

B5Rを発現しないLC16m8Δはその腫瘍溶解性が低下した。このLC16m8Δゲノムに再びB5Rを挿入し発現させた遺伝子組換えウイルス(LC16m8Δ-B5R)では、LC16mO株と同等の腫瘍溶解性を示したことから、B5Rはウイルスの弱毒化だけではなく、腫瘍溶解性とも深く関与していることが明らかとなった。

Ⅲ. miRNA制御ワクシニアウイルス

1. miRNA制御ワクシニアウイルスの構築

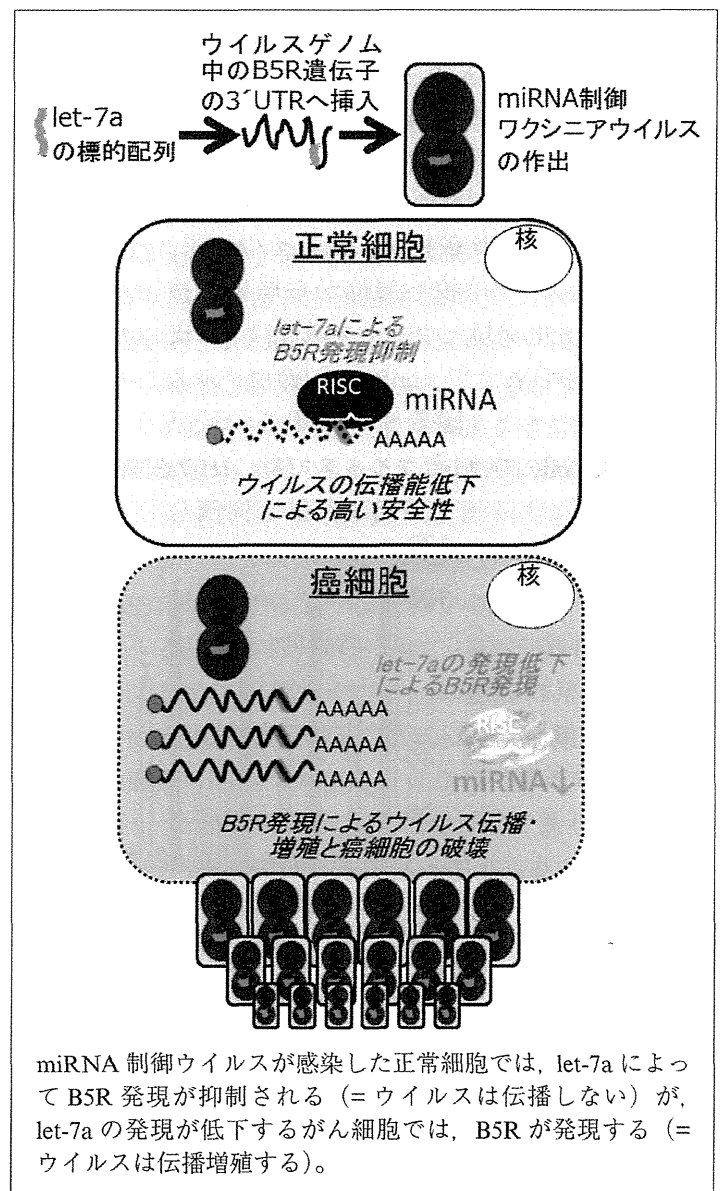
以上の結果より、がん細胞ではB5Rを発現するが、正常細胞ではB5Rを発現しないようにLC16m8Δ-B5Rを改良できれば、高い腫瘍溶解性による抗腫瘍効果と高い安全性を兼ね備えたがんウイルス療法になりうるという着想に至った。ワクシニアウイルスは、アデノウイルスやヘルペスウイルスなど他のDNAウイルスとは異なり、宿主細胞の細胞質でのみ複製・増殖するウイルスである。このため、ウイルスゲノム中にがん特異的プロモーターを挿入することによって、ウイルス遺伝子発現を制御するアプローチが適用できない。そこでわれわれは、miRNAによるB5Rの発現制御を試みるため、正常細胞に比べ肺がんや膵臓がんなどの様々ながん細胞で発現が低下し、この異常ががんの発生や進展と深く関わっていることが報告されているmiRNAの1つであるlet-7に注目した。相同組換え法¹⁾を用いて、LC16m8Δ-B5RゲノムのB5R遺伝子の3'UTRにlet-7aの標的配列(22塩基)を4回繰り返して挿入した遺伝子組換えmiRNA制御ワクシニアウイルスを作製した(図2)。

