

2013130608

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23年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 中村 貴史

平成26(2014)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23年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 中村 貴史

平成26（2014）年 5月

目 次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 2 1
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 2 3

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）
総合研究報告書

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

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（図1）。無制御ウイルスでは、感染細胞内において、ウイルス伝播増殖に重要であるウイルス膜蛋白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 miRNA 制御ウイルスが感染した正常細胞では、その内因性 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。

1) 免疫不全 SCID マウスの腹腔内にウミシイタケルシフェラーゼ発現ヒト膵臓癌細胞 BxPC-3 (5×10^6 個) を投与し、その 7 日後に各ワクシニアウイルス (10^6 pfu) を腹腔内に投与した。その後、(腫瘍発育抑制効

果と生存期間延長効果)、安全性 (体重減少や皮膚などの一般状態)、及び腫瘍特異的増殖性を評価した (図 2)。尚、この担癌モデルマウスにおいて、マウス正常組織と BxPC-3 腫瘍の let7a 発現レベルを TaqMan miRNA assay 法によって比較解析した。

又、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 (ViviRen) 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ので、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。

2) NK 細胞枯渇処理 NOD/SCID マウスにウミシイタケルシフェラーゼ発現成人 T 細胞白血病 (ATL) 細胞株 MT-2 を腹腔内投与し、11 日後にホタルルシフェラーゼ発現 MDVV を腹腔内投与した。その後、抗腫瘍効果、及び腫瘍特異的増殖性を評価した。

一方、TL-0m1 細胞を NOG マウスの皮下に接種し、腫瘍が約 100mm^3 になった時点で、尾静脈より MDVV を投与した。その 3 日後に体内でのウイルス分布をモニターし、その腫瘍特異的増殖性を評価した。

又、これらの担癌モデルマウスにおいて、マウス正常組織と ATL 腫瘍の let7a 発現レベルを TaqMan miRNA assay 法によって比較解析した。

3) 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 3)。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

