

中央図書館



四肢悪性腫瘍に対する新しい殺腫瘍ウイルス・デリバリー・システムの開発

18591633

平成18年度～平成19年度 科学研究費補助金（基盤研究(C)）研究成果報告書

平成20年3月

研究代表者 久保忠彦

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 助教



はしがき

殺腫瘍ウイルス (oncolytic virus) は腫瘍細胞のみで選択的に複製、増殖し、細胞傷害性を有するウイルスで、従来の化学療法、放射線療法などと交差耐性のない高い治療効果が期待されています。今回、われわれは、その一つである vesicular stomatitis virus を用いて悪性骨腫瘍に対する新しい治療法の開発について研究を行いました。

研究組織

研究代表者：久保忠彦 広島大学 大学院医歯薬学総合研究科 助教
研究分担者：越智光夫 広島大学 病院 教授
研究分担者：安永裕司 広島大学 大学院医歯薬学総合研究科 寄附講座教授
研究分担者：坂口剛正 広島大学 大学院医歯薬学総合研究科 准教授
研究分担者：下瀬省二 広島大学 病院 講師

交付決定額（配分額）（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	2,500,000	0	2,500,000
平成19年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	300,000	3,800,000

研究発表

(1) 雑誌論文

論文名：殺腫瘍ウイルス vesicular stomatitis virus の悪性骨腫瘍細胞に対す

る選択的抗腫瘍効果

雑誌名：日本整形外科学会雑誌、81 巻、8 号、S911 頁、2007 年

執筆者名：久保忠彦

共著者：下瀬省二、松尾俊宏、越智光夫

(2) 学会発表

学会名：第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会

浜松市 2007 年 10 月 25, 26 日

演題名：殺腫瘍ウイルス VSV の悪性骨腫瘍細胞に対する選択的抗腫瘍効果

演者名：久保忠彦

共同演者：下瀬省二、松尾俊宏、越智光夫

要旨

【目的】 vesicular stomatitis virus (VSV) および VSV/磁性体リポソーム複合体の悪性骨腫瘍細胞に対する選択性と細胞増殖抑制効果、さらに骨肉腫ラットへの抗腫瘍効果について検討した。【方法】培養骨肉腫細胞 (Saos-2, MG63, MSK) と正常ヒト骨髄細胞 (MSC605, 701) を対象とした。ウイルス感染率：対象細胞に VSV-LacZ を投与し、beta-gal 染色を行い、LacZ 遺伝子の発現率を計測した。ウイルス遺伝子定量：対象細胞に VSV を投与し、培養上澄み液中の VSV genomic RNA 量を real time RT-PCR にて定量解析した。抗腫瘍効果：骨肉腫細胞に各種 Multiplicity of Infection (MOI) で VSV および VSV/磁性体リポソーム複合体を感染させ、経時的に cytotoxicity assay を行い、正常ヒト骨髄細胞への効果と比較検討した。骨肉腫ラットへの抗腫瘍効果：右後肢に骨肉腫細胞 (MSK) を移植後、患側大腿動静脈に人工心肺装置を接続し、VSV-GFP を投与する (Isolated limb perfusion system)。経時的に腫瘍体積、ラット体重を計測した。【結果】 VSV 感染により骨肉腫細胞では高率な LacZ 遺伝子の発現が観察されたが、正常ヒト骨髄細胞では見られなかった。同様に Real time RT-PCR でも骨肉腫細胞では正常ヒト骨髄細胞に比べ、VSV 遺伝子の活発な増殖が確認された。VSV は腫瘍細胞選択性のある殺細胞効果がみられ、その効果は時間、MOI 依存性であった。一方、VSV/磁性体リポソーム複合体では殺細胞効果がみられなかった。骨肉腫ラットに対する Isolated limb perfusion system を用いた VSV 投与により著明な腫瘍増殖抑制効果がみられた。【考察】 Regional therapy が適しているウイルス治療において四肢腫瘍は理想的な標的病変であり、本研究により VSV は四肢腫瘍治療の新たなるストラテジーとなる可能性が示唆された。

背景

多くの悪性骨・軟部腫瘍は抗癌剤・放射線感受性が乏しく、原発巣切除が唯一の治療法となることもしばしば経験する。また、一部の抗癌剤感受性のある腫瘍においても、ここ10年間のより強力な化学療法の試みにもかかわらず、生存率の改善は見られず、特に肺転移のある症例では満足できる結果が得られていない(1-3)。従来の治療に抵抗性の四肢悪性腫瘍に対する新しい治療法の開発が望まれている。

ウイルスを用いた遺伝子治療のアプローチは、進行期悪性腫瘍に対する近未来の治療法として大いに期待されている。なかでも殺腫瘍ウイルス (oncolytic virus) は腫瘍細胞のみで選択的に複製、増殖し、細胞傷害性を有するウイルスで、従来の化学療法、放射線療法などと交差耐性のない治療効果が期待されている。Oncolytic virus には腫瘍細胞のみで増幅するよう遺伝子工学的に組み返られたアデノウイルスやヘルペスウイルスなどの DNA ウイルスと、生来腫瘍細胞のみで増幅する性格を持つレオウイルス、Vesicular stomatitis virus (VSV) などの RNA ウイルスがある。これまで、われわれはその一つである VSV をマウントサイナイ医科大学 (New York, NY) と共同で世界に先駆けて癌治療法として研究し、担癌ラットに対する有効性を報告してきた(4-8)。VSV はラブドウイルス科、ベジクロウイルス属で砲弾型粒子である。これまで広くアメリカ大陸で発生しており口腔内に水疱を生じる家畜伝染病である。豚では重篤となることもあるが、人への感染は稀で、感染例もインフルエンザ様症状が報告されているのみである。VSV は殺腫瘍細胞効果が癌腫で証明され前臨床段階であるが、悪性骨・軟部腫瘍においてまだ報告はない。