2. miRNA制御ワクシニアウイルスの伝播増殖性

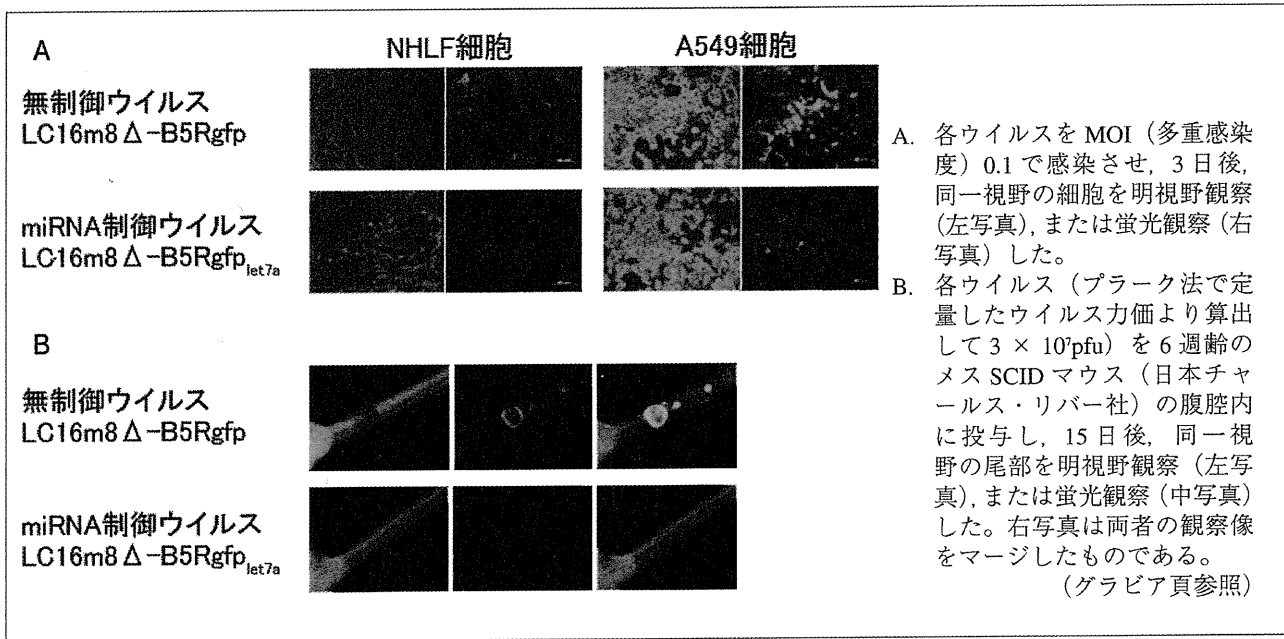
最初にB5Rの発現とウイルスの伝播増殖性の関係を明らかにするため、B5RのC末端側にGFP(緑色蛍光タンパク)タグをつけたmiRNA制御ワクシニアウイルス(LC16m8Δ-B5Rgfp^{let7a})を作製し、感染細

胞内のB5R発現を蛍光顕微鏡下で観察しながら、その伝播増殖性を検討した。その結果、let-7a高発現NHLF(正常ヒト肺線維芽)細胞ではウイルスのB5R発現が低下したが、let-7a低発現A549(ヒト肺がん)細胞ではB5Rの高発現が確認された。同様にNHLF細胞では、ウイルスの増殖による細胞の変化(細胞変性効果)もA549細胞に比べほとんどみられなかった。一方、B5Rを恒常的に発現する無制御ウイルス(LC16m8Δ-B5Rgfp)は、どちらの細胞においてもB5Rを高発現し、広範な細胞変性効果がみられた(図3A)。