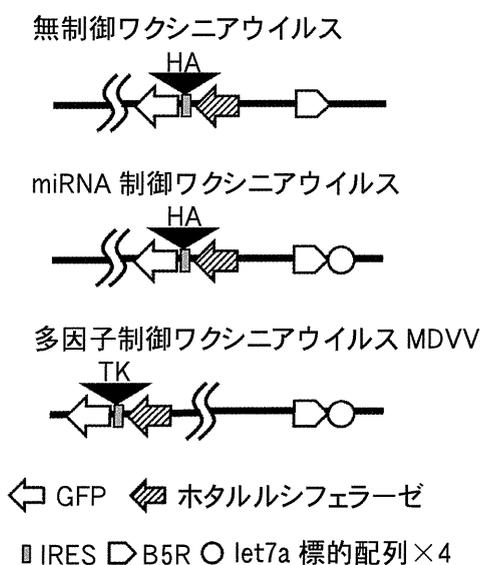


図 1 遺伝子組換え MDVV の構築

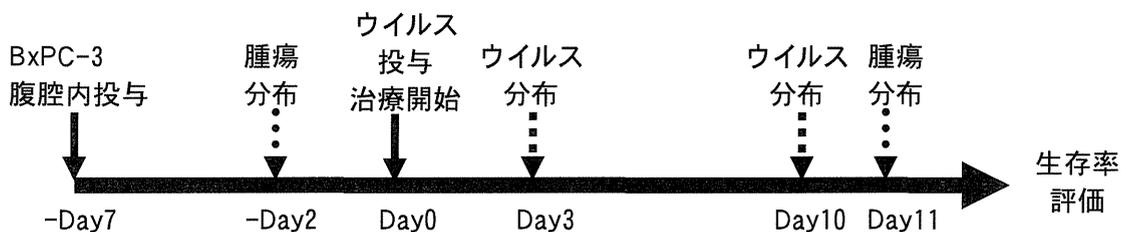


図 2 BxPC-3 腹膜播種マウスモデルの実験スケジュール A

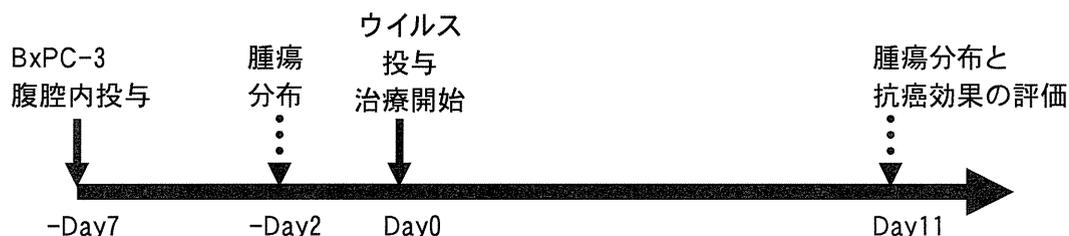


図3 BxPC-3 腹膜播種マウスモデルの実験スケジュール B

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・増殖を非侵襲的にモニターできる。

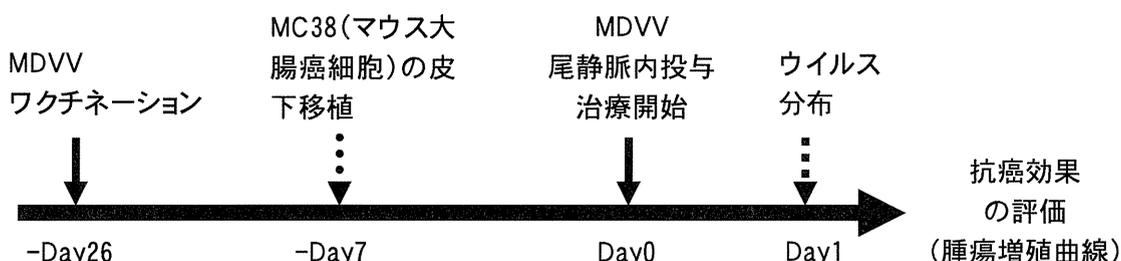


図4 C57BL/6 担癌マウスモデルの実験スケジュール

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。

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、各ワクチ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。

4) 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チ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 4)。C57BL/6 マウスを MDVV (10⁷pfu) 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 100mm³ 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。

5) 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 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により確認した。また miRNA 制御性ワクチ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。

6) 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 5)。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、その腫瘍直径が約 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。

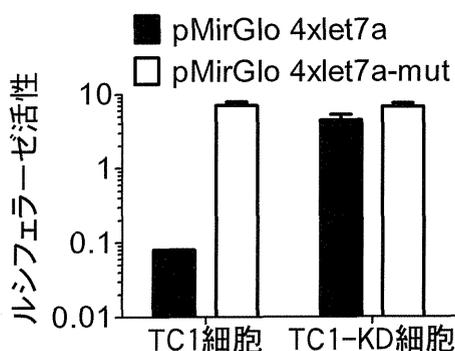


図5 細胞内 let7a による遺伝子発現抑制

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ので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。

7) 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。

8) 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 (IL12) 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 を右側の腫瘍内のみ投与し、抗癌効果 (腫瘍発育抑制効果) を評価した。

9) 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 (PRK) 細胞を樹立した。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。

C. 研究結果

1) ヒト膵臓癌細胞 BxPC-3 の腹膜播種マウスモデルにおいて、その let7a の発現は、マウス正常組織に比べ BxPC-3 腫瘍で低下していることが明らかになった (図 6)。

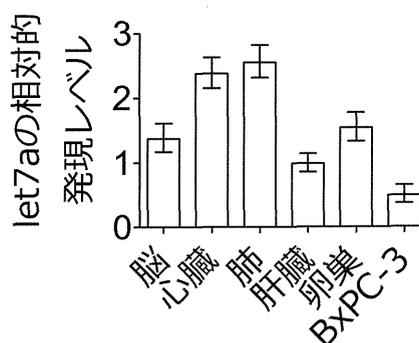


図6 定量 RT-PCR による let7a の発現解析

BxPC-3 腹膜播種マウスモデル（各群 10 匹）において、多因子制御ウイルス MDVV は、生理食塩水を投与したコントロールや他のウイルスと比べ、生存を延長させ強力な抗癌効果を示した（図 7）。無制御ウイルスは、全身の正常組織へ伝播増殖し、最終的にはそれに伴うウイルス毒性（急激な体重減少）によってマウスは死亡した。又 miRNA 制御ウイルスは、無制御ウイルスと比べると全身の正常組織への伝播増殖性は顕著に低下していたが、最終的にはウイルス毒性を示した。それに対し MDVV は、再発した腫瘍によって死亡するマウスがいたものの、全身の正常組織へ伝播増殖することはなかった。この結果は、生体内の腫瘍分布とウイル

ス分布のイメージングによって、その詳細が明らかとなった。MDVV 治療群では治療 11 日後の腹腔内の腫瘍がほぼ消失していたが、コントロール群では治療効果がなく腫瘍が増大していた（図 8）。又、マウス体内のウイルス分布の解析より、投与 3 日後には腹腔内腫瘍における MDVV の増殖が確認され、その増殖による腫瘍の破壊に伴って 10 日後にはウイルス増殖も消失していた（図 9）。一方、無制御ウイルス、miRNA 制御ウイルスは、MDVV と同等の抗癌効果を示したが（図 8）、投与 10 日後には全身の正常組織へも伝播増殖し、その毒性でマウスは死亡した（図 9）。

