

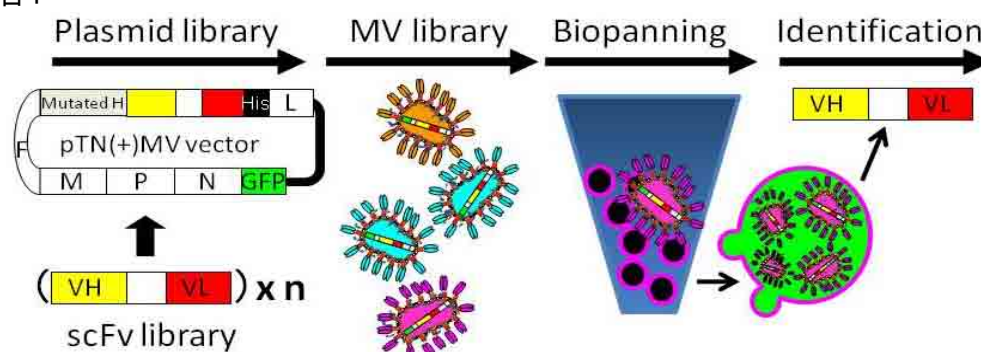
## 研究課題別評価書

1. 研究課題名  
RNA ゲノムを用いた悪性腫瘍の診断・治療法の開発

2. 氏名  
中村 貴史

3. 研究のねらい  
癌は日本における死亡原因で最も多い病気であり、特に現行の治療法に対して極めて高い抵抗性を示す難治性悪性腫瘍の早期診断法、および新規治療法の確立が望まれている。そこで本研究では、RNAとウイルスの特性に着目し、1)RNAをゲノムとしてもつ弱毒化麻疹ウイルスに一本鎖抗体を提示させた革新的抗体ディスプレイライブラリーを構築し、その技術を用いて新規抗体医薬の開発を目指す。2)純国産ワクシニアウイルスワクチン株ゲノムに特定のマイクロ RNA 標的配列を挿入したマイクロ RNA 制御増殖型ワクシニアウイルスを構築し、癌細胞のみを破壊する新規癌ウイルス療法の開発を目指す。

4. 研究成果  
研究項目 1



麻疹ウイルスの特性を利用した Virobody ライブラリー開発の概略

### A麻疹ウイルスに一本鎖抗体を提示させた革新的抗体ディスプレイライブラリーの構築

弱毒化麻疹ウイルスのリバースジェネティクス法により、一本鎖抗体(scFv)をウイルス表面H蛋白上に提示し、かつ元来のウイルス親和性を排除することによって、scFvが持っている特異性と親和性を介して特定の標的腫瘍細胞にのみ感染させる技術を開発した。そこで、このテクノロジーを応用し、ウイルスにscFvを提示させた革新的ディスプレイライブラリー、“ウイルス(Virus) + 抗体ライブラリー(Antibody Library) = ビロボディライブラリー(Virobody Library)”を構築する。

最初に、より多様性の高いscFv提示麻疹ウイルスライブラリーを調整するため、より効率の良いプラスミドライブラリーの構築法と、リバースジェネティクスによるウイルスレスキュー法を最適化する必要があった。従来のライゲーション反応によるプラスミドライブラリーの構築では、目的とするプラスミドの獲得効率が悪く、同時に不安定なものであった。そこでλファージの部位特異的組換え反応を利用したプラスミドライブラリーの構築法の開発を試みた。その結果、この構築法では、非常に効率よく、安定して目的とするプラスミドを獲得することが可能となった。一方、従来の麻疹蛋白発現ヘルパー細胞を用いたリバースジェネティクスによるウイルス回収は非常に低い効率であった。この問題を解決するため、非増殖型T7ポリメラーゼ発現5型アデノウイルス(Ad5-T7)、又は非増殖型T7ポリメラーゼ発現ワクシニアウイルスDIs株(DIs-T7)を構築し、Ad5-T7、又はDIs-T7を293-αHis細胞に感染後、この感染細

胞へ麻疹ウイルス感染性cDNAとT7プロモーター下にあるウイルス蛋白発現ヘルパープラスミドをトランスフェクションし、その2日後にVero- $\alpha$ His細胞を加えた。その結果、レスキュー効率は大幅に向上し、1cm<sup>2</sup>あたり1x10<sup>4</sup>TCID50 というウイルス産生に達した。

