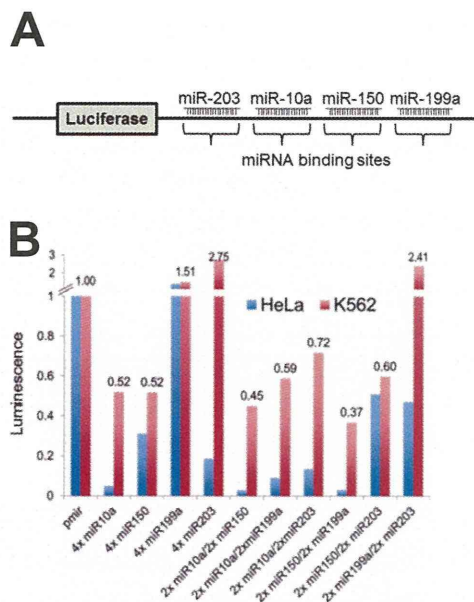


図 2 (A) miRNA 標的配列による遺伝子制御。 (B) トランスフェクション 24 時間後のルシフェラーゼ活性。miRNA 標的配列を挿入していないコントロールベクター (pmirGLO vector) での活性を 1 とした。

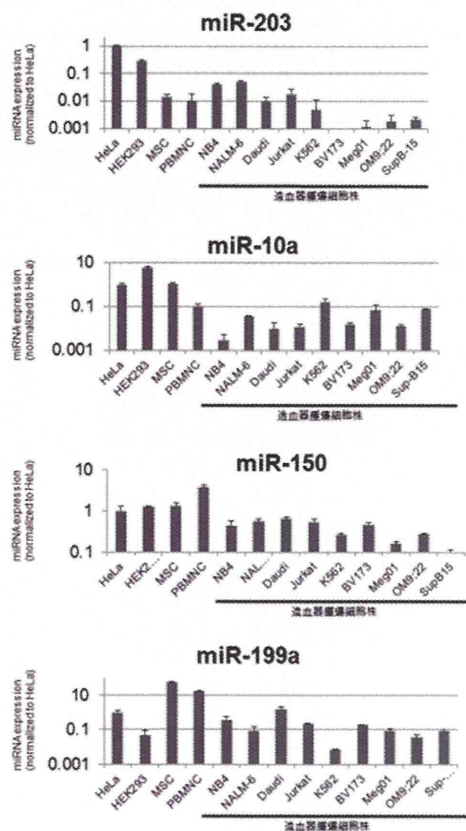


図 3. 造血器腫瘍患者由来各細胞株における miRNA の発現。HeLa 細胞での発現レベルを 1 とした。

miR-203, miR-10a, miR-150 の発現低下は造血器腫瘍全体に共通してみられる変化であったことから、これらの miRNA は造血器腫瘍疾患へ幅広く応用可能であると考えられた。そこで、造血器腫瘍の中でも特にワクシニアウイルスへの感受性が高い疾患を特定し、その治療効果を、高めるため、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫および成人 T 細胞白血病由来細胞株にワクシニアウイルス (miRNA 制御性 TK 欠失株 ; MDVV) を感染させ、感染効率をフローサイトメトリーで測定した (図4)。その結果、多発性骨髄腫由来細胞株で最も感受性が高く、次いで成人 T 細胞白血病がやや高い感受性を示した。

