

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、感染した細胞・組織内で増殖伝播しながらそれらを死滅させるというウイルス本来の性質を癌に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、感染した細胞・組織内で増殖伝播しながらそれらを死滅させるというウイルス本来の性質を癌に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

これまでの研究により、純国産ワクシニアウイルスワクチン株を基に、多因子制御ワクシニアウイルス（MDVV）を作製した。この組換えウイルスは、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マイクロRNA (miRNA) let7a の標的配列が挿入されている。さらに、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 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 TK 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する仕組みである。本年度の研究では、MDVV の臨床応用を視野に入れ、以下の 4 項目を実施した。

1) 同系腫瘍移植マウスモデルにおける MDVV の全身投与による抗癌効果を評価するため、マウス肺癌細胞 TC1 より、その内因性 let7a を Decoy RNA によって特異的かつ長期的に抑制した TC1-let7a Knock down (TC1-KD) 細胞を作製した (図 1)。C57BL/6 マウスの右腹側の皮下に TC1、又は TC1-KD 細胞を移植した同系移植腫瘍モデルを作成し、その腫瘍直径が 0.6 cm に到達した時、 10^7 pfu の MDVV を尾静脈より全身投与した。その後、生体内のウイルス分布をバイオイメージングにて評価するとともに、抗癌効果 (腫瘍発育抑制効果) を評価した。

2) ヒト造血器腫瘍移植マウスモデルにおける MDVV の全身投与後の腫瘍特異性を評価するため、免疫不全マウス (SCID) にウミシイタケルシフェラーゼ発現多発性骨髄腫細胞株 (RPMI8226 細胞) を皮下移植し、28 日後にホタルルシフェラーゼ発現 MDVV

を尾静脈より投与した。その後、生体内のウイルス分布をバイオイメージングにて評価した。

3) 癌免疫療法との併用によって MDVV の抗癌効果を増強するため、インターロイキン 12 を発現するように組込んだ MDVV-IL12 を作製した。マウス大腸癌 MC38 細胞を同系 C57BL/6 マウスの両側の皮下に移植したマウス担癌モデルにおいて、Mock (生理食塩水)、MDVV、又は MDVV-IL12 を右側の腫瘍内にのみ投与し、抗癌効果 (腫瘍発育抑制効果) を評価した。

4) MDVV の GMP 製造のための基盤技術を構築するため、痘瘡ワクチン製造のために使われていたウサギ初代腎細胞 (PRK) を樹立した。本研究で使ってきた RK13 細胞と同様に、PRK 細胞において MDVV の作製・増殖が容易かどうかを検討した。

(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、所属大学遺伝子組換え実験安全委員会で承認されている。その中の自立的な増殖力、感染力を保持した組換えワクチ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、所属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。

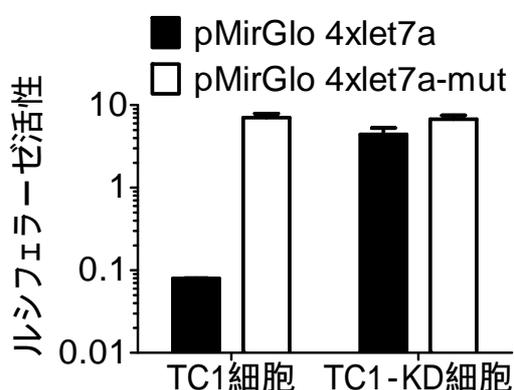


図1 細胞内 let7 による遺伝子発現抑制

pMirGlo ベクター (プロメガ社) は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の 3' 末端側に miRNA 標的サイトを導入し、miRNA 活性を定量的に評価するためにデザインされている。pMirGlo 4xlet7a は let7a 標的サイトが、pMirGlo 4xlet7a-mut は let7a が認識できないように変異を加えた標的サイトが、4 回繰り返して挿入されている。TC1 細胞では let7a の発現が高いので pMirGlo 4xlet7a のルシフェラーゼ発現は抑制されるが、TC1-KD 細胞では let7a の発現が低下しているため発現は抑制されない。一方、pMirGlo 4xlet7a-mut のルシフェラーゼ発現は、両方の細胞においても抑制されない。