現在までウイルス治療が固形腫瘍に広く応用されない理由としてウイルスデ

リバリー法の問題がある。全身投与では宿主免疫反応によるウイルスの早期不活化が臨床応用への大きなハードルとなっている。一方、局所投与では壊死巣、腫瘍細胞間組織などの生物学的バリアーや、局所の抗腫瘍物質などのため、腫瘍内でのウイルスの広がりが不十分であることがわかっている。Isolated regional perfusion 法は標的臓器や四肢に選択的に高濃度の薬剤を投与できる Drug delivery system である。これまで、全身投与では重篤な副作用が生じる サイトカイン治療や温熱化学療法デバイスとして臨床試験が行われ、その有効性が報告されてきている。また、遺伝子治療のデリバリー法としても注目されている(9-11)。

われわれはこれまで磁性体リポソームを抗癌剤キャリアーとした、磁気により誘導される Drug delivery system を構築し、さらに遺伝子治療を目的とした遺伝子導入用磁性体カチオニックリポソームも研究してきた(12-15)。

本研究では、VSVおよびVSV/磁性体リポソーム複合体の悪性骨腫瘍細胞に対する選択性と細胞増殖抑制効果、さらにIsolated regional perfusion法を用いた骨肉腫ラットへの抗腫瘍効果についても検討した。

対象および方法

VSVおよび遺伝子組み換えVSVの作成

VSVはP3Aレベル動物接種実験(大臣確認実験)のため広島大学組換えDNA実験安全委員会と文部科学大臣から広島大学自然科学研究支援センター・動物実験施設5階感染区・遺伝子導入区での使用承認を受け使用した。

VSVゲノムDNA(pVSV-NX2)をヘルパープラスミドであるpIRES-L、pIRES-N、pIRES-Pと共に、T7 RNA polymeraseを発現するHamster腎由来BHK細胞に導入

して、野生型ウイルス VSV を得る。大腸菌を用いて VSV ゲノム DNA (pVSV-NX2) にオワンクラゲ由来 GFP 相補 DNA を挿入し、全長の DNA を作製する。この DNA をヘルパープラスミドと共に、T7 RNA polymerase を発現する Hamster 腎由来 BHK 細胞に導入して、組換えウイルス VSV-GFP を得る。

VSV/磁性体リポソーム複合体の作成

Phosphatidylethanolamine (DOPE) と cholesterol (DC-cholesterol) より成る脂質二重膜に、酸化鉄微粒子を超音波処理法にて封入し、磁性体カチオンリポソームを作製する。磁性体未封入りポソームは磁気分離により除去する。

この磁性体カチオンリポソームを VSV または VSV-GFP と室温で 30 分間反応させ、VSV or VSV-GFP/磁性体リポソーム複合体を作成する。未結合の VSV は磁気分離により除去する。

骨肉腫細胞に対する VSV の感染効率の評価

ヒト由来培養骨肉腫細胞 (MG-63, Saos-2)、ラット培養骨肉腫細胞 (MSK)、正常ヒト骨髄細胞 (MSC605, 701) に VSV-GFP を投与する。ウイルス感染率は beta-gal 染色を行い、LacZ 遺伝子の発現を観察した。ウイルス遺伝子定量は、培養上澄み液中の VSV genomic RNA 量を real time RT-PCR にて定量解析した。

骨肉腫細胞に対する VSV の抗腫瘍効果の検討

骨肉腫細胞に各種 Multiplicity of Infection (MOI) で VSV および VSV/磁性体リポソーム複合体を感染させ、経時的に cytotoxicity assay を行い、正常ヒト骨髄細胞への効果と比較検討した。

骨肉腫ラットモデルの作製

ネンブタール麻酔下に6週齢F344ラットの右後肢にラット骨肉腫細胞 MSK (1×10^7 cells)を移植した。

Isolated Limb perfusion system の作成

イソフルレン全身麻酔下に腫瘍移植1週間後、手術用顕微鏡を使用し、患側大腿動静脈に24ゲージカテーテルを挿入し、人工心肺装置を接続、その中枢部で駆血を行い、患側下肢血流を体外循環させる。動脈へのポンプ流量は2ml/minとし、静脈からのフローはポンプをラットより低い位置に置き、重力により行った。回路中のリザーバーにて1L/minの酸素化を行った。5単位/mlヘパリン生食にて5分回路を流した後、VSV 1.3×10^7 plaque-forming units をリザーバーより加え15分間循環させた。さらに1分間ヘパリン入り生食で洗い流した。

ラット骨肉腫に対する Isolated Limb perfusionsystem による VSV 治療

Isolated limb perfusion system を用い VSV-GFP を15分間患側下肢に灌流させた。対照群として生食投与群を作成した。経時的に腫瘍体積、ラット体重を計測した。

結果および考察

骨肉腫細胞に対する VSV の感染効率の評価

10^{-3} MOI VSV-LacZ 投与24時間後の骨肉腫細胞ではいずれの cell line も、ほぼ100%感染を生じていた。しかし、正常ヒト骨髄細胞では同濃度の VSV-LacZ 投

与 24 時間後でも LacZ 遺伝子発現細胞はみられなかった (Fig. 1)。

同様に Real time RT-PCR でも骨肉腫細胞では経時的にウイルス遺伝子の指数関数的増幅がみられたが、正常ヒト骨髄細胞では一時的増幅または全く増幅が見られなかった (Fig. 2)。