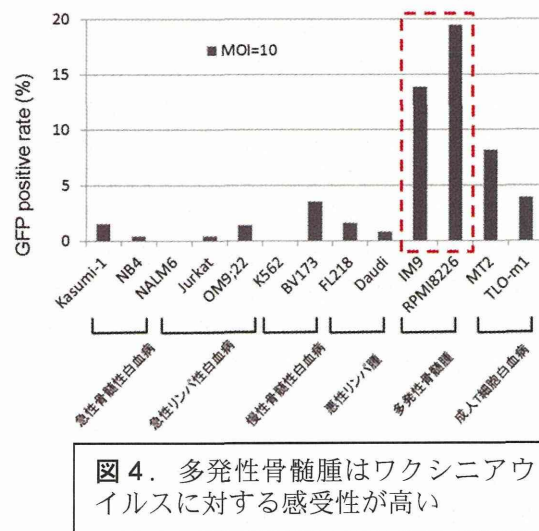


図4. 多発性骨髄腫はワクシニアウイルスに対する感受性が高い

E. 結論

以上より、miR-203, miR-10a, miR-150, を用いた B5R 遺伝子の制御により安全性をより高めた腫瘍溶解ウイルスを作製できることが示唆された。また上記 miRNA は様々な造血器腫瘍において共通して発現が著減しており、慢性骨髄性白血病に限らず多くの造血器腫瘍の治療に応用できると考えられた。また造血器腫瘍の中でも多発性骨髄腫はワクシニアウイルス感染への感受性が非常に高いため、本療法において最良の治療ターゲットとなることが期待される。今後は多発性骨髄腫の動物モデルを用いた治療実験により効果の検証を行っていく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimaru K. The CD3 versus CD7 Plot in Multicolor Flow Cytometry Reflects Progression of Disease Stage in Patients Infected with HTLV-I. *PLoS One*. 2013;8(1):e53728. doi: 10.1371/jour
2. Yamamoto S, Ebihara Y, Mochizuki S, Kawakita T, Kato S, Ooi J, Takahashi S, Tojo A, Yusa N, Furukawa Y, Oyaizu N, Watanabe J, Sato K, Kimura F, Tsuji K. Quantitative PCR detection of CEP110-FGFR1 fusion gene in a patient with 8p11 syndrome (letter to the editor). *Leuk Lymphoma*. 2013 Jan 18. [Epub ahead of print]
3. Mae H, Ooi J, Takahashi S, Kato S, Kawakita T, Ebihara Y, Tsuji K, Nagamura F, Echizen H, Tojo A. Acute kidney injury after myeloablative cord blood transplantation in adults: the efficacy of strict monitoring of vancomycin serum trough concentrations. *Transplant Infectious Disease*. 2012 Dec 20. doi: 10.1111/tid.12038. [Epub ahead of print]
4. Morimoto A, Shimazaki C, Takahashi S, Yoshikawa K, Nishimura R, Wakita H, Kobayashi Y, Kanegane H, Tojo A, Imamura T, Imashuku S; Japan LCH Study Group. Therapeutic outcome of multifocal Langerhans cell histiocytosis in adults treated with the Special C regimen formulated by the Japan LCH Study Group. *Int J Hematol*. 97:103-8, 2013
5. Ebihara Y, Takedani H, Ishige I, Nagamura-Inoue T, Wakitani S, Tojo A, Tsuji K. Feasibility of autologous bone marrow mesenchymal stem cells cultured with autologous serum for treatment of hemophilic arthropathy. *Hemophilia*. 19:e87-9, 2013
6. Chi HT, Ly BT, Kano Y, Tojo A, Watanabe T, Sato Y. ETV6-NTRK3 as a therapeutic target of small molecule inhibitor PKC412. *Biochem Biophys Res Commun*. 429:87-92, 2012
7. Yamamoto S, Ebihara Y, Mochizuki S, Tsuda M, Yuji K, Uchimaru, Tojo A, Tsuji K. Acute Lymphoblastic Leukemia with t(1;19)(q23;p13)/TCF3 -PBX1 Fusion in an Adult Male with Down Syndrome. *Acta Haematol*. 128:242-243, 2012
8. Oshima Y, Yuji K, Tojo A. Eltrombopag in refractory aplastic anemia. *New Engl J Med*. 367:1162-3, 2012
9. Oshima Y, Tsukamoto H, Tojo A. Association of hepatitis B with antirheumatic drugs: a case-control study. *Mod Rheumatol*. 2012 Jul 18. [Epub ahead of print] PMID: 22802011
10. Agata H, Yamazaki M, Uehara M, Hori A, Sumita Y, Tojo A, Kagami H. Characteristic differences among osteogenic cell populations of rat bone marrow stromal cells isolated from untreated, hemolyzed, or Ficoll-treated marrow. *Cytotherapy*. 14:791-801, 2012
11. Hinohara K, Kobayashi S, Kanauchi H,