図2 がんにおけるmiRNAの特性を利用したがん特異的ウイルス療法開発の新戦略



図③ ワクシニアウイルス膜タンパク B5R の miRNA 制御と伝播増殖性



次に各ウイルスをマウスの腹腔内に投与し、let-7a が高発現している正常組織でのウイルス伝播増殖性を比較検討した。その結果、無制御ウイルスでは投与部位から尾に伝播し、そこで B5R 発現とウイルス増殖による皮膚傷害が観察されたが、miRNA 制御ウイルスは伝播しなかった (図③ B)。これらの結果より、この miRNA 制御ウイルスでは、let-7a の制御機構による遺伝子発現調節と同調して、正常細胞における B5R 発現は抑制されるが、がん細胞では let-7a が低下しているので B5R 発現は抑制されず、がん特異的に伝播増殖することが示された。

3. miRNA 制御ワクシニアウイルスの抗がん効果と安全性

miRNA 制御ワクシニアウイルスの抗がん効果と伝播増殖性を明らかにするため、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現する miRNA 制御ワクシニアウイルス (▲: LC16m8Δ-B5R_{let7a}/LG) を作製し、ヒト膀胱がん細胞 BxPC3 の皮下腫瘍マウスモデルにおいて、マウス体内のウイルス分布を非侵襲的に観察しながら、その抗がん効果を検討した。miRNA 制御ウイルスは、B5R を恒常的に発現する無

図④ 担がんマウスモデルにおける miRNA 制御ワクシニアウイルスの抗がん効果と安全性

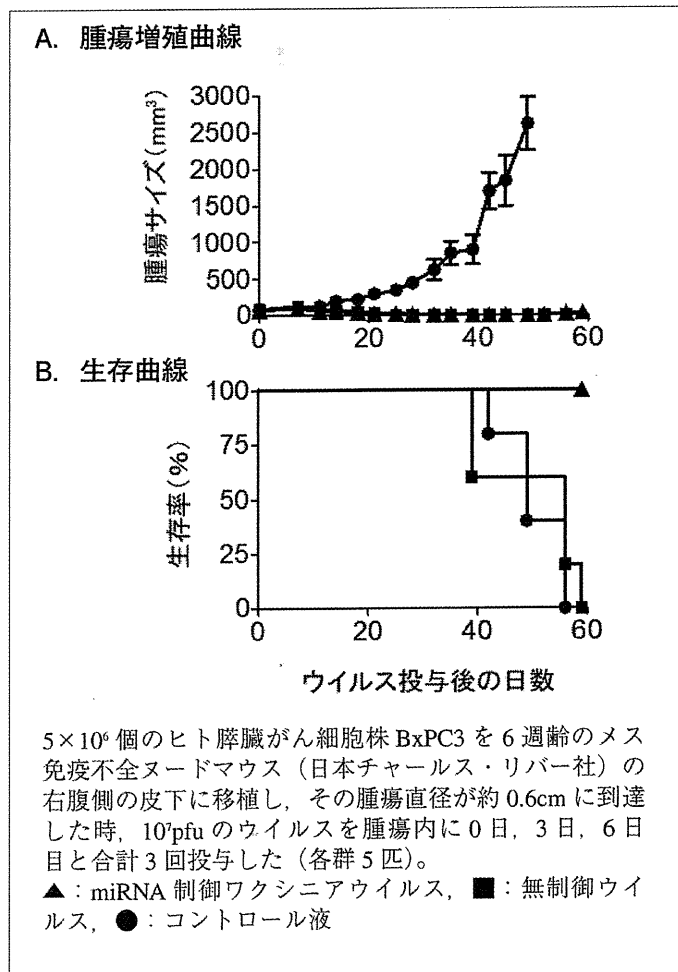
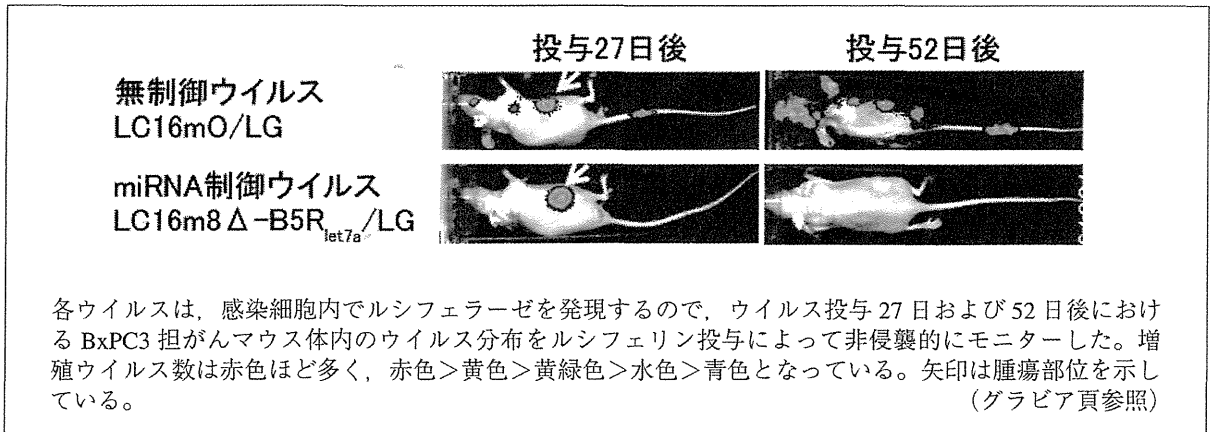