骨肉腫細胞に対する VSV の抗腫瘍効果の検討

VSV はすべての骨肉腫細胞に対して時間依存性の殺腫瘍細胞効果があったが、正常ヒト骨髄細胞では 10^{-3} MOI の VSV でも 24 時間までの短時間の細胞増殖抑制しかみられなかった (Fig. 3)。これを濃度で検討すると、正常骨髄細胞に対する細胞毒性は弱く、骨肉腫細胞と同等の抑制効果を得るために一万倍以上のウイルス濃度が必要であった (Fig. 4)。

以上より本研究により腫瘍細胞選択性のある殺細胞効果がみられ、その効果は時間、MOI 依存性であった。

一方、VSV/磁性体リポソーム複合体ではいずれの細胞においても殺細胞効果がみられなかった。これは、VSV/磁性体リポソーム複合体作成過程におけるエバポレーション処理、超音波処理、またはその処理過程で発生する発熱によりウイルスの不活化が生じたものと考えられた。今後、われわれが新しく磁気ターゲティング法として研究している磁性細胞を用い (16-19)、VSV ウイルスデリバリーシステムの構築を展開する予定である。

ラット骨肉腫に対する Isolated Limb perfusion 法による VSV 治療

Isolated limb perfusion system (Fig. 5) による VSV 治療 4 週後の腫瘍体積はコントロール群に比べ、有意に治療効果を認めた ($P < 0.01$)。また、体重減少

などの副作用もみとめなかった (Fig. 6)。

Oncolytic virotherapy の臨床試験では、遺伝子治療用ベクターとして基礎データが豊富な DNA ウイルスであるアデノウイルスが中心に行われている。いずれも Phase I or II study で、安全性についてはほぼ確認されているが、有効性についてはまだ未知数である (20)。特に VSV に関してまだ報告がないが、RNA ウイルスは DNA ウイルスに比べ腫瘍細胞内における高い増幅性から oncolytic virotherapy に適していると期待されている。

臨床応用に向けた oncolytic virotherapy の課題として、ウイルスデリバリー、感染効率、生体免疫反応、ウイルス毒性の問題がある。特に全身投与では抗体、細胞性免疫の問題が大きなハードルになっており、現在のデリバリー技術では局所投与または臓器投与が適している。その点、四肢悪性腫瘍の原発巣は理想的な病変と考えられる。

本研究により骨肉腫細胞に対する VSV の選択的ウイルス増幅、殺腫瘍効果が証明され、Isolated limb perfusion system によるウイルスデリバリーシステムも構築された。Regional therapy が適しているウイルス治療において四肢悪性腫瘍は理想的な標的病変であり、VSV は四肢腫瘍治療の新たな戦略となる可能性が示唆された。

文献

1. Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol* 2002;20:776-90.
2. Rodriguez-Galindo C, Spunt SL, Pappo AS. Treatment of Ewing sarcoma family of tumors: current status and outlook for the future. *Med Pediatr Oncol* 2003;40:276-87.
3. Rizzo M, Ghert MA, Harrelson JM, Scully SP. Chondrosarcoma of bone: analysis of 108 cases and evaluation for predictors of outcome. *Clin Orthop* 2001;391:224-33.
4. Shinozaki K, Ebert O, Suriawinata A, Thung SN, Woo SL. Prophylactic alpha interferon treatment increases the therapeutic index of oncolytic vesicular stomatitis virus virotherapy for advanced hepatocellular carcinoma in immune-competent rats. *J Virol*. 2005 Nov;79(21):13705-13.
5. Shinozaki K, Suominen E, Carrick F, Sauter B, Kähäri VM, Lieber A, Woo SL, Savontaus M. Efficient infection of tumor endothelial cells by a capsid-modified adenovirus. *Gene Ther*. 2006 Jan;13(1):52-9.
6. Shinozaki K, Ebert O, Woo SL. Eradication of advanced hepatocellular carcinoma in rats via repeated hepatic arterial infusions of recombinant VSV. *Hepatology*. 2005 Jan;41(1):196-203.
7. Shinozaki K, Ebert O, Woo SL. Treatment of multi-focal colorectal

- carcinoma metastatic to the liver of immune-competent and syngeneic rats by hepatic artery infusion of oncolytic vesicular stomatitis virus. *Int J Cancer*. 2005 Apr 20;114(4):659-64.
8. Ebert O, Shinozaki K, Kournioti C, Park MS, García-Sastre A, Woo SL. Syncytia induction enhances the oncolytic potential of vesicular stomatitis virus in virotherapy for cancer. *Cancer Res*. 2004 May 1;64(9):3265-70.
 9. Eggermont AM, de Wilt JH, ten Hagen TL: Current uses of isolated limb perfusion in the clinic and a model system for new strategies. *Lancet Oncol*. 4(7):429-37, 2003.
 10. Abe S, Tokizaki T, Miki Y, Tateishi A, Ogawa K, Nakano H, Matsushita T: Hyperthermic isolated regional perfusion with CDDP for bone and soft-tissue sarcoma of the lower limb: pharmacokinetics, thermal dose, toxicity, and feasibility. *Cancer Chemother Pharmacol*. 56(1):55-62, 2005.
 11. van Etten B, Eggermont AM, van Tiel ST, Ambagtsheer G, de Wilt JH, ten Hagen TL: Gene therapy in in vivo isolated perfusion models. *Curr Gene Ther*. 5(2):195-202, 2005.
 12. Nobuto H, Sugita T, Kubo T, Shimose S, Yasunaga Y, Murakami T, Ochi M: Evaluation of systemic chemotherapy with magnetic liposomal doxorubicin and a dipole external electromagnet. *Int J Cancer*. 109(4):627-35, 2004.
 13. Hirao K, Sugita T, Kubo T, Igarashi K, Tanimoto K, Murakami T, Yasunaga

