

## 論文内容の要旨

論文題目 麻疹ウイルスを用いた乳癌治療用ベクター開発の基礎的研究

杉山 貴紹

麻疹ウイルス(measles virus; MV)は牛痘ウイルス、イヌジステンパーウイルスなどと共にパラミクソウイルス科・モービリウイルス属に分類され、約 16kb の一本鎖(-)RNA をゲノムに持つウイルスである。当研究室では我が国で分離された MV の野生型株 MV-HL 株の全長ゲノムの cDNA クローンを挿入したプラスミドを作製し、それを元に感染性を持つウイルスを作出する「リバーシジェネティクス系」を確立している。全長ゲノム cDNA の各構造蛋白遺伝子間には制限酵素認識配列が導入してあるため、遺伝子組換えウイルスの作出が容易であり、新型のワクチンやウイルスベクターの開発に有用である。

乳癌は女性のがんの中で患者数が最も多く、年間死亡者数も上位に位置する重要な疾患である。特に転移性の乳癌では従来の治療法に耐性を持つものが多く、新しい治療法の開発が強く求められている。新規癌治療法の一つとして近年、ウイルスを癌細胞に感染させて殺させることにより治癒を図る「ウイルス療法」の開発研究が国際的にも著しく進展しており、前臨床研究、および臨床試験が積極的に行われている。MV は、レトロウイルスやアデノウイルスと異なりその生活環が細胞質に局限されており、複製の過程で DNA に逆転写されることもないため宿主細胞の染色体にウイルス由来の配列が挿入される心配が無い。また病原性に関する研究が進み、ウイルスゲノム上の弱毒化に関わる領域が数多く明らかされてきていることから人工的に遺伝子を改変することによって安全性の高いウイルスベクターが作出できることが期待される。本研究ではリバーシジェネティクス系を用いて、MV を用いた乳癌治療用ベクター開発の基礎的研究を行なった。

MV は免疫系細胞でのみ発現している signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) を主な受容体として利用し、全身のリンパ組織を中心に感染及び増殖して、リンパ球減少と一過的な免疫抑制を引き起こすことが知られている。ヒトの乳癌細胞株は SLAM を発現していないが、筆者は野生型 MV の MV-HL 株が種々の乳癌細胞株(MCF7, MDAMB453, SKBR3)において、SLAM とは別の機構で効率よく感染及び増殖し、最終的に死滅させることを独自に発見した。筆者は MV が元々持つ乳癌細胞への細胞傷害性を治療に応用するという

着想の下、MV 粒子の表面に発現し、受容体と直接結合する表面タンパクであるヘマグルチニン (H) をコードする遺伝子に SLAM を受容体として利用できなくなるアミノ酸変異を導入した組換えウイルス (rMV-SLAMblind) を作出した。組換えウイルス rMV-SLAMblind を培養細胞に感染させたところ、乳癌細胞株への感染性は親株の MV と同等に保っていたが、SLAM 陽性のリンパ球系細胞株への感染性はほぼ完全に失われていた。

過去の研究で行われた麻疹患者や実験的に MV を感染させたサル of 病理学的解析から、MV はリンパ指向性が強く、体内での増殖部位は SLAM の発現部位とよく相関しており、白血球減少や免疫抑制を始めとする麻疹の主要な病原性は SLAM の利用によって説明できることが示唆されていた。このことから、筆者は SLAM を利用できない rMV-SLAMblind は *in vivo* において弱毒化され、病原性を失うと予想した。一方で、乳癌細胞株への *in vitro* での傷害性は親株の MV と同等に保たれていたことから、rMV-SLAMblind は新規乳癌治療用ベクターの候補として有望なのではないかと考えた。そこで、以下の一連の実験を行い rMV-SLAMblind の乳癌治療用ベクターとしての有用性について検討した。

SLAM 以外の MV 受容体として、現在までに CD46 と PVRL4 (poliovirus receptor-related 4) が同定されている。CD46 は赤血球を除く全てのヒトの細胞表面に発現しており、MV のワクチン株のみの受容体として機能することが知られている。殆どの野性型 MV は CD46 を受容体として利用することができない。一方、PVRL4 は細胞間接着分子で nectin family のメンバーであり、乳癌、卵巣癌、肺癌において発現の亢進が報告されている蛋白である。PVRL4 は野性型株とワクチン株の両方の受容体として機能することが報告されている。両者の発現を flow cytometry で解析したところ、共に乳癌細胞株での発現が検出されたため、これらの分子が MV の乳癌細胞への感染に関与しているかどうかを検討した。まず、抗 CD46 抗体および抗 PVRL4 抗体を用いて、rMV-SLAMblind の乳癌細胞株への感染阻害実験を行った。その結果、rMV-SLAMblind の乳癌細胞株への感染は抗 CD46 抗体では全く阻害できなかったが、抗 PVRL4 抗体によってほぼ完全に阻害されることが分かった。また、MV 非感受性細胞株に CD46 または PVRL4 遺伝子を過剰発現させ、感染実験を行なったところ、CD46 を過剰発現させた場合は対照と比較して rMV-SLAMblind の感染性に全く変化は見られなかったが、PVRL4 を発現させた場合では rMV-SLAMblind の感染性が有意に上昇した。以上の結果から、CD46 は rMV-SLAMblind の受容体としては機能せず、PVRL4 が乳癌細胞への感染に関与していることが示唆された。