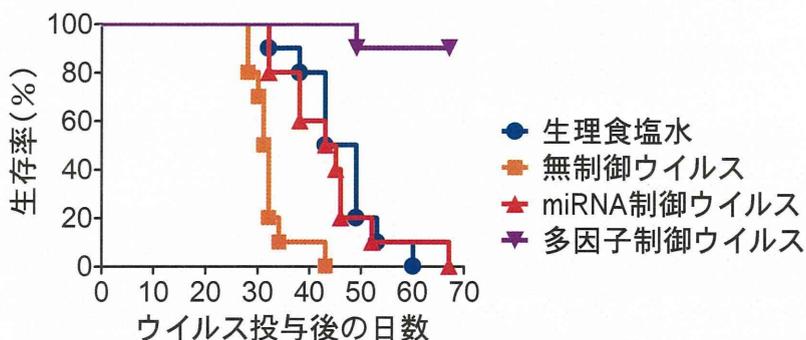


図 7 MDVV の腫瘍特異的増殖による強力な抗癌効果と高い安全性

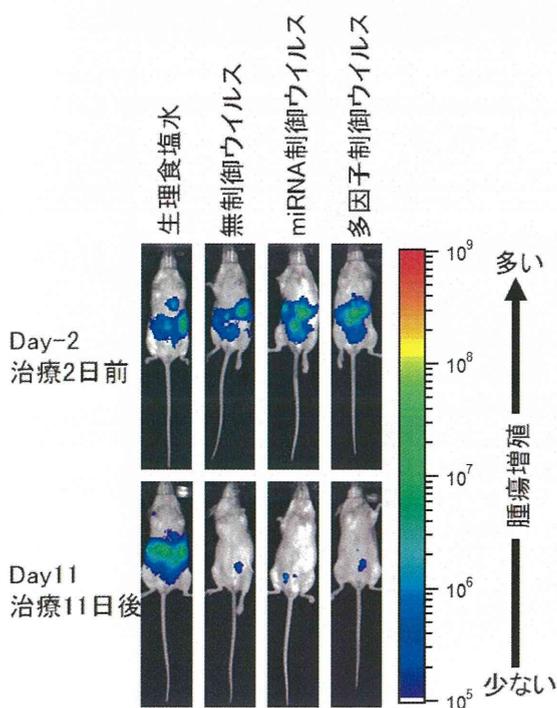


図 8 腫瘍分布のイメージング

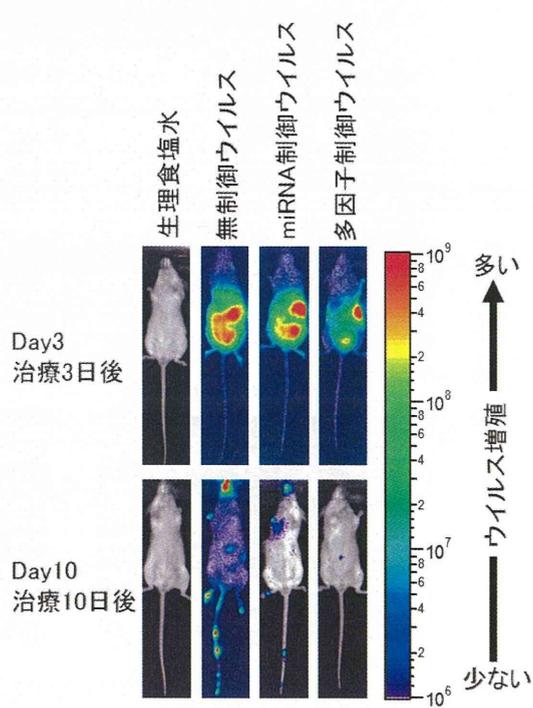


図 9 ウイルス分布のイメージング

2) ATL 担癌モデルマウスにおいて、その let7a の発現は、マウス正常組織に比べ ATL 腫瘍で低下していることが明らかになった (図 10)。

NK 細胞枯渇処理 NOD/SCID マウスにウミシイタケルシフェラーゼ発現 ATL 細胞株 MT-2 を腹腔内投与し、10 日後にマウス体内の腫瘍をセレンテラジン投与によってモニターした。腹腔内における腫瘍の増殖が確認できたので、11 日後にホタルルシフェラーゼ発現 MDVV ウイルスを腹腔内投与した。14 日後にルシフェリンをマウスに投与後、

マウス体内のウイルス分布を非侵襲的にモニターした。その結果、腹腔内腫瘍でのウイルス増殖が確認された。そして、20 日後に腫瘍はほぼ消失し、それに伴いウイルス増殖も減少することが 21 日後に観察された。一方、腹腔内に腫瘍がないマウスにウイルスを投与しても、その正常組織でのウイルス増殖は確認できなかった (図 11)。