- Y, Ochi M: Targeted gene delivery to human osteosarcoma cells with magnetic cationic liposomes under a magnetic field. *Int J Oncol.* 22(5):1065-71, 2003.
14. Kubo T, Sugita T, Shimose S, Nitta Y, Ikuta Y, Murakami T. Targeted systemic chemotherapy using magnetic liposomes with incorporated adriamycin for osteosarcoma in hamsters. *Int J Oncol.* 2001 Jan;18(1):121-5.
15. Kubo T, Sugita T, Shimose S, Nitta Y, Ikuta Y, Murakami T. Targeted delivery of anticancer drugs with intravenously administered magnetic liposomes in osteosarcoma-bearing hamsters. *Int J Oncol.* 2000 Aug;17(2):309-15.
16. Nakashima Y, Deie M, Yanada S, Sharman P, Ochi M. Magnetically labeled human natural killer cells, accumulated in vitro by an external magnetic force, are effective against HOS osteosarcoma cells. *Int J Oncol.* 2005 Oct;27(4):965-71.
17. Sugioka T, Ochi M, Yasunaga Y, Adachi N, Yanada S. Accumulation of magnetically labeled rat mesenchymal stem cells using an external magnetic force, and their potential for bone regeneration. *J Biomed Mater Res A.* 2007 Sep 5
18. Nishida K, Tanaka N, Nakanishi K, Kamei N, Hamasaki T, Yanada S, Mochizuki Y, Ochi M. Magnetic targeting of bone marrow stromal cells into spinal cord: through cerebrospinal fluid. *Neuroreport.* 2006 Aug 21;17(12):1269-72.

19. Kobayashi T, Ochi M, Yanada S, Ishikawa M, Adachi N, Deie M, Arihiro K. A novel cell delivery system using magnetically labeled mesenchymal stem cells and an external magnetic device for clinical cartilage repair. *Arthroscopy*. 2008 Jan;24(1):69-76. Epub 2007 Nov 28.
20. Giedlin MA, Cook DN, Dubensky TW Jr. Vesicular stomatitis virus: an exciting new therapeutic oncolytic virus candidate for cancer or just another chapter from Field's Virology? *Cancer Cell*. 2003 Oct;4(4):241-3

図説明文

Fig. 1 骨肉腫細胞 (A, B, C) 、正常ヒト骨髄細胞 (D, E) に対するウイルス感染率 (beta-gal x40)

Fig. 2 ウイルス遺伝子定量

横軸はウイルス投与後時間、縦軸はコントロールとして用いた正常ヒト骨髄細胞MSC701の6時間値を1とした相対的ウイルスRNA量をlog表示。

Data are mean \pm SD (n = 3 wells).

Fig. 3 骨肉腫細胞 (A, B, C) 、正常ヒト骨髄細胞 (D, E) に対するVSVの経時的細胞増殖抑制曲線

縦軸は未治療細胞と比較した相対的生細胞数。

Data are mean \pm SD (n = 4 wells).

Fig. 4 VSVの濃度別細胞増殖抑制曲線

縦軸は未治療細胞と比較した相対的生細胞数。

Data are mean \pm SD (n = 4 wells).

Fig. 5 Isolated limb perfusion system

Fig. 6 ラット骨肉腫に対する VSV の抗腫瘍効果 (A) とラット体重 (B) およびその典型例 (C, D)

Data are mean \pm SD obtained from 4 athymic mice. $P < 0.01$, Student's t-test.

Fig. 1.