次に rMV-SLAMblind のヒト正常細胞への *in vitro* での感染性を検討した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、ヒト皮膚繊維芽細胞 (NHDF) およびヒト乳腺上皮細胞 (HMEC) を用いて感染実験を行ったところ、対照のワクチン株である rMV-Edmonston は CD46 を介して効率よく感染して細胞傷害性を発揮したのに対し、rMV-SLAMblind はこれらの細胞に殆ど感染せず、細胞の生存率にも全く影響を与えなかった。したがって rMV-SLAMblind はユビキタスに発現している CD46 を利用しないことから CD46 陽性の正常細胞への非特異的な感染が起こりにくいものと思われた。

rMV-SLAMblind の *in vivo* での抗腫瘍効果を検討するため、SCID (severe combined immune deficiency) マウスの皮下にヒト乳癌細胞株 (MDA-MB-453) を移植し、腫瘍を形成させ治療実験を行なった。rMV-SLAMblind を腫瘍内投与し、投与後の腫瘍の体積を経時的に測定した。その結果、組換えウイルスを腫瘍内投与した群ではウイルスを投与しない群と比較して腫瘍の顕著な縮小または成長の抑制がみられた。また、rMV-SLAMblind 投与群は rMV-Edmonston 投与群と比較した場合でも、顕著に腫瘍の成長が抑制されていることが分かった。したがって rMV-SLAMblind は *in vivo* で抗腫瘍効果を発揮し、それがワクチン株の rMV-Edmonston よりも顕著に高いことが示唆された。

担癌マウスの体内におけるウイルスの局在を調べるため、リバーシジェネティクス系を用いて rMV-SLAMblind のゲノムにレポーターとしてホタルルシフェラーゼ遺伝子を挿入したウイルス (rMV-luc-SLAMblind) を作出した。これを MDA-MB-453 腫瘍を皮下に形成させた担癌マウスに腫瘍内投与した。感染 10 時間後および 1, 2, 4, 7, 14, 21 日後に基質である D-ルシフェリンをマウスに皮下投与し、bioluminescence imaging (BLI) を行った。その結果、ルシフェラーゼによる発光が腫瘍から検出され、それ以外の部位からは発光が検出されなかった。また magnetic resonance imaging (MRI) も行い、BLI の画像データと融合させた。その結果、MRI 画像上での腫瘍と BLI 画像上での発光の領域がよく重なりあっており、ウイルスが腫瘍の内部でのみ特異的に増殖していることが示唆された。また、rMV-luc-SLAMblind の尾静脈投与も行い同様の実験を行なったところ、腫瘍内投与に比べて投与直後の発光強度は低かったものの腫瘍からルシフェラーゼによる発光が検出された。したがって、尾静脈投与でもウイルスが腫瘍に到達できることが示唆された。

rMV-SLAMblind の *in vivo* での安全性を検討するため、カニクイザル 1 匹とアカゲザル 2 匹を用いて、接種実験を行った。カニクイザルとアカゲザルは野性型 MV を感染させると発疹、食欲減退、リンパ球減少、ウイルス血症等の症状を示す麻疹のモデル動物である。麻疹に対する中和抗体を持たないサルに rMV-SLAMblind を皮下接種し、臨床症状 (発疹、下痢、食欲減退) の有無、血中のリンパ球数およびウイルス血症の有無を経時的に測定したところ、野生型麻疹ウイルスの感染で見られるような上記の症状は全く観察されず、rMV-SLAMblind が親株の野性型 MV と比べ、高度に弱毒化されていることが示唆された。

以上の実験から、rMV-SLAMblind は担癌マウスで抗腫瘍効果を発揮する一方で、サルに対しては病原性を失っていることが確認された。また rMV-SLAMblind はユビキタスに発現している CD46 ではなく、PVRL4 を利用して細胞に感染していることから、MV のワクチン株と比較して正常組織への非特異的な感染がより少なく、腫瘍特異性が高い可能性が示唆された。また MV ワクチン株と比べてその抗腫瘍効果は顕著に高かった。したがって、本研究の結果は rMV-SLAMblind が新規乳癌治療用ベクターの有望な候補であることを示唆するものである。

さらに、rMV-SLAMblind は PVRL4 の発現亢進が報告されている卵巣癌、肺癌にも応用できる可能性があるほか、リバーシジェネティクス系を用いてサイトカイン等の治療遺

伝子を発現させることで、より有効性を高めたベクターを開発できるなどその応用可能性は広い。本研究で得られた知見を基に、今後の研究でより完成度の高い癌治療用ベクターの開発が期待される。