

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

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、多因子制御ワクシニアウイルス（MDVV）を作製した。ウイルスゲノムの 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 の標的配列を挿入した。これより let7a によって B5R の発現が制御される。又、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を HA ではなく TK 遺伝子に挿入した。これによって

TK 遺伝子が機能しない。

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、抗腫瘍効果、及び腫瘍特異的増殖性を生体内バイオイメージングにて評価した。

（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、東京大学医科学研究所遺伝子組換え生物等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

本研究では、まず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。

その結果、多発性骨髄腫が造血器腫瘍の中で極めて高感受性を示すことが分かったため、本研究では多発性骨髄腫を対象とした(図1)。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 の一つ let-7a に着目し、let-7a の標的配列を B5R 遺伝子の 3' UTR に組み込んだ改変型ワクシニアウイルスを作製した(図2)。let-7a の発現が高い HeLa 細胞では、let-7a 制御性ワクシニアウイルスの感染後のウイルス伝播増殖性は低下する一方、多発性骨髄腫では低下しないことが確認された。つまりワクシニアウイルスの抗腫瘍効果を保ったまま正常細胞への副作用が軽減される可能性が示唆された(図3)。次に、let-7a 制御性ワクシニアウイルスの効果と安全性を *in vivo* で検証するため、SCID マウスにウミシ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 日間マウス体内の腫瘍を改良型セレンテラジン(ViviRen)によってモニターした。皮下における腫瘍の増殖が確認できたので、移植 28 日後にホタルルシフェラーゼ発現 let7a 制御ウイルスを尾静脈より投与し、マウス体内のウイルス分布をさらに 28 日間、非侵襲的にモニターした。その結果、皮下腫瘍でのウイルス増殖が確認され、腫瘍も縮小することが確認された。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。一方、TK 欠損かつ let-7a 制御を用いたワクシニアウイルス(MDVV)では腫瘍特異性が極めて高く、正常組織へのウイルス感染が著明に抑制された(図4)。

D. 考察

今後は、上記の骨髄腫細胞株モデルマウスに加え、ヒト患者細胞を移植したマウスモデルにおける抗腫瘍効果(腫瘍発育抑制効果と生存期間延長効果)及び安全性(体重減少や皮膚などの一般状態)を評価する予定である。

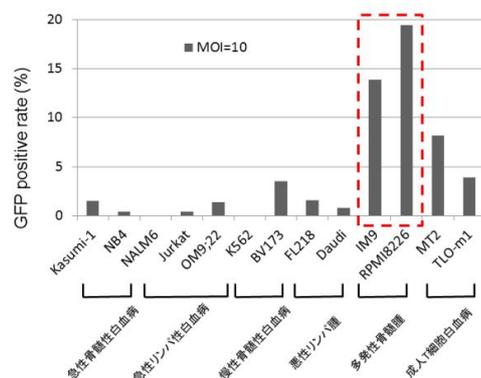


図1. 多発性骨髄腫はワクシニアウイルスに対する感受性が高い

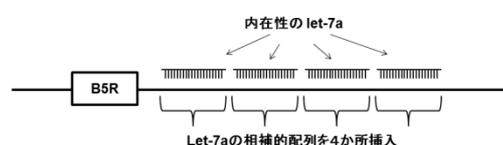


図2. miRNA による B5R の制御

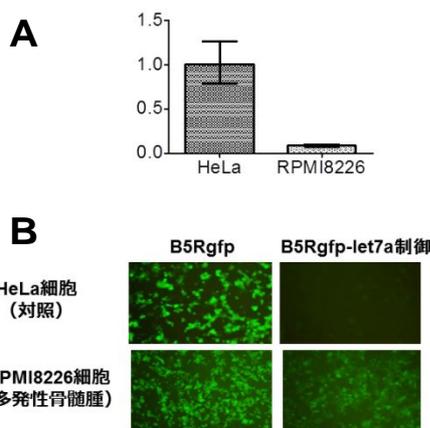


図3. A. let-7a の発現量. B. let-7amiRNA 制御によるウイルス伝播の抑制

E. 結論

以上より、多発性骨髄腫細胞株を使った研究により、MDVV は腫瘍特異的増殖による強力な抗癌効果を示す一方、正常組織に対する安全性が高く、将来の新規治療法の有力な候補になりうると考えられる。