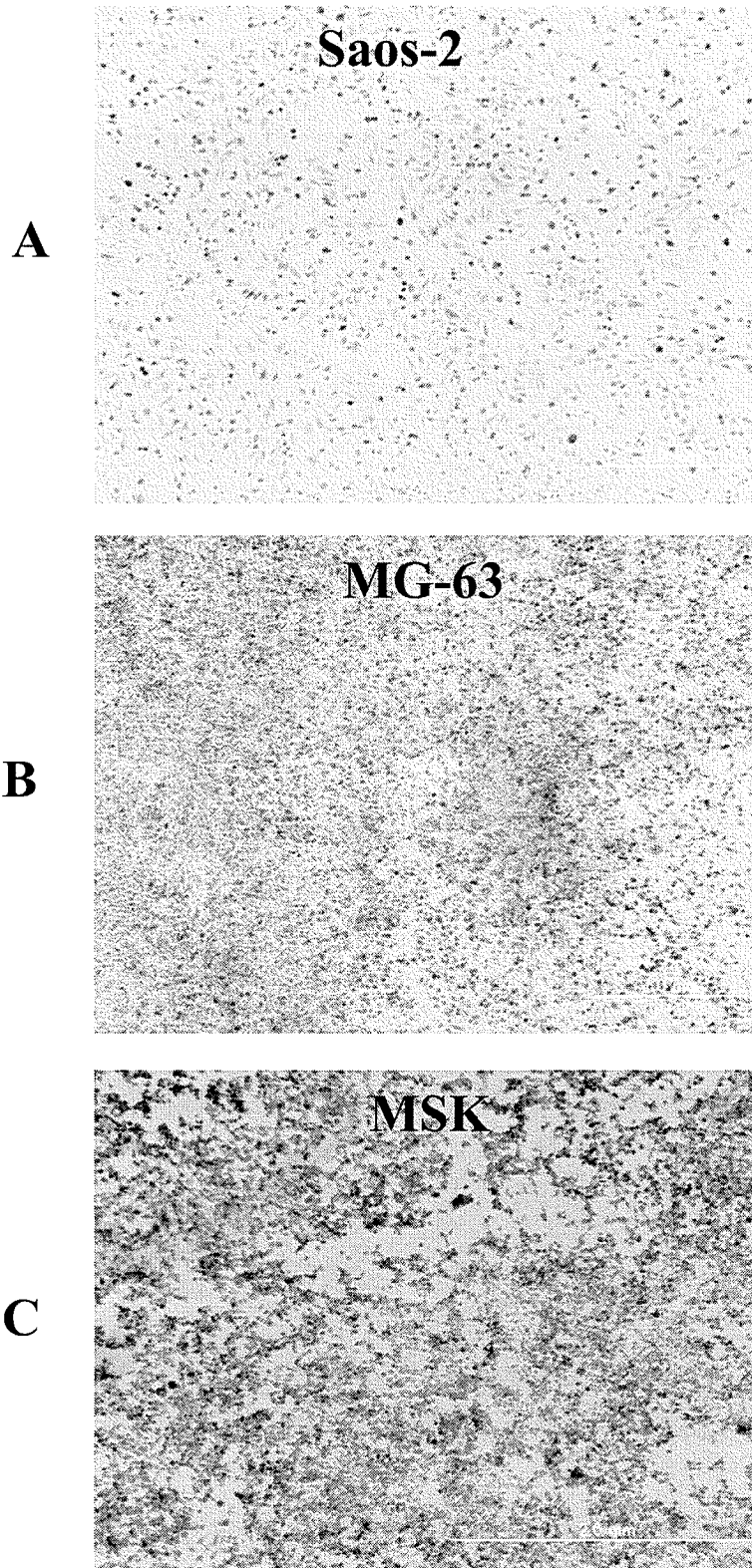


Fig. 1.

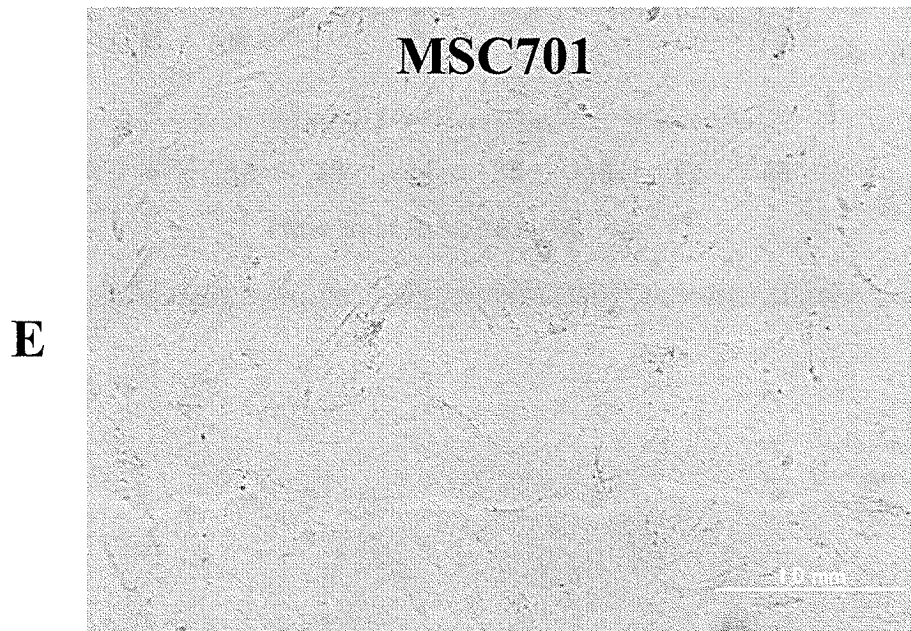
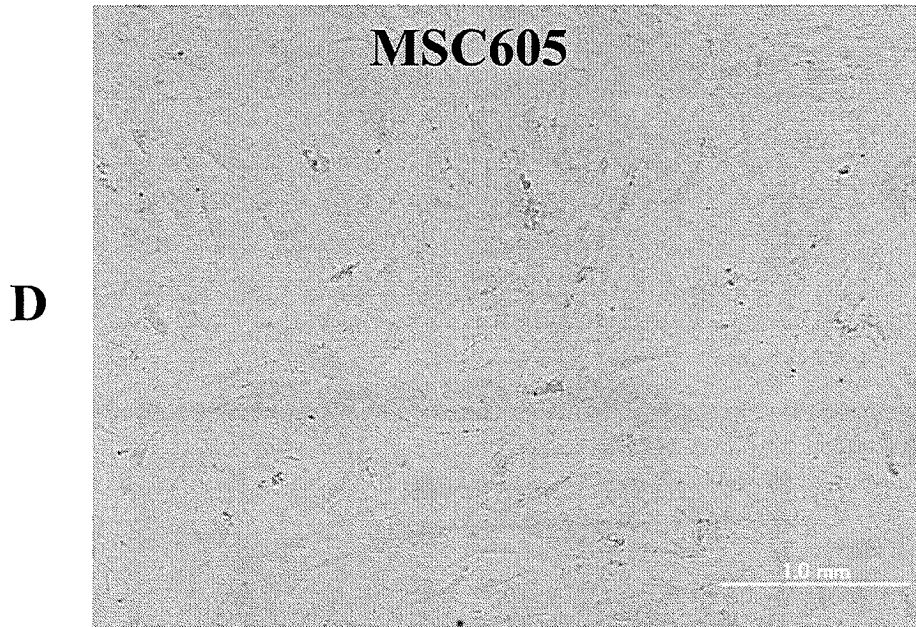


Fig. 2.