図5 担がんマウスモデルにおける miRNA 制御ワクシニアウイルスの腫瘍特異的増殖性



制御ウイルス (■: LC16mO/LG) と同等に、強力な抗がん作用を示した。(図4A)。しかしながら、無制御ウイルスを投与したマウスでは、治療 60 日後までにウイルス毒性による急激な体重減少によってすべてのマウスが死亡した。ウイルスを含まないコントロール液 (●) を投与したマウスでは、治療効果がなく腫瘍増大によってすべてのマウスが死亡した。一方、それらに対し miRNA 制御ウイルスは、治療 60 日後で 5 匹中 4 匹のマウスにおいて完全な腫瘍の消失が観察され、すべてのマウスが生存していた (図4B)。

次に、この BxPC3 担がんマウスにおいて 27 日および 52 日後にルシフェリン (VivoGlo™ Luciferin, In Vivo Grade · Promega 社) を腹腔内投与し、IVIS イメージングシステム (Xenogen 社) によってウイルス分布を非侵襲的にモニターした。無制御ウイルスを投与したマウスでは、27 日後に全身の正常組織でウイルス増殖がみられ、52 日後と時間経過に従ってウイルス増殖は増加し、それに伴う急激な体重減少によって死亡した。それに対し miRNA 制御ウイルスを投与したマウスでは、27 日後のウイルス増殖は移植したがん細胞のみに局限し、完全に腫瘍が消失したマウスを含め正常組織におけるウイルス増殖はみられなかった。さらに、52 日後の腫瘍が消失したマウスにおいて、ウイルスは完全に消失していた (図5)。

おわりに

以上の結果より、miRNA 制御ワクシニアウイル

スは、がん細胞では B5R を発現するが、正常細胞では B5R を発現しないため、強力な腫瘍溶解性による抗腫瘍効果と高い安全性を兼ね備えたウイルスであることが実証された。さらに miRNA 制御ワクシニアウイルスは、担がんマウスにおいて血中を介して効率よく腫瘍に到達し腫瘍のみを破壊することも確認しており、転移した全身のがんを標的化できる可能性をもっていることが示唆された。

miRNA によるウイルスの制御は、その miRNA の標的配列を DNA または RNA ウイルスゲノムに挿入することによって、ワクシニア以外にも他の様々なウイルスでも報告されている。アデノウイルス¹⁰⁾¹²⁾ やヘルペスウイルス¹³⁾¹⁴⁾ などの DNA ウイルスは、miR-122, miR-124, miR-143, miR-145, miR-199 や let-7 によって、コクサッキーウイルス¹⁵⁾、水疱性口内炎ウイルス¹⁶⁾ や麻疹ウイルス¹⁷⁾ などの RNA ウイルスは、miR-7, miR-133, miR-206 や let-7 によって、正常細胞での増殖が抑制され、がん特異的に増殖するようになった。miR-7, miR-122, miR-124, miR-133, miR-206 は特定の臓器で発現が高い miRNA であり、miR-143, miR-145, miR-199, let-7 は正常細胞に比べがん細胞で発現低下している miRNA である。本アプローチでは、あらゆる種類の miRNA が利用可能となり、各ウイルスの病原性を示す臓器とがんの種類に依存して、どの miRNA を単独で、もしくは複数で利用するかが選択されている。