C. 研究結果

1) let7a の発現が低下している TC1-KD 細胞を用いたマウス腫瘍モデルにおいて、MDVV の腫瘍特異的増殖が確認でき、さらに生理食塩水を投与したコントロール群と比べ MDVV 投与群では著明な腫瘍発育抑制効果が見られた (図 2)。それに対し、let7a の発現が高い TC1 細胞を用いた TC1 腫瘍モデルにおいては、MDVV の腫瘍特異的増殖は見られず、コントロール群と比べ腫瘍発育抑制効果も示さなかった (図 3)。

2) let7a の発現が低下している多発性骨髄腫細胞株 (RPMI8226 細胞) を用いたマウス腫瘍モデルにおいて、MDVV の腫瘍特異的増殖と抗腫瘍効果が確認された。それに

対し比較対照として、元来のワクシニアウイルス、TK 遺伝子のみ欠損させたウイルスを感染させたところ、抗腫瘍効果は高かったが皮膚を中心に腫瘍以外にも感染が広がりマウスが死亡した (分担研究報告参照)。

3) MDVV、又は MDVV-IL12 を投与した右側の腫瘍増殖抑制効果は Mock と比較して有意に見られたが、各ウイルスの間で有意な差はなかった。それに対し、ウイルスを投与しない左側の腫瘍増殖は MDVV-IL12 による有意な抑制が見られた (図 4)。

4) PRK 細胞においても、RK13 細胞と同様に、MDVV の作製・増殖・精製は容易であることが確認された。

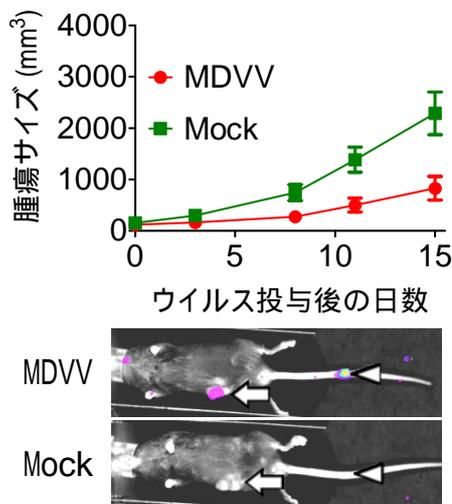


図 2 TC1-KD 腫瘍マウスモデルにおける MDVV の抗癌効果

MDVV はルシフェラーゼ遺伝子を発現するので、その発光酵素基質であるルシフェリン投与後、非侵襲的にウイルス分布をモニターできる。下写真は MDVV 投与 24 時間後のウイルス生体内分布であり、 \blacktriangleleft は腫瘍組織、 \blacktriangleleft は投与部位でのウイルス増殖を示す。

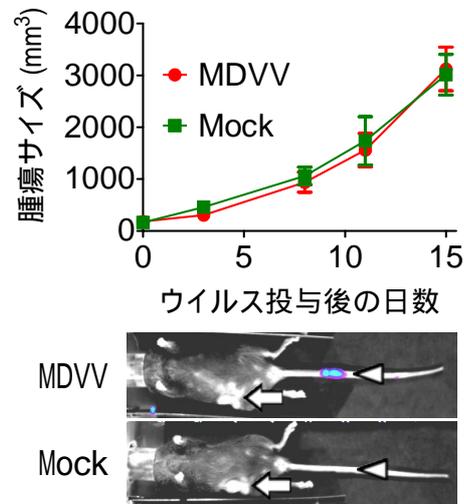
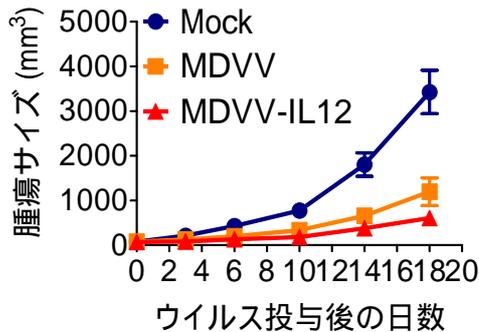