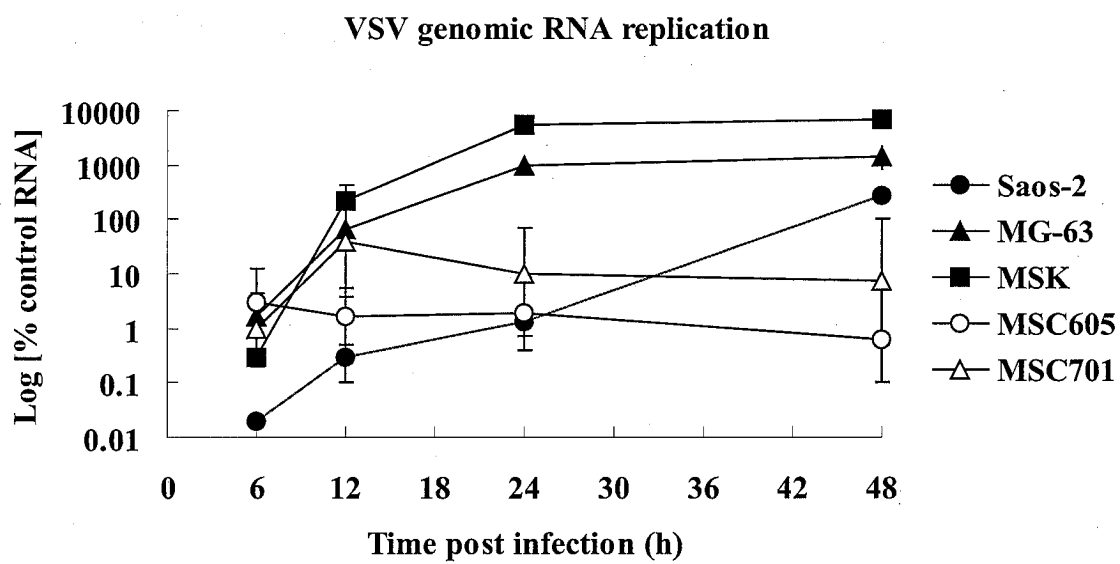


Fig. 3.

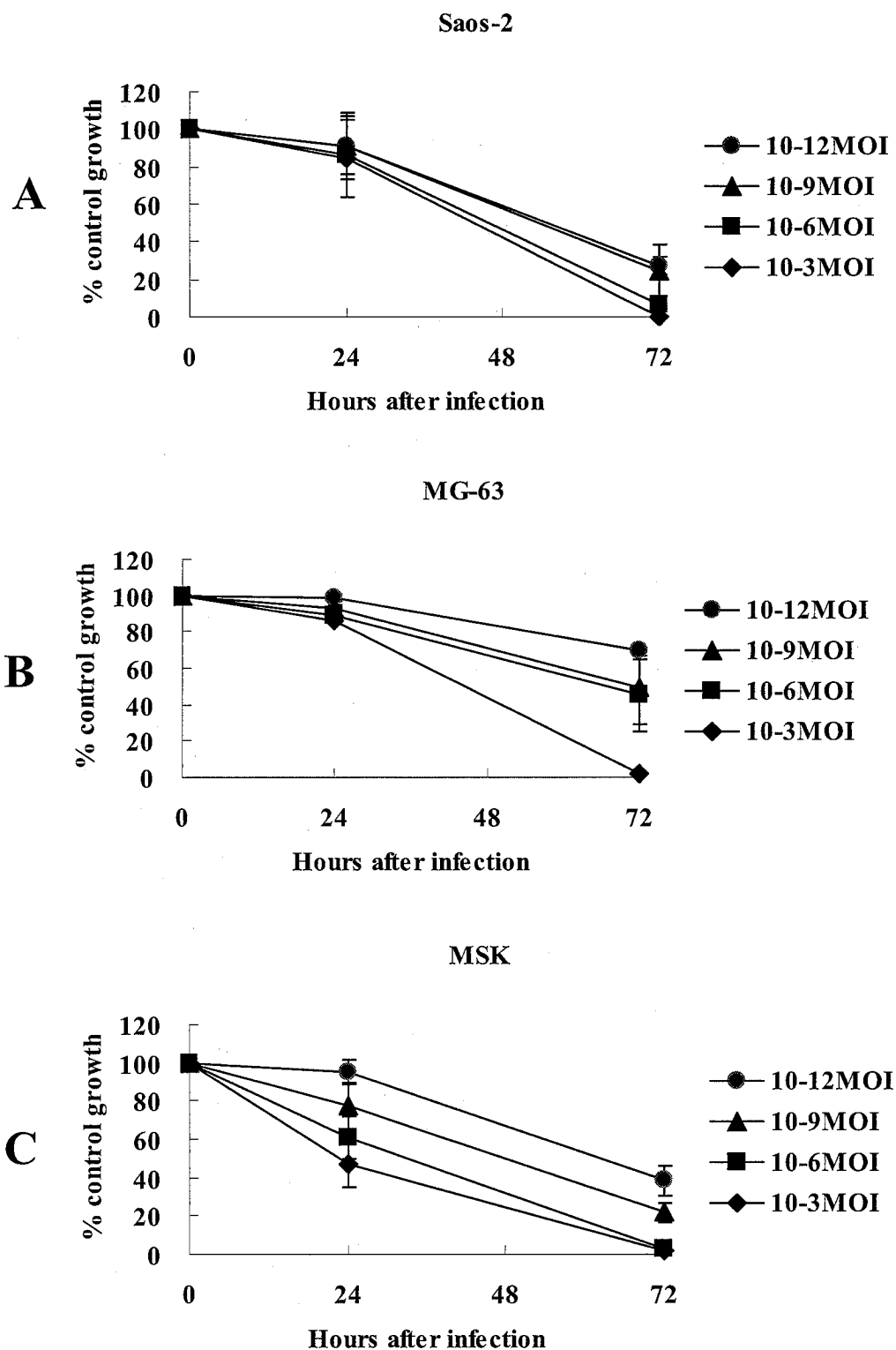


Fig. 3.