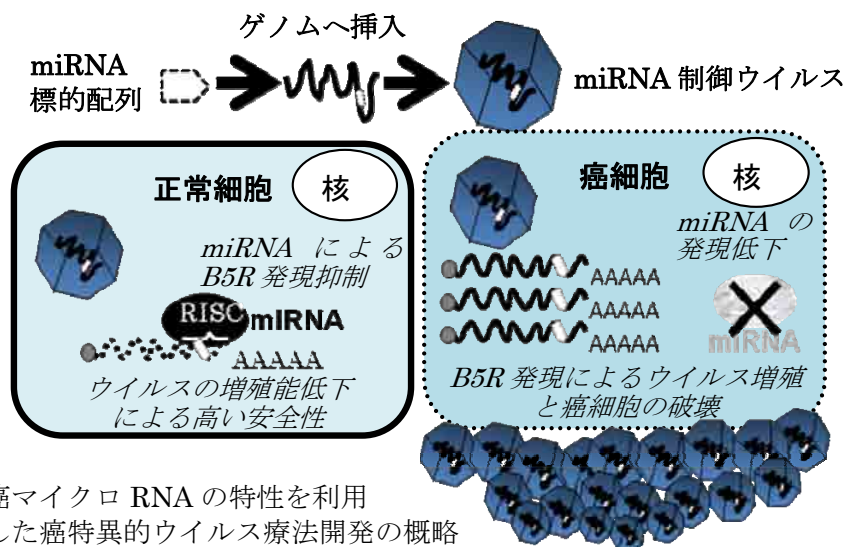
### B麻疹抗体ディスプレイライブラリーからの癌特異的抗体スクリーニング

上皮成長因子受容体(EGFR)、又はユビキチンに対する既知の scFv を、それぞれ麻疹ウイルスゲノムに挿入したプラスミドを構築し、さらに前者には緑色蛍光タンパク質(GFP)を、後者には赤色蛍光タンパク質(DsRed)を、ウイルス感染細胞において発現するように麻疹ウイルスゲノムへ挿入した。そして、各プラスミド(EGFR: ユビキチン)を1:1から1:1000の割合で混合し、上述 A で開発したリバースジェネティクス法にて麻疹ウイルスをレスキュー、増殖させた。その各ウイルスライブラリーをEGFR 発現腫瘍細胞(ヒト乳癌細胞 MDA-MB231)に直接感染させてバイオパニングを行った。その結果、1:1からのライブラリーでは、MDA-MB231 細胞において広範な GFP 発現と細胞融合が観察されたが、DsRed 発現を伴う細胞融合は見られなかった。一方1:1000のライブラリーにおいても、1:1と比べると顕著に少なかったが、GFP 発現と細胞融合は確認された。

次に、GFP 発現と細胞融合が見られたウイルスプラークより、ウイルス RNA を回収し、RT-PCR 法により scFv 遺伝子を増幅し、クローニング後、scFv 遺伝子のシーケンスを行った。その結果、10クローン中、7個が EGFR scFv であった。これらの結果より、ユビキチンを介してのみ感染する麻疹ウイルスの中に、1:1000という割合で、ごく少量含まれているEGFR を介してのみ感染する麻疹ウイルスも、その標的分子 EGFR を発現している腫瘍細胞でのバイオパニングによって簡単に分離できることを確認した。

上述Aで開発したプラスミド構築法より、イギリスGeneservice Ltdから提供されているヒトscFv合成ライブラリーIとライブラリーJを、それぞれ麻疹ウイルスゲノムに挿入したプラスミドライブラリーを構築した。IとJを合わせた麻疹ゲノムscFvライブラリーサイズ は、約5x10<sup>6</sup>であった。このプラスミドライブラリーから麻疹ウイルスライブラリーを構築し、ヒト膵臓癌Panc1細胞に感染させてバイオパニングを行った。しかしながら、同定されたscFv抗体の親和性は抗体単体として機能するほど高くはなかった。そこで、複数ドナーの新鮮な末梢血リンパ球から合成したcDNAよりscFv遺伝子ライブラリーを調整し、これらを提示する麻疹ウイルスライブラリーによるバイオパニング、癌特異的抗体の同定を試みている。