図 3 TC1 腫瘍マウスモデルにおける MDVV の抗癌効果

MDVV はルシフェラーゼ遺伝子を発現するので、その発光酵素基質であるルシフェリン投与後、非侵襲的にウイルス分布をモニターできる。下写真は MDVV 投与 24 時間後のウイルス生体内分布であり、 \blacktriangleleft は腫瘍組織、 \blacktriangleleft は投与部位でのウイルス増殖を示す。

ウイルスを投与した腫瘍



ウイルスを投与していない腫瘍

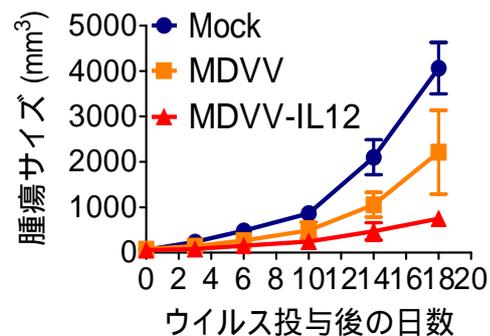


図4 癌免疫療法の併用による MDVV の抗癌効果の増強

癌ウイルス療法では、ウイルス増殖による腫瘍溶解のみならず、それに伴う炎症性サイトカイン産生誘導、及び細胞性免疫誘導など、多様な作用機序によって抗癌効果を発揮する。そこで、インターロイキン 12 を発現するように組込んだ MDVV-IL12 を作製し、MC38 細胞を両側の皮下に移植した担癌マウスにおいて、右側の腫瘍内におき各ウイルス、又は Mock (生理食塩水) を投与し、ウイルスを投与した腫瘍と投与しない腫瘍の増殖を評価した。

D. 考察

同系腫瘍移植マウスモデルやヒト造血器腫瘍移植マウスモデルにおいて、MDVV の血中を介した全身投与により、腫瘍細胞における let7a の発現低下に依存して、腫瘍を標的破壊できることが実証された。

癌ウイルス療法では、ウイルス増殖による腫瘍溶解のみならず、それに伴う炎症性サイトカイン産生誘導、及び細胞性免疫誘導など、多様な作用機序によって抗癌効果を発揮する。そこで、インターロイキン 12 (IL-12) を発現する MDVV を作製し、癌免疫療法との併用による MDVV の抗癌効果の増強を試みた。その結果、ウイルスを投与した右側の腫瘍増殖抑制効果は、ウイルス間で差がないため、ウイルス増殖による腫瘍破壊に因るものと考えられた。一方、投与しない左側の腫瘍増殖は、IL12 発現ウイルスによって最も有意に抑制されているため、NK 細胞を活性化して T リンパ球に作用し Th1 タイプの免疫反応を誘導し腫瘍に対する細胞性免疫を増強する IL-12 に因るものと考え、免疫学的解析を進めている。

一方、本研究において、MDVV の作製・増殖のためには、RK13 細胞が使用されてきた。しかし RK13 細胞は、牛ウイルス性下痢ウイルスを含んでいるため、GMP 製造のためには使用できない。そこで、痘瘡ワクチン製造のために使われていた PRK 細胞において、RK13 細胞と同様に MDVV の作製・増殖が容易かどうかを検討した。その結果、PRK 細胞においても、MDVV の作製・増殖・精製に問題がないことが分かった。これより、細胞培養ワクチンとして確立された製造工程は、MDVV 製剤にも流用できることが示唆された。