TL-0m1 皮下腫瘍 NOG マウスにおいて、MDVV は血中を介して効率よく腫瘍組織に到達することが可能であった (図 12)。

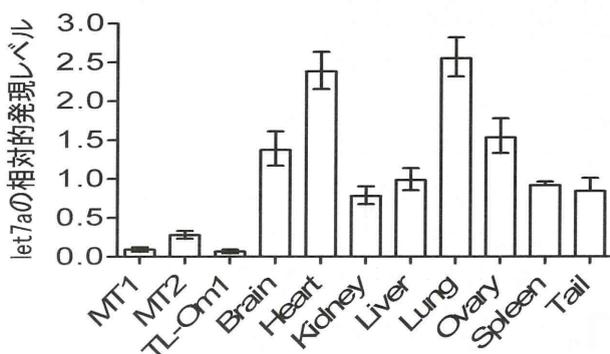


図10 定量 RT-PCR による let7a の発現解析

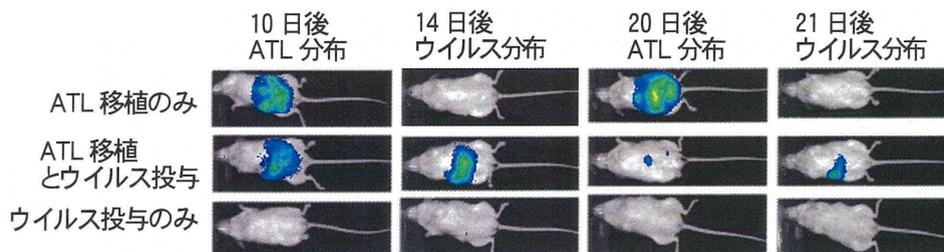


図11 MDVV の腫瘍特異的増殖による強力な抗癌効果

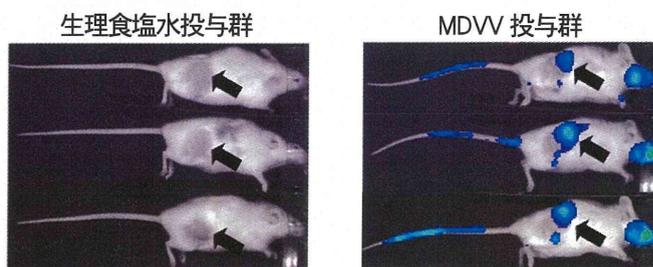


図12 血中を介した MDVV の腫瘍標的化

◀ は皮下腫瘍組織を示す

3) 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 1 3 と図 1 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 1 3 と図 1 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 1 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。

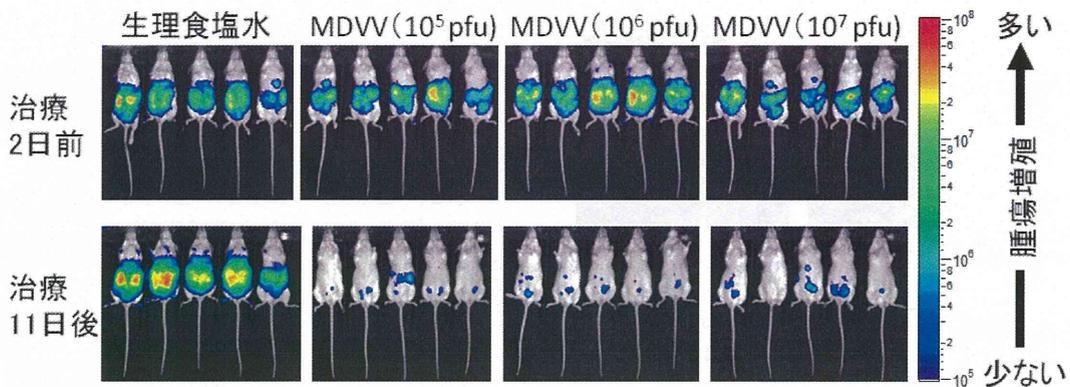


図 13 腫瘍イメージングによる MDVV の投与量と抗癌効果の解析

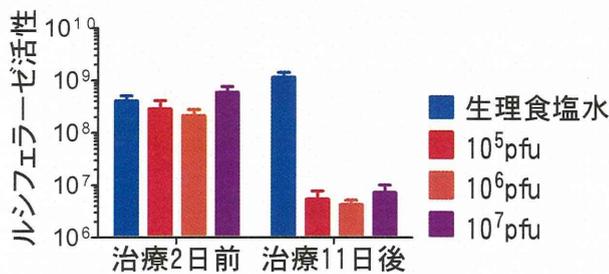


図 14 MDVV の抗癌効果

図 13 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。

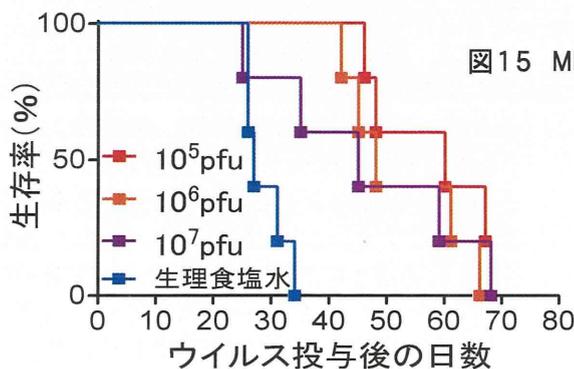


図 15 MDVV の生存期間延長効果

4) 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 16)、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 17)。

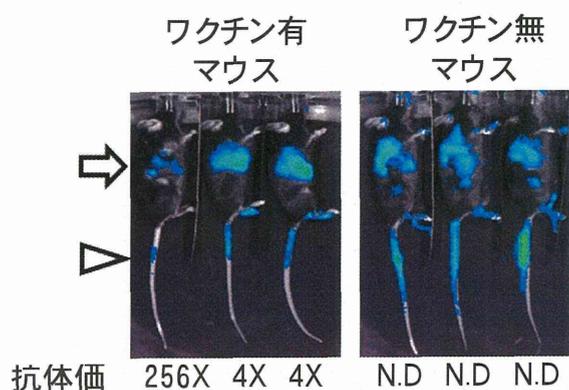


図 16 抗ワクシニア抗体存在下における血中を介した MDVV の腫瘍特異的の伝播と増殖

抗体価は MDVV 投与前に測定した値を示し、 \blacktriangleright は腫瘍組織、 \triangleleft 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