### 研究項目2



## A癌細胞のみを特異的に破壊するマイクロRNA制御増殖型ワクシニアウイルスの構築

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、および臨床治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（腫瘍溶解性）を利用する新しい癌治療法である。純国産ワクシニアウイルス LC16m8 は、B5R 遺伝子にフレームシフト変異が見られ、この蛋白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弱毒化ワクチン株である。一方、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を見出してきた。これより、癌細胞では B5R を発現するが、正常細胞では B5R を発現しないように LC16m8 を改良できれば、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療法になり得る。

そこで、正常細胞と癌細胞におけるマイクロ RNA(miRNA)の発現プロファイリングにより、正常細胞に比べて、肺癌、膵臓癌、およびメラノーマなどの癌細胞で発現が低下している let7a miRNA に注目した。相同組換え法を用いて、LC16m8 株からその変異 B5R 遺伝子を完全に欠失させたウイルス LC16m8 Δ に、全長 B5R 遺伝子を再挿入し、その遺伝子の 3' 非翻訳領域(UTR)に miRNA の標的配列(22塩基)を4回繰り返して挿入した。

この let7a miRNA 制御増殖型ワクシニアウイルスは、let7a 高発現 Hela 細胞において B5R の発現が低下し、そのウイルス増殖と殺細胞効果は B5R 遺伝子欠失 LC16m8 Δ と同等であった。一方 let7a 低発現 A549 細胞では、B5R の高発現と、それに伴うウイルス増殖と殺細胞効果の増強が見られた。さらに、let7a が結合できないよう標的配列に変異を加えた場合、let7a の発現に関わらず両方の細胞で同等のウイルス増殖・殺細胞効果を示した。また、Hela 細胞の let7a を Decoy RNA によって特異的にノックダウンした Hela-let7ako 細胞への感染では、let7a 発現 Hela-NC 細胞で抑制された B5R の発現が回復し、それに伴うウイルス増殖と殺細胞効果を示した。

以上より、この miRNA 制御型ウイルスでは、let7a マイクロ RNA 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、癌細胞では miRNA が低下しているので、癌特異的に B5R を発現することを証明した。

## BマイクロRNA制御増殖型ワクシニアウイルスの抗癌作用と安全性

5 × 10<sup>6</sup>個のヒト膵臓癌細胞株 BxPC3 を免疫不全ヌードマウスの右腹側の皮下に移植し、その腫瘍直径が約 0.6cm に到達した時、10<sup>7</sup>pfu のウイルスを腫瘍内に 0 日、3 日、6 日目と合計 3 回投与した(各群 5 匹)。let7a miRNA 制御増殖型ワクシニアウイルス(LC16m8 Δ -B5R<sub>let7a</sub>/LG)は、LC16m8 の親株で B5R が機能するウイルス(LC16mO/LG)、及び let7a miRNA の標的配列に変異をもつウイルス(LC16m8 Δ -B5R<sub>let7a mut</sub>/LG)と同等に、強力な抗癌作用を示した(図1上)。しかしながら、LC16mO/LG、又は LC16m8 Δ -B5R<sub>let7a mut</sub>/LG を投与マウスでは、治療 60 日後までに急激な体重減少によって全てのマウスが死亡した。それに対し LC16m8 Δ -B5R<sub>let7a</sub>/LG 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、100% のマウスが生存していた(図1下)。

