

Poxvirus による遺伝子導入

京都大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 吉田 修教授)

川喜田睦司*, 吉田 修

ワシントン大学医学部泌尿器外科 (主任: William J. Catalona 教授)

Timothy L. Ratliff**

POXVIRUS VECTORS FOR GENE TRANSFER

Mutsushi KAWAKITA and Osamu YOSHIDA

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University

Timothy L. RATLIFF

From the Division of Urologic Surgery, Washington University School of Medicine

A promising approach to cancer immunotherapy is immunization with modified tumor cells carrying cytokine or immunomodulatory genes. Cytokine genes (tumor necrosis factor- α , interleukin 2, interferon γ) and costimulatory molecule, B7-1, were incorporated into canarypox virus, ALVAC, which does not replicate in infected mammalian cells, and highly attenuated vaccinia virus, NYVAC. We examined the effect of local cytokine production on the growth of the mouse prostate tumor, RM-1, and the mouse bladder tumor, MBT-2. The vectors expressed the high levels of cytokines and B7-1 and the tumor growth of infected cells was significantly inhibited. The mice immunized with irradiated MBT-2 cells infected with ALVAC-interleukin 2 were protected against the subsequent challenge of parental tumor cells. We conclude that poxvirus vectors are useful for gene delivery in immunotherapy studies because of their infection efficiency, their capability of high gene product expression, their safety, and their ease of handling.

(Acta Urol. Jpn. 43: 835-838, 1997)

Key words: Gene therapy, Poxvirus, Canarypox virus, Cytokines, Immunotherapy

緒 言

癌に対する遺伝子治療のひとつである免疫遺伝子治療は、癌細胞に直接サイトカインなどの遺伝子を導入して宿主の腫瘍免疫を増強させることにより癌細胞を駆逐しようとするものである。これによりそれまで宿主の免疫防御機構から逃れていた癌細胞が、免疫系細胞により認識され免疫系細胞を刺激し、ついには宿主から拒絶されるに至る。米国において癌の遺伝子治療の臨床試験は100を超えるプロトコルが進行中であるが、なかでも自己腫瘍細胞にサイトカイン遺伝子やHLAクラスI遺伝子を導入するものが主体となっている¹⁾。それは患者から摘除した腫瘍に遺伝子を導入して、腫瘍細胞の分裂を止める処置をしてから患者に接種し、この腫瘍に対する免疫を成立させて、残存腫瘍や転移巣の縮小、消失を期待するといういわゆる腫瘍ワクチンである。

遺伝子の導入方法にはかつては plasmid が用いら

れたが導入効率が悪く、また導入された細胞の選択が煩雑なため virus が利用されるようになった²⁾。Retrovirus は染色体の DNA に組み込まれ安定した遺伝子の発現が得られるが、virus の細胞内への感染の効率が悪いこと、非分裂細胞には導入できないこと、*in vivo* では使用できないことなど臨床応用には問題点が多い。今回、poxvirus を利用して tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ), costimulatory 分子B7-1 の遺伝子をマウス前立腺癌細胞株、膀胱癌細胞株に導入し、*in vitro* での導入効率、*in vivo* での抗腫瘍効果、腫瘍ワクチンとしての可能性を検討した。

対 象 と 方 法

【Vector と細胞株】 遺伝子導入に使用した vector は、canarypox virus 由来の ALVAC と vaccinia virus を弱毒化させた NYVAC で、TNF- α , IL-2, IFN- γ , B7-1 の cDNA を組み込んだ ALVAC-TNF- α , ALVAC-IL-2, ALVAC-IFN- γ , ALVAC-B7-1, NYVAC-IL-2, NYVAC-B7-1 および外来遺伝子の導入されていない ALVAC-Parental, NYVAC-Paren-