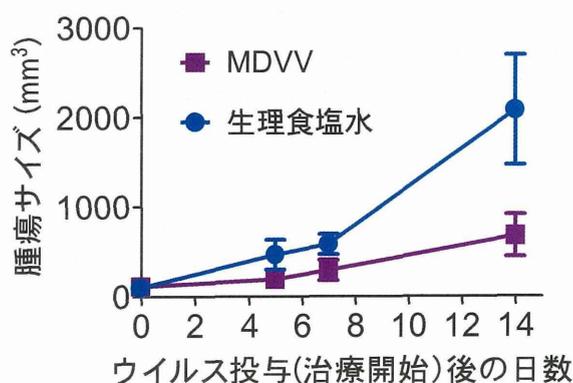


図 17 MDVV の抗癌効果

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。

5) 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 18A 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 18B)。

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 19A 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 19B 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 20)。

一方、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するため、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 21)。その結果、多発性骨髄腫由来細胞株で

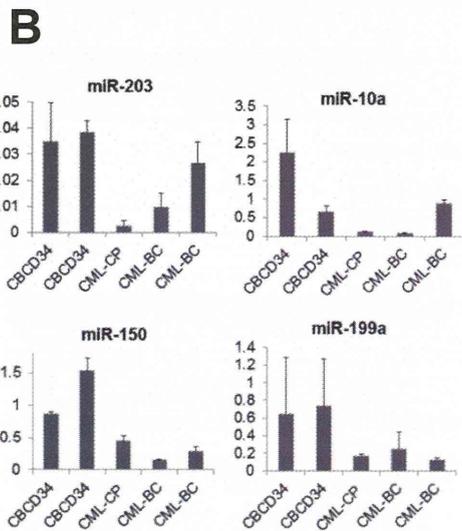
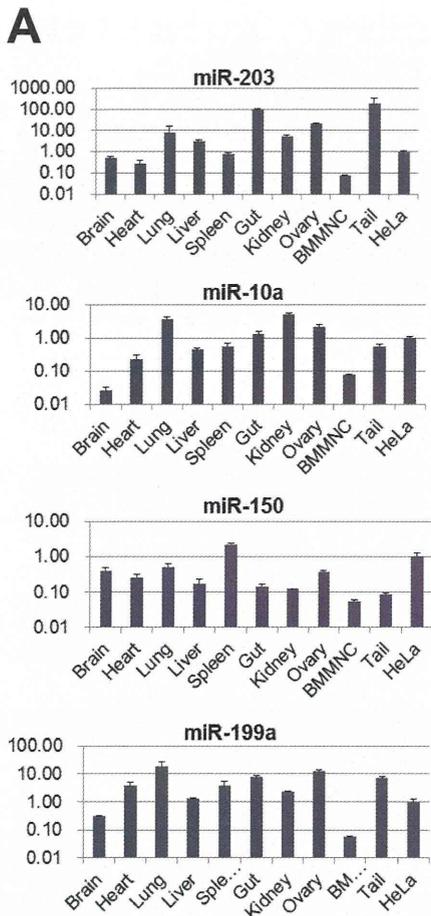


図18 miRNA の定量 RT-PCR
 (A) BALB/c マウスの各組織における発現。 (B) 正常臍帯血由来造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) および CML 患者 CD34 陽性細胞における発現。

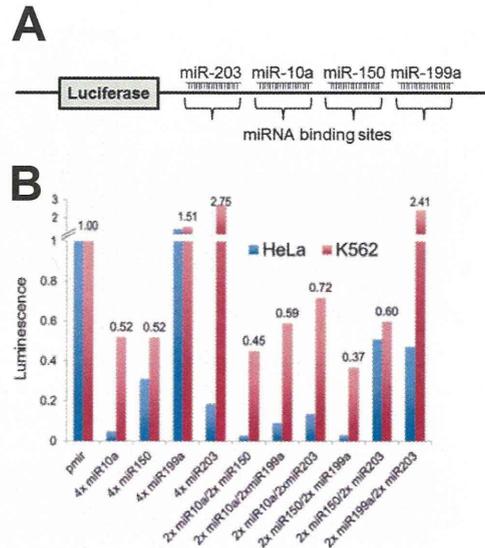


図19 (A) miRNA 標的配列による遺伝子制御 (B)トランスフェクション 24 時間後のルシフェラーゼ活性
 miRNA 標的配列を挿入していないコントロールベクター (pmirGLO vector) での活性を1とした。