腫瘍量
ウミシイタケルシフェラーゼ

ウイルス量
ホタルルシフェラーゼ

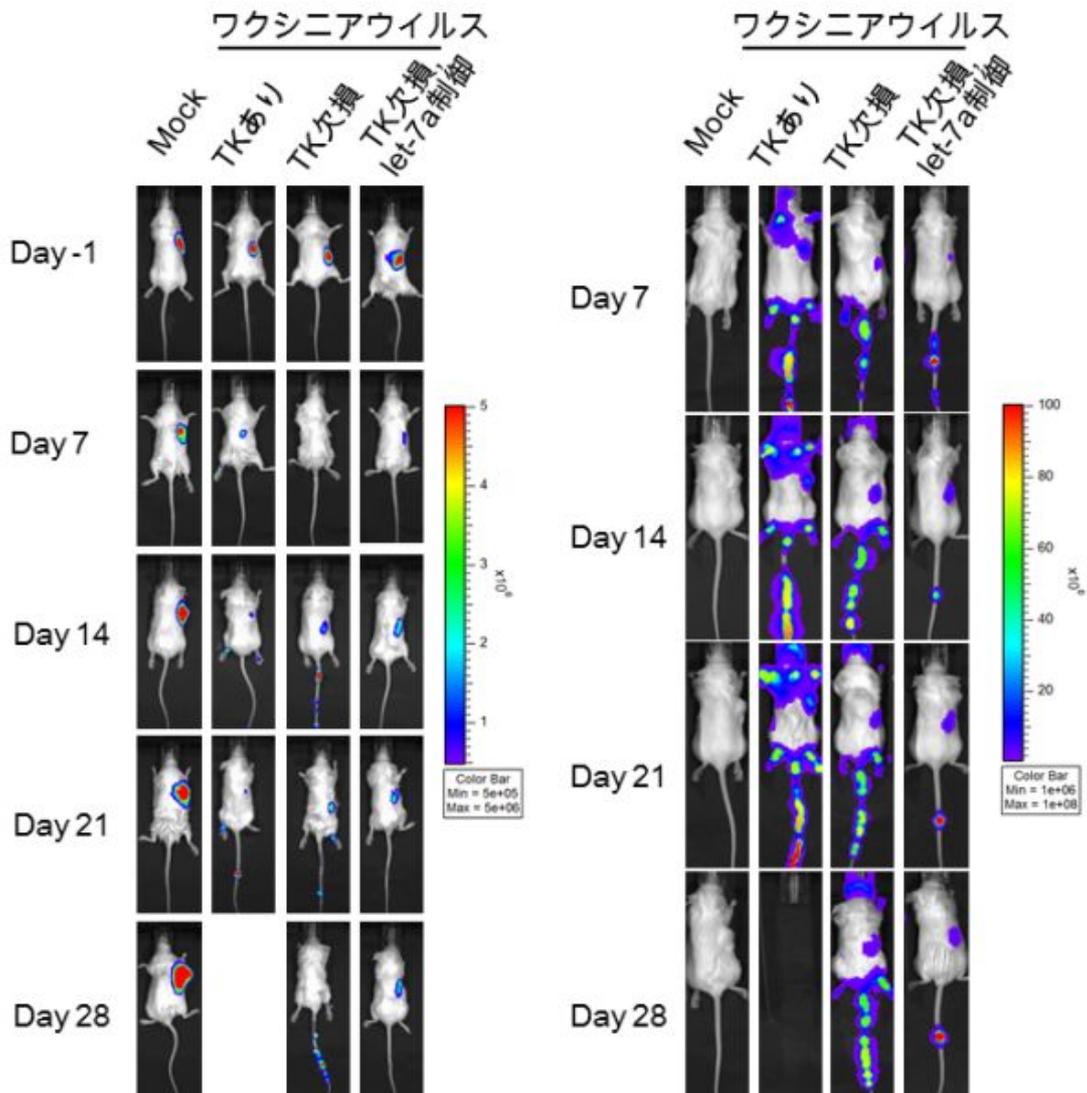


図4. ルシフェラーゼを用いたバイオイメージング。腫瘍量をウミシイタケルシフェラーゼ、ウイルス量をホタルルシフェラーゼにて標識した。

F . 健康危険情報

本研究を実施するにあたり、遺伝子組換えウイルスを取り扱う実験に関しては、文部科学省の第二種使用等拡散防止措置指針に基づいて行われている。

G . 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

Ohno N, Kobayashi S, Ishigaki T, Yuji K, Kobayashi M, Sato K, Watanabe N, Tojo A, Uchimar 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

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

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

Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimar 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

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

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)

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. 2013.12.7-10, New Orleans, USA

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. 2013.12.7-10, New Orleans, USA

(国内)

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、2013.10.11-13、札幌

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 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、2013.10.11-13、札幌

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、東條有伸。Mogamulizumab treatment for ATL patients in IMSUT hospital. 第75回日本血液学会学術集会、2013.10.11-13、札幌

佐藤広太、湯地晃一郎、津田真由子、大野伸広、内丸薫、東條有伸。Marked Eosinophilia Caused by Interleukin-5-producing Cardiac Myxoma. 第75回日本血液学会学術集会、2013.10.11-13、札幌

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、東條有伸。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、2013.10.11-13、札幌

Haiping He、長村登紀子、角田肇、湯沢美紀、山本由紀、東條有伸。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、2013.10.11-13、札幌

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、中村貴史、東條有伸。第72回日本癌学会学術総会。2013.10.3-5。横浜

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