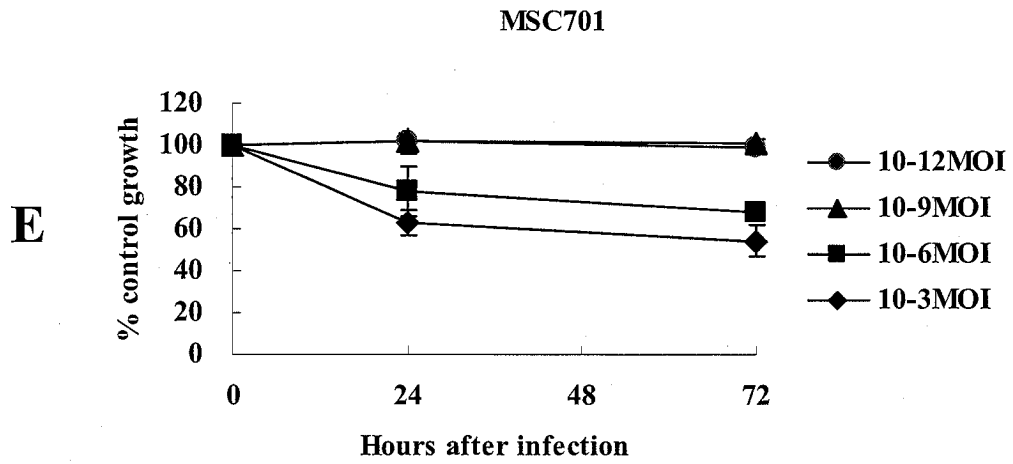
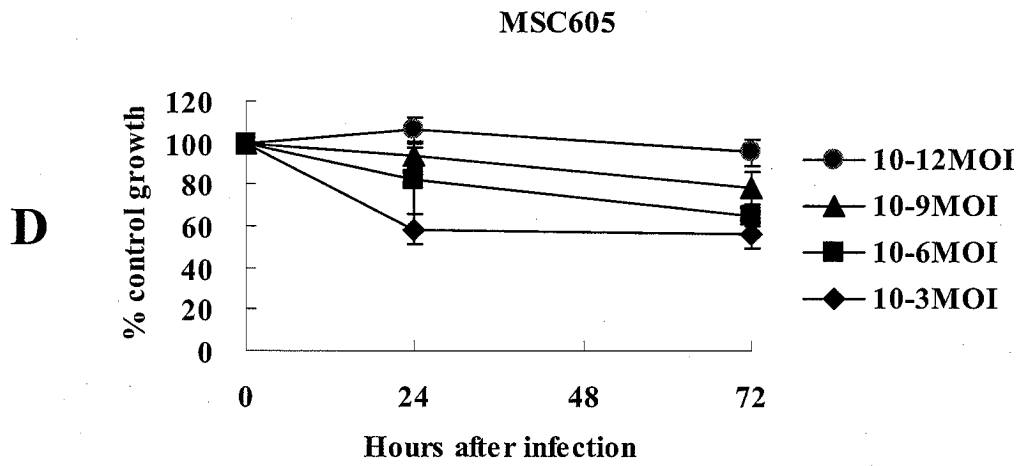


Fig. 4.

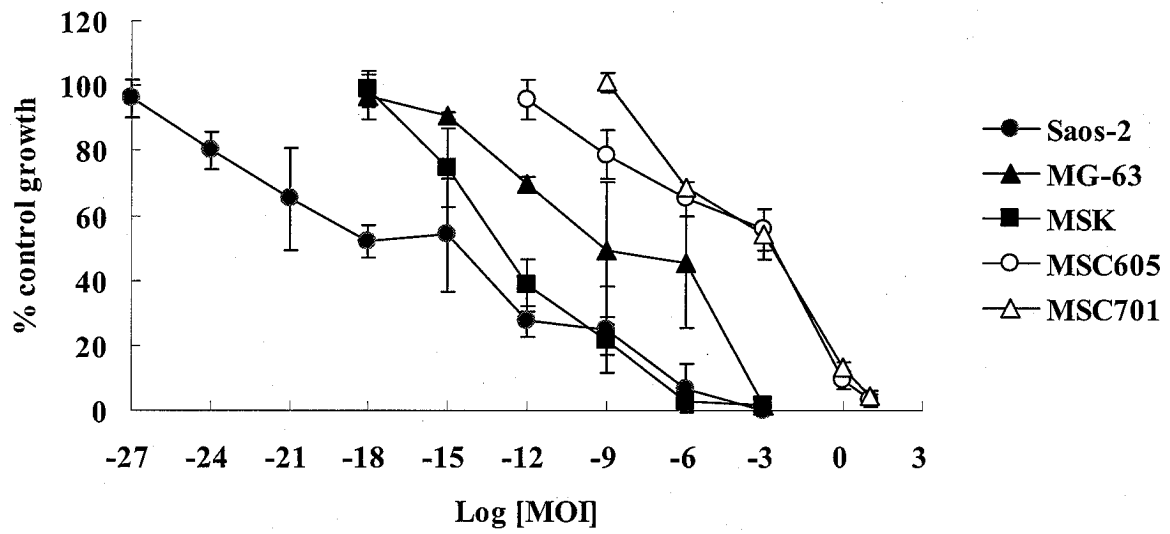


Fig. 5.