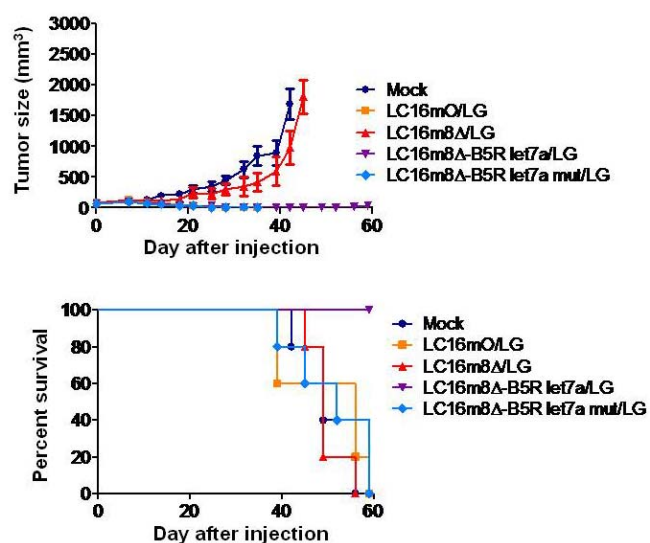


図1 BxPC3 担癌マウスに対する癌ウイルス療法 (上図；腫瘍増殖曲線、下図；生存曲線)

次に、このBxPC3 担癌マウスにおいて27日、52日後にルシフェリンを投与して、ウイルス感染・増殖細胞を非侵襲的にモニターした。LC16mO/LG と LC16m8  $\Delta$ -B5R<sub>let7a mut</sub>/LGの投与マウスでは、27日後に全身の正常組織でウイルス増殖が見られ、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LC16m8  $\Delta$ -B5R<sub>let7a</sub> /LGの投与マウスでは、27日後のウイルス増殖は移植した癌細胞のみに局限し、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見られなかった。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2)。

以上の結果より、マイクロRNA制御ワクシニアウイルスは、癌細胞では 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となった。

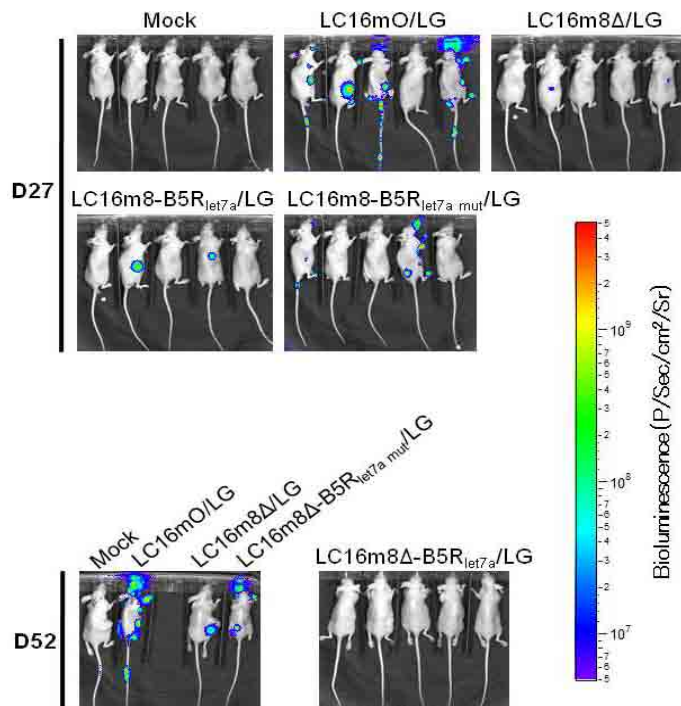


図2 let7a 制御ウイルスの腫瘍特異的増殖性 (各ウイルスは、感染細胞内でルシフェラーゼを発現するので、ウイルス投与 27、52 日後における BxPC3 担癌マウス体内のウイルス分布をルシフェリンの投与によって非侵襲的にモニターした。増殖ウイルス数は赤色ほど多く、紫色ほど少ないことを示す。)

## 5. 自己評価

研究項目1に関しては、当初の目標に対して50%程度の達成率であるが、同時に問題点とその解決策を研究期間内で見いだしていることより、それらは今後の展開として取り組んでいく。一方、研究項目2に関しては、当初の目標に対して100%の達成率であり、今後は臨床応用を視野に入れた研究へと発展させる。