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チンウイルス (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、癌ウイルス療法では、ウイルス増殖による腫瘍溶解のみならず、それに伴う炎症性サイトカイン産生誘導、及び細胞性免疫誘導など、多様な作用機序によって抗癌効果を発揮する。そこで、IL-12を発現するMDVVを作製し、癌免疫療法との併用を試みた。このIL-12発現MDVVの結果は、免疫制御遺伝子によって抗腫瘍効果を増強できることを示しており、免疫制御分子の発現によるMDVVの最適化は次に続くシーズとして期待できる。

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を確立するだけでなく、臨床応用を視野に入れ、MDVVのGMP製造や品質管理のための基盤技術構築を進めることによって、本研究の成果をシームレスに臨床応用へと直結させる。

F . 健康危険情報
なし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Lech PJ, Pappoe R, Nakamura T, Russell SJ. Antibody neutralization of retargeted measles viruses. *Virology* 454-455: 237-246, 2014
2. Ohashi T, Nakamura T, Kidokoro M, Zhang X, and Shida H. Combined Cytolytic Effects of a Vaccinia Virus Encoding a Single Chain Trimer of MHC-I with a Tax-Epitope and Tax-Specific CTLs on HTLV-I-Infected Cells in a Rat Model. *BioMed Research International*. 2014: 902478, 2014
3. He H, Nagamura-Inoue T, Tsunoda H, Yuzawa M, Yamamoto Y, Yorozu P, Tojo A. Stage-Specific Embryonic Antigen 4 is not a marker for proliferation and pluripotency in Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 20(7-8): 1314-24, 2014
4. Yokoyama K, Yokoyama N, Izawa K, Kotani A, Harashima A, Hozumi K, *Tojo A. *In vivo* leukemogenic potential of an interleukin-7 receptor- α mutant in hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*. 22(26):4259-63, 2013
5. Tomokuni A, Eguchi H, Hoshino H, Dewi DL, Nishikawa S, Kano Y, Miyoshi N, Tojo A, Kobayashi S, Gotoh N, Hinohara K, Fusaki N, Saito T, Suemizu H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Doki Y, Mori M, Ishii H, Nagano H. Effect of *in vivo* administration of reprogramming factors in the mouse liver. *Oncol Lett*. 6(2):323-8, 2013
6. Ohno N, Kobayashi S, Ishigaki T, Yuji K, Kobayashi M, Sato K, Watanabe N, Tojo A, Uchimarui K. Loss of CCR4 antigen expression after mogamulizumab therapy in a case of adult T cell leukaemia-lymphoma. *Br J Haematol*. 163(5):683-5, 2013
7. Okuyama K, Ikawa T, Harnprasopwat R, Lu J, Yamashita R, Ha D, Toyoshima T, Chanda B, Kawamata T, Yokoyama K, Gertner B, Wang S, Ando K, Lodish HF, Tojo A, Kawamoto H, Kotani A. miR-126-mediated control of cell fate in B cell-myeloid progenitors as a potential alternative to transcriptional factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(33):13410-5, 2013
8. Chen MH, Soda Y, Izawa K, Kobayashi S, Tani K, Maruyama K, Tojo A, Asano S. A versatile drug delivery system using streptavidin-tagged pegylated liposomes and biotinylated biomaterials. *Int J Pharm*. 454(1):478-85, 2013
9. Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimarui K. The CD3 versus CD7 plot in multicolor flow cytometry reflects progression of disease stage in patients infected with HTLV-I. *PLoS One*. 8(1):e53728, 2013
10. 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(1):103-8, 2013

11. 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

2. 学会発表 (海外)