- Simizu S, Nishioka K, Tsuji E, Tada K, Umezawa K, Mori M, Ogawa T, Inoue J, Tojo A, Gotoh N. ErbB/NF- κ B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. Proc Natl Acad Sci USA. 109:6584-9, 2012
12. Usuki K, Tojo A, Maeda Y, Kobayashi Y, Matsuda A, Ohyashiki K, Nakaseko C, Kawaguchi T, Tanaka H, Miyamura K, Miyazaki Y, Okamoto S, Oritani K, Okada M, Usui N, Nagai T, Amagasaki T, Wanajo A, Naoe T. Efficacy and safety of nilotinib in Japanese patients with imatinib-resistant or -intolerant Ph⁺ CML or relapsed/refractory Ph⁺ ALL: a 36-month analysis of a phase I and II study. Int J Hematol. 95:409-19, 2012
 13. Kawamata T, Jun L, Sato T, Tanaka M, Nagaoka H, Agata Y, Toyoshima T, Yokoyama K, Oyaizu N, Nakamura N, Ando K, Tojo A, Kotani A. Imatinib mesylate directly impairs class switch recombination through downregulation of AID. Blood. 119:3123-7, 2012
 14. Dong Y, Kobayashi S, Tian Y, Ozawa M, Hiramoto T, Izawa K, Bai Y, Soda Y, Sasaki E, Itoh T, Maru Y, Takahashi S, Uchimarui K, Oyaizu N, Tojo A, Kai C, Tani K. Leukemogenic fusion gene (p190 BCR-ABL) transduction into hematopoietic stem/progenitor cells in the common marmoset. Open J Blood Dis. 2:1-10, 2012
 15. Kawamata T, Tojo A. Helicobacter pylori-induced thrombocytosis clinically indistinguishable from essential thrombocythemia. Leuk. Lymphoma. 53: 1423-4, 2012
 16. Ebihara Y, Takahashi S, Mochizuki S, Kato S, Kawakita T, Ooi J, Yokoyama K, Nagamura F, Tojo A, Asano S, Tsuji K. Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning regimen in adolescent patients with hematologic malignancies: a single institute analysis. Leuk Res. 6:128-31, 2012
2. 学会発表
(国内)
 1. 小林誠一郎、東條有伸、他。「CD7 vs CADM1 in FACS reflects multi-step oncogenesis of ATL and discriminates HTLV-1 infected cells」第74回日本血液学会学術集会, 2012/10/19.
 2. 塚田端夫、東條有伸、他。「リウマチ性多発筋肉痛症を合併した t(1;7)を伴う骨髄異形成症候群の一例」第74回日本血液学会学術集会, 2012/10/19.
 3. 何海萍、東條有伸、他。「Characterization of stem cell in human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells」第74回日本血液学会学術集会, 2012/10/19.
 4. Chanda Bidisha、東條有伸、他。「Impairment of T cell development in chronic myeloid leukemia, partial explanation by in vitro model」第74回日本血液学会学術集会, 2012/10/20.
 5. 大野伸広、東條有伸、他。「CD3 と CD7 の展開による ATL 細胞の同定: 急性型 ATL の治療反応性と TCR レパトア解析」

第 74 回日本血液学会学術集会,
2012/10/20.

(海外)

1. 白杵憲祐、東條有伸、他。「Sustained molecular response with maintenance dose of interferon alfa after imatinib discontinuation in patients with chronic myeloid leukemia」第 54 回米国血液学会学術集会, 2012/12/08.
2. 幸谷 愛、東條有伸、他。「Mir-126 and Mir-195-mediated control of B cell fate in leukemic and normal cells as a potential alternative for transcriptional factor」第 54 回米国血液学会学術集会, 2012/12/10.
3. 湯地晃一郎、東條有伸、他。「Possible association between acute myelogenous leukemia and thrombopoietin receptor agonist in immune thrombocytopenia patients: a preliminary signal report」第 54 回米国血液学会学術集会, 2012/12/10.

3. その他、専門医、一般医等医療従事者への情報提供（シンポジウムの開催、講演等での発表）

2012/01/28（土）第14回下総血液研究会・特別講演 東條有伸 「CML分子標的治療のバイオマーカー」

2012/05/15（火）川崎市医師会主催講演会 東條有伸 「血液疾患を疑う症状と所見の見方～専門医との連携について」

2012/06/08（金）第9回山梨臨床血液カンファレンス・特別講演 東條有伸 「CML治療の今後を考える」

2012/11/09（金）東葛・湾岸エリア下総血液ミーティング・特別講演 東條有伸 「CML治療の今後を考える」

2012/11/30（金）盛岡CMLカンファレンス 東條有伸 「ダサチニブによって誘起されるT-LGL/NK細胞の増加について」

4. 患者、家族、患者会や一般市民への情報提供（シンポジウムの開催、講演等での発表、マスコミでの発表など）

2012/09/01（土）再生つばさの会 札幌医療講演会 東條有伸 「骨髄異形成症候群の病態と治療」

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
中村貴史	miRNA制御ウイルスによるがん細胞特異的治療法の開発	落谷孝広 黒田雅彦 尾崎充彦	遺伝子医学 MOOK23号 臨床・創薬利用が見えてきたmicroRNA	株式会社 メディカル ルドウ	大阪市	2012年	176-181

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当なし					

10. miRNA 制御ウイルスによるがん細胞特異的治療法の開発

中村貴史

現在世界中において、生きたウイルスを利用してがんを治療するウイルス療法 (oncolytic virotherapy) に関する前臨床研究および臨床試験が積極的に行われている。これは、ウイルスが本来もっているがん細胞に感染後、がん組織内で増殖しながら死滅させるという性質 (腫瘍溶解性) を利用する方法であり、最大のキーポイントは正常組織に対するウイルス病原性をいかに排除するかという点にある。本稿では、がんにおける microRNA (miRNA) の特性と、その遺伝子発現調節機構を利用することによって、がん細胞特異的に増殖し正常細胞では増殖しない miRNA 制御ウイルスの開発について紹介する。