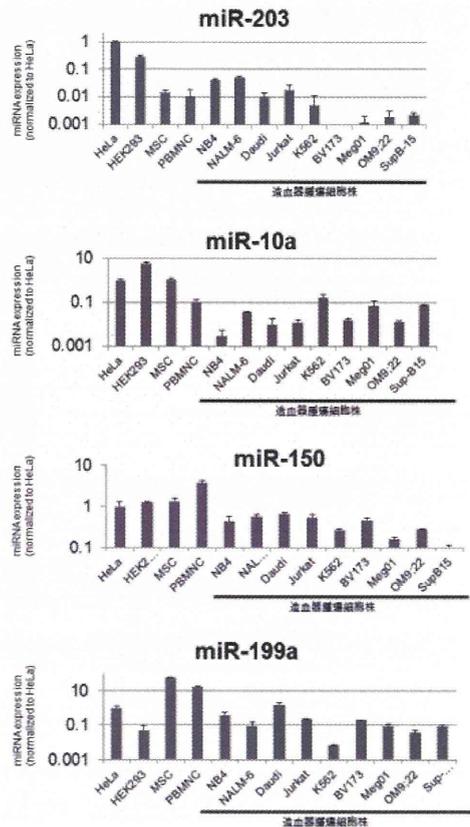


図20 造血器腫瘍患者由来各細胞株における miRNA の発現
 HeLa 細胞での発現レベルを1とした。

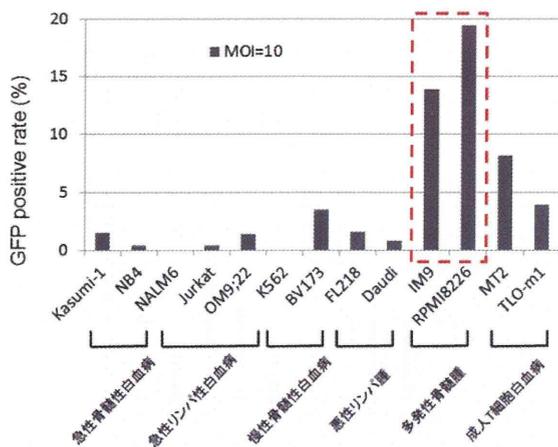


図21. 造血器腫瘍細胞におけるワクシニアウイルス感受性
多発性骨髄腫はワクシニアウイルスに対する感受性が高い

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。

6) 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 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 2 3)。

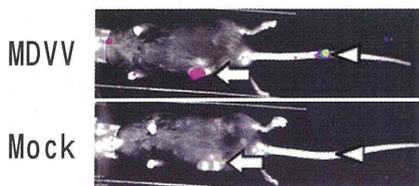
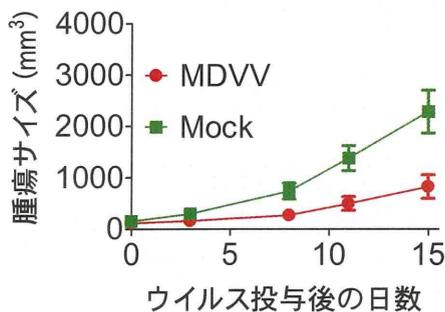


図22 TC1-KD 腫瘍マウスモデルにおける MDVV の抗癌効果

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、 \leftarrow は腫瘍組織、 \blacktriangleleft は投与部位でのウイルス増殖を示す。

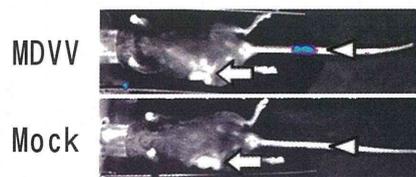
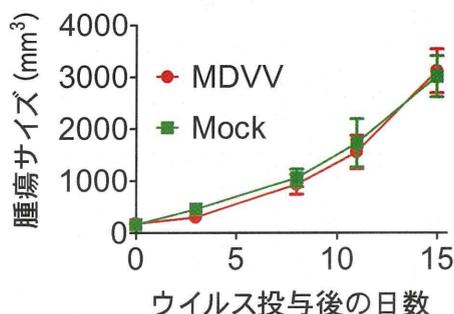


図23 TC1 腫瘍マウスモデルにおける MDVV の抗癌効果

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、 \leftarrow は腫瘍組織、 \blacktriangleleft は投与部位でのウイルス増殖を示す。

7) let7a の発現が高い HeLa 細胞において、let7a 制御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 24)。次に、SCID マウス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 日間、マウス体内の腫瘍をセレンテラジンによって非侵襲的にモニターした。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 MDVV 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、非侵襲的かつ経時的に