* 現: 関西医科大学泌尿器科学教室

** 現: アイオワ大学泌尿器科

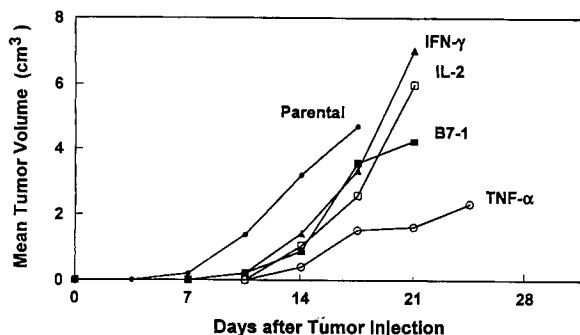


Fig. 1. Mean tumor volume in mice. RM-1 cells were infected *in vitro* with ALVAC-Parental (●) or ALVAC vectors carrying TNF- α (○), IL-2 (□), IFN- γ (▲), or B7-1 (■) at a MOI of 5 PFU/cell. C57BL/6 mice were inoculated subcutaneously with 5×10^5 RM-1 cells. Each group consisted of 5 mice. ALVAC-TNF- α produced significant inhibition of tumor growth ($p < 0.05$, vs. ALVAC-Parental).

tal である。継代培養してある C57BL/6 マウス由来の前立腺癌細胞株 RM-1³⁾ と C3H/He マウス由来の膀胱癌細胞株 MBT-2 の培養液を 2% fetal calf serum (FCS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に交換し 5 MOI (multiplicity of infection) の virus を 5 時間感染させた。MOI は細胞 1 個あたりの virus の数を plaque-forming units で示したものである。

【IL-2 Assay】 ALVAC-IL-2 で感染させた細胞の培養液を 24 時間後に回収し、Russell らの方法⁴⁾に従って IL-2 濃度を測定した。Helper T cell の clone である HT-2 に感染細胞の培養液を段階的に希釈して加え、IL-2 依存性の HT-2 の増殖を 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl) -5-[(phenylamino) carbonyl] -2H-tetrazolium hydroxide (XTT) で染めて染色の程度を OD₄₉₅ で測定した。IL-2 濃度は human recombinant IL-2 を添加した control と比較して算定した。

【Flow cytometry】 ALVAC-B7-1 で感染させた細胞を 10 mM ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA, pH 7.2) で処理し 0.1 M PBS で洗浄し 10% horse serum を加えた⁵⁾ ハムスター抗 B7-1 モノクローナル抗体と反応させ、0.1 M PBS で洗浄後、fluorescein isothiocyanate (FITC) の結合した二次抗体や抗ハムスター免疫グロブリン G モノクローナル抗体と反応させた。0.1 MPBS で洗浄、7-aminoactinomycin D を加え、再度 0.1 M PBS で洗浄し、FACScan flow cytometer で fluorescence を分析した。

【腫瘍抑制試験および免疫試験】それぞれの vector で感染した 5×10^5 個の細胞をマウスの皮下に植え、腫瘍の発育の有無、腫瘍の大きさを週 2 回測定

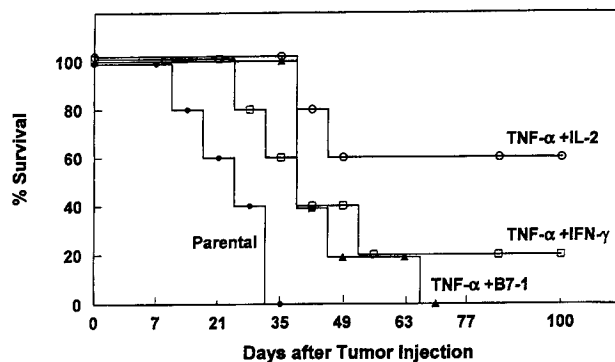


Fig. 2. Effect of combination therapy on survival. Mice were inoculated with 5×10^5 RM-1 cells infected with ALVAC-Parental (●) or ALVAC-TNF- α + IL-2 (○), ALVAC-TNF- α + IFN- γ (□), or ALVAC-TNF- α + B7-1 (▲).