はじめに

がんウイルス療法は、1900年代の初めより始まり、実は日本でもムンプスウイルスなどを使って試みられていた¹⁾。しかし、その当時は正常細胞でも増殖能を保持した、つまり野生型に近いウイルスを投与していたので、安全性の観点よりなかなか新しい治療法としては定着するには難しかったのかもしれない。最近、遺伝子工学技術、ウイルスおよびがんの分子病態解析の発展により、ウイルスが元来もっている正常組織に対する病原性を排除し、ウイルスをがん細胞だけで増殖させることによって、がんを標的化することが可能になってきた。アデノウイルスやヘルペスウイルスは本来人間に対して病原性を有するが、その病原性を抑え、がん細胞で選択的に複製するための変異が加えられている²⁾。一方、本来人間に対して病原性をもたないニューカッスル病ウイルスやレオウイルスは、遺伝子操作を行わなくてもヒトがん

細胞に対して腫瘍溶解性を発揮する³⁾。われわれが注目している麻疹ウイルスやワクシニアウイルス⁴⁾⁵⁾はこの中間に位置づけられ、本来は麻疹や痘瘡のワクチンとして利用するため弱毒化されたウイルスである⁴⁾⁵⁾。

ウイルスを腫瘍選択的に増殖させ溶解させるための制御法には、①ウイルスが細胞に感染する際、がん細胞特異的に感染するように制御する方法と、②ウイルスが細胞に感染した後、がん細胞特異的に増殖するように制御する方法の2つに大別できる。前者の一例として、われわれは麻疹ウイルスと宿主細胞レセプターの相互作用を解明し、その感染制御を利用してがん細胞特異的に感染する麻疹ウイルスの開発に成功し、その効果と安全性をマウスモデルにおいて実証してきた⁶⁾⁸⁾。一方、後者に関しては、がんにおける microRNA (miRNA) の特性を利用して、がん細胞特異的に増殖し破壊するワクシニアウイルスの開発に成功したので、本稿にて詳しく解説させていただくことにする⁹⁾。

key words

がんウイルス療法, 腫瘍溶解性, miRNA, ワクシニアウイルス, B5R, 遺伝子組換え, がん特異的, let-7a, 相同組換え法, 遺伝子発現調節

I. miRNA

miRNA 遺伝子は、ゲノム上に少なくとも数百存在し、まず数百から数千ヌクレオチドの長さの初期 miRNA が転写され、次にマイクロプロセッサーと呼ばれるタンパク質複合体によって消化され、約 60~70 ヌクレオチドのヘアピン型前駆体 miRNA となる。その後、エクスポートン5 (Exportin 5) を介して核から細胞質内に移り、ダイサー (Dicer) と呼ばれるリボヌクレアーゼIIIによってさらに消化され、19~24 ヌクレオチドの成熟した miRNA 二量体となる。そして、成熟した miRNA 二量体は、アルゴノート (Argonaute) タンパク質などととも複合体 (RISC: RNA-induced silencing complex) を形成し機能する。その複合体は、標的メッセンジャー RNA の3'非翻訳領域 (UTR) 内にある部分相補的な配列に結合し、その翻訳抑制や分解作用によって、標的遺伝子発現を負に制御する¹⁰⁾。miRNAによる制御は多くの生命現象に関与しており、この発現異常が疾患と深く関わっている。これより、この異常を補正する治療戦略が提案されている。一方われわれは、miRNAを直接作用させるのではなく、その特性を利用したがんウ

イルス療法を提案している。

II. ワクシニアウイルス

われわれが注目しているワクシニアウイルスは、4半世紀前の日本国内で痘瘡ワクチンとしてヒトに投与され、重篤な副作用がなく安全に使われていたワクチン株 (LC16m8) である。この株では、ワクシニアウイルスの伝播増殖に重要な役割を果たすウイルス膜タンパクをコードする B5R 遺伝子にフレームシフト変異がみられ、このタンパクが機能しなくなるため正常細胞での増殖性が著しく減弱している。そこで、B5Rの変異が腫瘍細胞での増殖にどう影響するかを明らかにするため、B5Rが正常に発現・機能する LC16mO 株 (LC16m8 株を分離する過程の株であり、性質としては親株である Lister 株と類似)、LC16m8 Δ (B5R 遺伝子の全長を完全に欠失させた遺伝子組換え¹¹⁾ウイルスであり、性質としては LC16m8 と類似)、および正常な B5R 遺伝子を再挿入した遺伝子組換えウイルス LC16m8 Δ -B5R の腫瘍溶解性を、7種類の様々なヒトがん細胞株と比較検討した (図1)。その結果、B5Rを発現する LC16mO 株はすべてのがん細胞に対して高い腫瘍溶解性を示したが、

図1 ワクシニアウイルス膜タンパク B5R と腫瘍溶解性