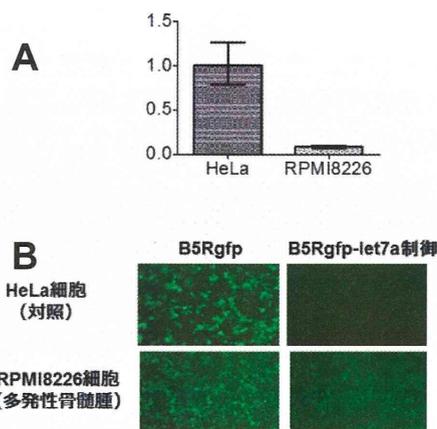


図 24 A. let-7a の発現量.
B. let-7amiRNA 制御によるウイルス伝播の抑制

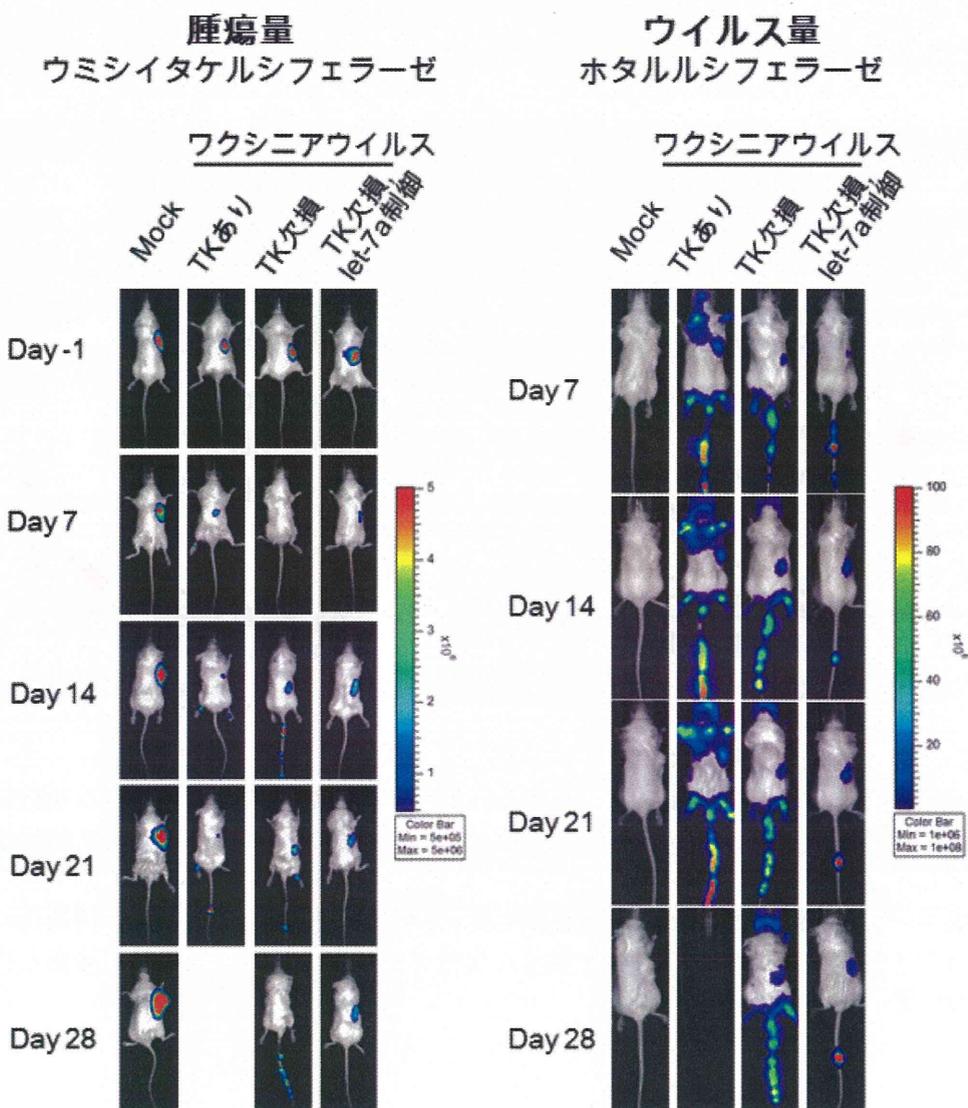


図 25 ルシフェラーゼを用いたバイオイメージング.
腫瘍分布量をウミシイタケルシフェラーゼ、ウイルス量をホタルルシフェラーゼにて標識した

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 *let7a* 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 25)。

8) 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 26)。

9) 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。

D. 考察

1) ヒト膵臓癌細胞 BxPC-3 の腹膜播種マウスモデルにおいて、生体内の腫瘍分布とウイルス分布の非侵襲的かつ経時的イメージングにより、MDVV は極めて高い腫瘍特異的増殖能を示し、副作用なく腹膜播種した癌を標的破壊できることを実証した。

2) ATL 担癌モデルマウスにおいて、血中を介して効率よく腫瘍組織に到達できることが実証できたので、実際の症例で多臓器へ浸潤している ATL 細胞を標的破壊する治療法として期待できる。

3) 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。

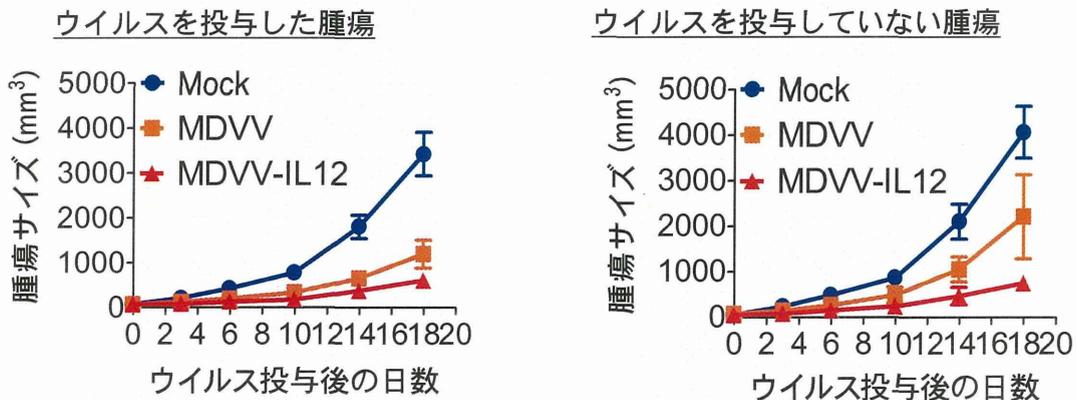


図26 癌免疫療法の併用による MDVV の抗癌効果の増強

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、右側の腫瘍内にも各ウイルス、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。