## 6. 研究総括の見解

難治性悪性腫瘍の早期診断法および新規治療法の確立を目指し、RNA とウイルスの特性を活用することが目的である。まず RNA をゲノムとして持つ弱毒化麻疹ウイルスに一本鎖抗体を提示させた抗体ディスプレイライブラリーを構築し、新規抗体医薬の開発を目指した。第2に、ワクシニアウイルスワクチン株ゲノムに特定のマイクロ RNA 標的配列を挿入し、癌細胞のみを破壊する新規癌ウイルス療法の開発を目指した。第1の開発計画は、抗体ライブラリーの性能故に難航したが、ライブラリーを換えることにより進行し始めた。これからも進めて欲しい。第2の開発計画は大変順調に進行している。LC16m8 株は、B5R 遺伝子に変異があり、正常細胞での増殖性が著しく減弱している。B5R はウイルスの弱毒化だけでなく、腫瘍溶解性とも関係している。そこで、本研究では、ウイルスを、癌細胞では B5R を発現するが、正

常細胞では B5R を発現しないように改良した。肺癌、膵臓癌、メラノーマなどの癌細胞で発現が低下している let7a miRNA に注目し、この miRNA の標的配列 (22塩基) を B5R 遺伝子の 3' UTR に挿入した。この組換えワクシニアウイルスは、let7a miRNA の低下している癌細胞では B5RmRNA の分解は起こらず、したがって癌細胞は溶解するが、正常細胞では B5RmRNA の分解が起こり細胞は破壊されない。良く考えられた見事な実験であり、ウイルスを使いこなしている点は、賞賛に値する。

## 7. 主な論文等

### A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

#### ①論文

1. Meng X, Nakamura T, Okazaki T, Inoue H, Takahashi A, Miyamoto S, Sakaguchi G, Eto M, Naito S, Takeda M, Yanagi Y, Tani K. Enhanced Antitumor Effects of an Engineered Measles Virus Edmonston Strain Expressing the Wild-type N, P, L Genes on Human Renal Cell Carcinoma. *Mol. Ther.* 2010 Mar;18(3):544-51.

#### ②特許

研究期間累積件数: 1件

発明者: 中村貴史、引地美奈、木所 稔、志田 壽利、田原秀晃

発明の名称: マイクロ RNA 制御組換えワクシニアウイルスおよびその使用

出願人: 東京大学、国立感染症研究所、北海道大学

出願日: 2010年4月9日

出願番号: 特願 2010-090662

### B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

#### ①論文

2. Takeda M, Ohno S, Tahara M, Takeuchi H, Shirogane Y, Ohmura H, Nakamura T, Yanagi Y. Measles viruses possessing the polymerase protein genes of the Edmonston vaccine strain exhibit attenuated gene expression and growth in cultured cells and SLAM-knockin mice. *J. Virol.*, 2008 Dec;82(23):11979-84.
3. Hasegawa K, Hu C, Nakamura T, Marks JD, Russell SJ, Peng KW. Affinity thresholds for membrane fusion triggering by viral glycoproteins. *J. Virol.*, 2007 Dec; 81(23):13149-57.
4. Wei J, Wahl J, Nakamura T, Stiller D, Mertens T, Hampl W, Debatin KM, Beltinger C. Targeted release of oncolytic measles virus by blood outgrowth endothelial cells in situ inhibits orthotopic gliomas. *Gene Therapy*, 2007 Nov;14(22):1573-86.
5. Wei J, Wahl J, Nakamura T, Stiller D, Mertens T, Hampl W, Debatin KM, Beltinger C. Targeted release of oncolytic measles virus by blood outgrowth endothelial cells in situ inhibits orthotopic gliomas. *Gene Therapy*, 2007 Nov;14(22):1573-86.

#### ②特許

研究期間累積件数: 1件

発明者: 押村光雄、香月康宏、加藤基伸、中村貴史、松岡隆之

発明の名称: 高効率のマイクロセル融合法

出願人: 鳥取大学、東京大学、株式会社 chromocenter

出願日: 2010年3月3日

出願番号: 特願 2010-047109

③著書

1. Nakamura T, Russell SJ. Chapter 31 of Rescue and Propagation of Tropism-modified Measles Viruses. Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA, A Laboratory Manual, editors: Theodore Friedmann & John Rossi. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2007; 371-380.
2. Nakamura T, Russell SJ. Chapter 18 of Engineering Oncolytic Measles Viruses for Targeted Cancer Therapy. Molecular Targeting in oncology, editors: Kaufman, Howard L.; Wadler, Scott; Antman, Karen. Humana Press 2008; 431-445.