1. Naoyoshi Nitta, Nao Okada, Ikumi Goto, Motomu Nakatake, Masato Yamane, Hajime Kurosaki, Takafumi Nakamura. Systemic cancer virotherapy with MDVV, a combined miRNA-regulated and thymidine kinase-deleted oncolytic vaccinia virus. The Seventh International Meeting On Replicating Oncolytic Virus Therapeutics, Quebec City, Canada, 2013/6/16
2. He H, Nagamura-Inoue T, Yamamoto Y, Mori Y, Tsunoda H, Tojo A. The immunosuppressive effect of Wharton Jelly-derived mesenchymal stem cells in vitro. The 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, New Orleans, USA, 2013/12/7-10
3. Izawa K, Yamamoto M, Tojo A. Long-term ex vivo maintenance of murine iPSC-derived hematopoietic stem/progenitor cells by conditional HoxB4. The 55th American Society of Hematology Annual Meeting and

Exposition, New Orleans, USA, 2013/12/7-10

(国内)

1. Naoyoshi Nitta, Nao Okada, Ikumi Goto, Masato Yamane, Motomu Nakatake, Hajime Kurosaki, and Takafumi Nakamura. Safety profile, tumor selectivity and oncolytic effects after systemic administration of oncolytic vaccinia virus MDVV. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013/10/5
2. Naoyoshi Nitta, Nao Okada, Ikumi Goto, Masato Yamane, Motomu Nakatake, Hajime Kurosaki, and Takafumi Nakamura. SYSTEMIC CANCER VIROTHERAPY WITH MDVV, A COMBINED miRNA-REGULATED AND THYMIDINE KINASE-DELETED ONCOLYTIC VACCINIA VIRUS. The 19th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 岡山, 2013/7/4
3. 大野伸広、田野崎隆二、福田隆浩、井上明威、藤重夫、伊藤歩、小林真之、佐藤広太、城憲秀、川俣豊隆、湯地晃一郎、石垣智寛、小林誠一郎、渡辺信和、内丸薫、東條有伸. Significance of the allogeneic HSCT in the treatment of the aggressive ATL patients. 第75回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013/10/11-13
4. 湯地晃一郎、佐藤広太、城憲秀、小林真之、磯部優理、島田直樹、石橋通宏、小沼貴晶、大野伸広、小林誠一郎、小柳津直樹、内丸薫、東條有伸. Mantle cell lymphoma with hypersensitivity to mosquito bites in the elderly: a distinct entity. 第75回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013/10/11-13

- | | |
|---|--|
| <p>5. 城 憲秀、大野伸広、小林真之、佐藤広太、川俣豊隆、石垣智寛、小林誠一郎、湯地晃一郎、内丸 薫、<u>東條 有伸</u>. Mogamulizumab treatment for ATL patients in IMSUT hospital. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013/10/11-13</p> <p>6. 佐藤広太、湯地晃一郎、津田真由子、大野伸広、内丸 薫、<u>東條 有伸</u>. Marked Eosinophilia Caused by Interleukin-5-producing Cardiac Myxoma. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013/10/11-13</p> <p>7. 小林真之、佐藤広太、川俣豊隆、湯地晃一郎、大野伸広、高橋 聡、内丸 薫、<u>東條 有伸</u>. Clinical profile of adult Langerhans cell histiocytosis: A single-institute experience in Japan 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013/10/11-13</p> <p>8. Haiping He、長村登紀子、角田 肇、湯沢美紀、山本由紀、<u>東條 有伸</u>. SSEA4 is not a marker for proliferation and pluripotency in Wharton's Jelly-derived MSCs. 第75回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013/10/11-13</p> <p>9. マイクロ RNA 制御性ワクシニアウイルスは多発性骨髄腫細胞選択的に細胞死をもたらす. 二見 宗孔、<u>中村 貴史</u>、<u>東條 有伸</u>. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013/10/3-5</p> | <p>2. 実用新案登録
なし</p> <p>3. その他
なし</p> |
|---|--|

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ依存性組換えワクシニアウイルス (MD-RVV) 及びその使用
 出願番号：2013-241299
 発明者：中村貴史
 出願人：国立大学法人鳥取大学、一般財団法人化学及血清療法研究所
 出願日：2013年11月22日