4) 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。

5) 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、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。これより、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。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示唆された。

6) 同系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。

7) ヒト多発性骨髄腫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。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。

8) 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、IL-12 を発現するウイルスと発現しない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 細胞を活性化する・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。

9) 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

1) MDVV は極めて高い腫瘍特異的増殖能を有し、その腹膜播種マウスモデルにおいても副作用なく強力な抗癌効果を示した。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。

2) ATL 腫瘍細胞株を使った研究では、let7a の発現が正常細胞と比べ腫瘍細胞で低下しており、その ATL 細胞株の担癌マウスモデルにおいて、MDVV は腫瘍特異的増殖による強力な抗癌効果を示した。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が可能であった。

3) 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。

4) MDVV は抗ウイルス抗体存在下でも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、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。

5) 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。

6) 免疫が正常に機能している同系腫瘍移植マウスモデルにおいても、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。

7) ヒト多発性骨髄腫細胞株を用いた担癌モデルマウスにおいて、MDVV は血中を介して効率よく腫瘍組織に到達し、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。

8) 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) 発現する MDVV を作製し、癌免疫療法との併用を試みた結果、抗癌効果は増強された。IL-12 は、T リンパ球に作用し Th1 タイプの免疫反応を誘導することにより、腫瘍に対する細胞性免疫を増強する。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。

9) 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。

又、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。つまり、ウイルス投与前に個々の癌患者の検体で miRNA の発現を調べることによって、より安全かつ効果的に腫瘍細胞のみを攻撃する miRNA 制御型ワクシニアウイルス (MDVV) を選択する個別化医療への発展が期待できる。

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, Uchimaru 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, Uchimaru 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
12. 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* 54: 2068-2069, 2013
13. Oshima Y, Tsukamoto H, Tojo A. Association of hepatitis B with

- antirheumatic drugs: a case-control study. *Mod Rheumatol.* 23: 694-704, 2013
14. 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* 15: 181-186, 2013
 15. 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
 16. 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
 17. 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
 18. Yamamoto S, Ebihara Y, Mochiduki S, Tsuda M, Yuji K, Uchimarui, 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
 19. Oshima Y, Yuji K, Tojo A. Eltrombopag in refractory aplastic anemia. *New Engl J Med.* 367:1162-3, 2012
 20. 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
 21. 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
 22. 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
 23. 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
 24. 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
 25. Kawamata T, Tojo A. Helicobacter pylori-induced thrombocytosis clinically indistinguishable from essential thrombocythemia. *Leuk. Lymphoma* 53: 1423-4, 2012
 26. 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
 27. Hikichi M, Minoru Kidokoro M, Haraguchi T, Iba H, Shida H, Tahara H

- and Nakamura T: MicroRNA regulation of glycoprotein B5R in oncolytic vaccinia virus reduces viral pathogenicity without impairing its antitumor efficacy. *Molecular Therapy* 19: 107-1115, 2011.
28. Takenobu H, Shimozato O, Nakamura T, Ochiai H, Yamaguchi Y, Ohira M, Nakagawara A and Kamijo T: CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification. *Oncogene* 30: 97-105, 2011.
 29. Tsai HJ, Kobayashi S, Izawa K, Ishida T, Watanabe T, Umezawa K, Lin SF, Tojo A. Bioimaging analysis of NF- κ B activity in Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cells unveils its synergistic up-regulation by TNF α -stimulated changes to the microenvironment. *Cancer Sci.* 102:2014-2021, 2011.
 30. Inoue Y, Sheng F, Kiryu S, Watanabe M, Harnprasopwat R, Izawa K, Tojo A, Ohtomo K. Gaussia luciferase for bioluminescence tumor monitoring in comparison with firefly luciferase. *Mol. Imaging* 10:377-385, 2011.
 31. Tanabe T, Yamaguchi N, Matsuda K, Yamazaki K, Takahashi S, Tojo A, Onizuka M, Eishi Y, Akiyama H, Ishikawa J, Mori T, Hara M, Koike K, Kawa K, Kawase T, Morishima Y, Amano H, Kobayashi-Miura M, Kakamu T, Nakamura Y, Asano S, Fujita Y. Association analysis of the NOD2 gene with susceptibility to graft-versus-host disease in a Japanese population. *Int J Hematol.* 93:771-778, 2011.
 32. Tian Y, Kobayashi S, Ohno N, Isobe M, Tsuda M, Zaika Y, Watanabe N, Tojo A, Tani K, Uchimaru K. Leukemic T cells are specifically enriched in a unique CD3^{dim}CD7^{low} subpopulation of CD4⁺ T cells in acute-type adult T cell leukemia. *Cancer Sci.* 102:569-577, 2011.
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
 4. 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, 2012/5/17
 5. 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
 6. 湯地晃一郎、東條有伸、他. 「Possible association between acute myelogenous