がんウイルス療法は始まったばかりであるが、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がん細胞を特異的に破壊・死滅させる利点がある。実際のヒトにおいて、その安全性と効果が確認されたという結果も報告されてきている¹⁸⁾。これらと並行して、上述した様々

なウイルスをベースにした miRNA 制御ウイルスなど、さらなる抗がん効果の増強と安全性の向上のための研究開発も積極的に進められており、今後の臨床応用が期待される。

用語解説

1. **ワクシニアウイルス**：天然痘（痘瘡）ワクチンとして使われていたが、1980年WHOの天然痘根絶宣言の後、非常用として一部で保管されているが、一般の予防ワクチンとしては使われていない。
2. **遺伝子組換え**：任意のDNA断片を別のDNA分子に結合させることによって、従来なかった新しい形質をもつ生物をつくることができる。本文中の遺伝子組換えウイルスとは、ワクシニアウイルスのゲノムDNA中から、B5R遺伝子を欠失させることや再び挿入すること、従来もっていないGFPやルシフェラーゼ遺伝子、またはmiRNAの標的配列断片を挿入することによって作製した新しい形質

をもつワクシニアウイルスを意味する。

3. **相同組換え法**：異なるDNA分子間で、相互の分子に含まれる同じDNA配列をもつ領域間で二本鎖が形成されることで分子間の再結合が起こることにより、もとのDNA分子の鎖が相互に置き換わった分子が形成される。本文中の遺伝子組換えウイルスは、ワクシニアウイルスのゲノムDNAとトランスファーベクター（特定の遺伝子を欠失させる、もしくは新たな遺伝子を挿入させる領域とその両端の相同性のある領域を含む）との相同組換えにより得られる。

参考文献

- 1) Okuno Y, Asada T, et al : *Biken J* 21, 37-49, 1978.
- 2) Kirn D, Martuza RJ : *Nat Med* 7, 781-787, 2001.
- 3) Russell SJ : *Cancer Gene Ther* 9, 961-966, 2002.
- 4) Jean-Joseph P, Sow S, et al : *Lancet* 29, 665-667, 1969.
- 5) Hashizume K, Yoshikawa H, et al : *Vaccinia Virus as Vectors for Vaccine Antigens*, 421-428, Elsevier Science, 1985.
- 6) Nakamura T, Peng KW, et al : *Nat Biotechnol* 23, 209-214, 2005.
- 7) Paraskevaku G, Allen C, et al : *Mol Ther* 15, 677-686, 2007.
- 8) Jing Y, Tong C, et al : *Cancer Res* 69, 1459-1468, 2009.
- 9) Hikichi M, Kidokoro M, et al : *Mol Ther* 19, 1107-1115, 2011.
- 10) Lagos-Quintana M, Rauhut R, et al : *Science* 294, 853-858, 2001.
- 11) Cawood R, Chen HH, et al : *PLoS Pathog* 5, e1000440, 2009.
- 12) Sugio K, Sakurai F, et al : *Clin Cancer Res* 17, 2807-2818, 2011.
- 13) Lee CY, Rennie PS : *Clin Cancer Res* 15, 5126-5135, 2009.
- 14) Fu X, Rivera A, et al : *Mol Ther* 19, 1097-1106, 2011.
- 15) Kelly EJ, Hadac EM, et al : *Nat Med* 14, 1278-1283, 2008.
- 16) Edge RE, Falls TJ, et al : *Mol Ther* 16, 1437-1443, 2008.
- 17) Leber MF, Bossow S, et al : *Mol Ther* 19, 1097-1106, 2011.
- 18) Breitbach CJ, Burke J, et al : *Nature* 477, 99-102, 2011.

中村貴史

- 1997年 鳥取大学医学部生命科学科卒業
 2001年 同大学院医学系研究科（生命科学学位取得）
 2002年 米国メイヨークリニック（Stephen J. Russell 博士）博士研究員
 2004年 同リサーチアソシエイト
 2006年 独立行政法人科学技術振興機構さきがけ研究者
 2009年 東京大学医科学研究所治療ベクター開発室特任准教授
 2012年 鳥取大学大学院医学系研究科機能再生医学専攻生体機能医工学講座生体高次機能学部門准教授

ワクシニアウイルスを用いたがんウイルス療法の研究開発に従事。