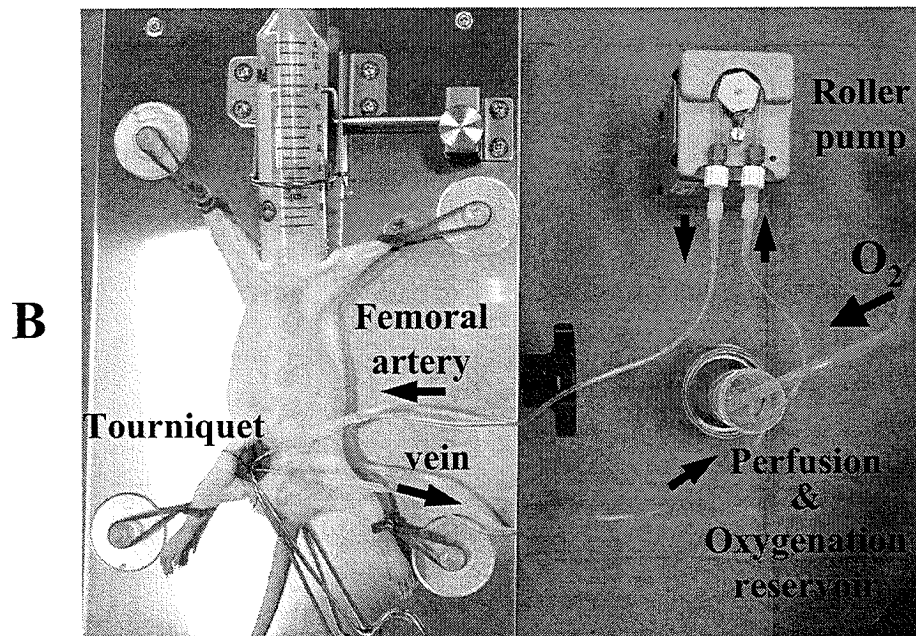
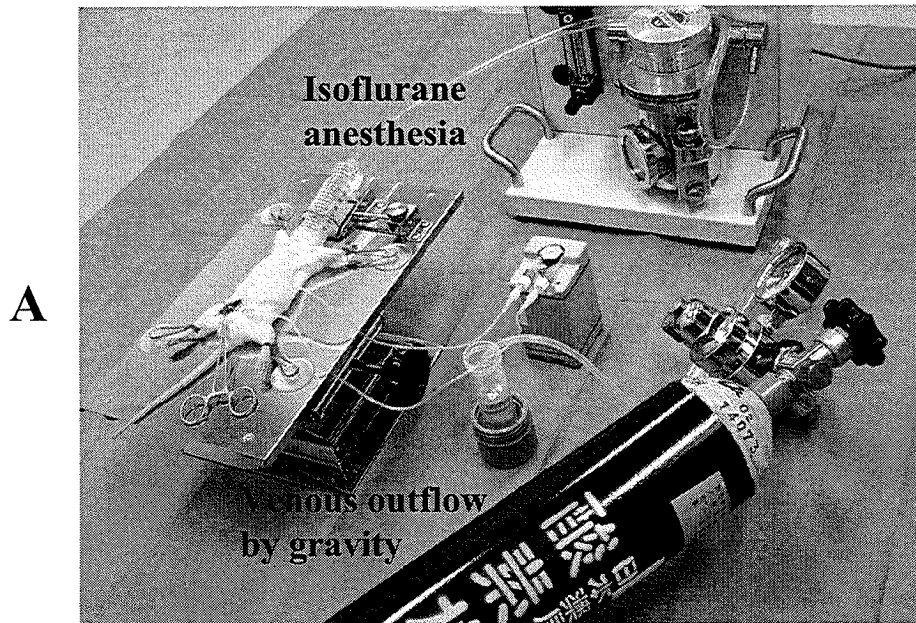


Fig. 6.

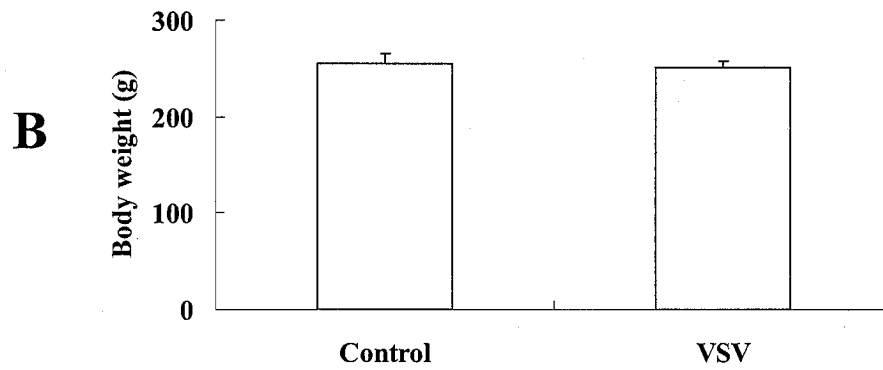
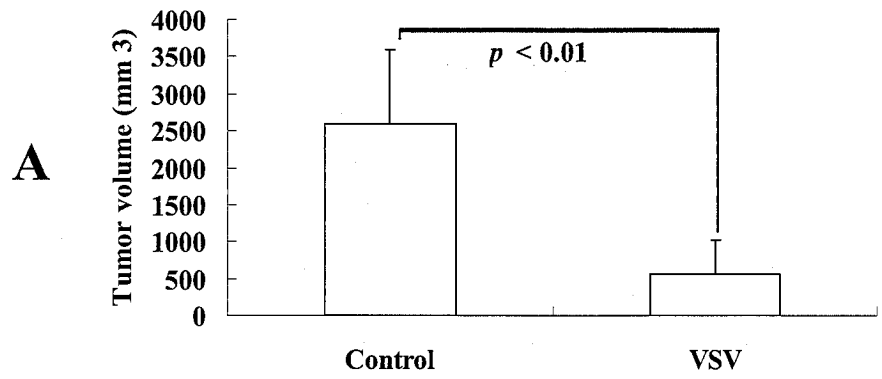


Fig. 6.