し、マウスの生存を観察した。感染細胞に放射線照射を加えたのちマウスの皮下に接種し、10 日後に何も処理をしていない親株の細胞をマウスの別の部位に植え腫瘍の発育の有無をみた。この実験には vector として ALVAC のみを使用し、RM-1 には ALVAC のすべての vector を、MBT-2 には ALVAC-IL-2 と ALVAC-B7-1 を使った。各グループにマウスを 5 匹ずつ使用した。

結 果

ALVAC-IL-2 で感染した RM-1 (ALVAC-IL-2-RM-1) は 10^6 の細胞につき 0.5, 2.5, 12.5 MOI でそれぞれ 30, 140, 150 units/ml の IL-2 を産生した⁶⁾ ALVAC-IL-2-MBT-2 は 10^5 につき 0.2, 2, 20 MOI でそれぞれ 138, 144, 152 units/ml の IL-2 を、NYVAC-IL-2-MBT-2 は 10^5 につき 0.2, 2, 20 MOI でそれぞれ 118, 96, 39 units/ml の IL-2 を産生した。

ALVAC-B7-1-RM-1 は 2, 5, 10 MOI でそれぞれ 81, 86, 97% の細胞の表面に B7-1 分子を発現し⁶⁾、ALVAC-IL-2-MBT-2 は 2, 5, 10 MOI でそれぞれ 52, 87, 91% の、NYVAC-IL-2-MBT-2 は 2, 5, 10 MOI でそれぞれ 69, 70, 89% の細胞の表面に B7-1 分子を発現していた。

それぞれの vector で感染した RM-1 はいずれのマウスにも腫瘍を発育させたが、ALVAC-TNF- α -RM-1 の腫瘍の発育が最も遅く (Fig. 1)、マウスの生存も有意に長かった。そこで TNF- α と他の vector を組み合わせると、いったん発生した腫瘍が自然消失するという現象がみられ、TNF- α と IL-2 の組み合わせで 60% の生存率が得られた (Fig. 2)、次にそれぞれの組み合わせの vector で感染した RM-1 に放射線を照射してからマウスに接種し、10 日後に何も処理をしていない親株の RM-1 をマウスの別の部位に植えて

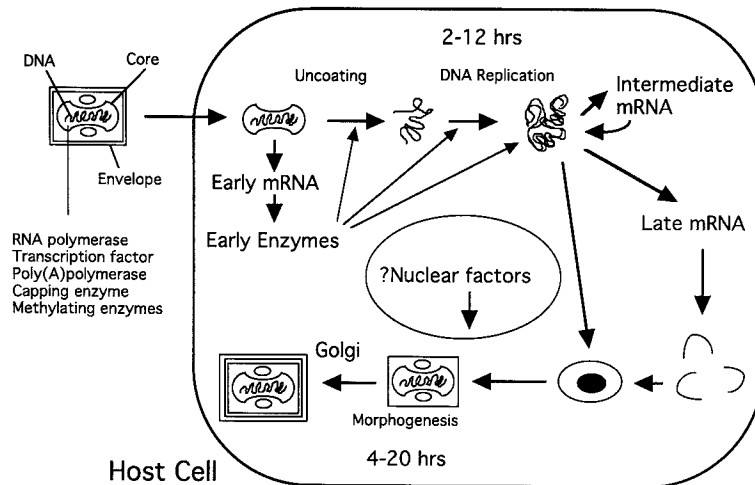


Fig. 3. Infectious cycle of vaccinia virus. Vaccinia virus is a large DNA virus that replicates entirely in the cytoplasm of infected cells and includes the enzymatic functions required for DNA replication and RNA metabolism.

みたところ, 全てのマウスで腫瘍の発育が認められた⁶⁾

ALVAC-IL-2-MBT-2 では腫瘍の発育を全く認めず, ALVAC-B7-1-MBT-2 では20%に腫瘍の発生を見た。次に ALVAC-IL-2-MBT-2 に放射線を照射してからマウスに接種し, 10日後に何も処理をしていない親株の MBT-2 をマウスの別の部位に植えてみたところ, 60%のマウスで腫瘍の発育を認めなかった。

考 察

Poxvirus は感染細胞の細胞質内で増殖する2本鎖直線状 DNA で, DNA の複製や RNA の代謝に必要な酵素など増殖に必要な機能をほとんど備えている。Poxvirus の promoter は eukaryote の transcription 機構で認識されることはないし, 逆に eukaryote の promoter が poxvirus に認識されることもない⁷⁾ (Fig. 3)。Vaccinia virus は poxvirus の prototype のひとつであり (Table), 長年天然痘に対するワクチンとして使われ, ついには1977年ソマリアでの症例を最後に天然痘は撲滅された。1982年, 外来遺伝子を vaccinia virus に導入することに成功してから, 様々な分野で遺伝子導入のための vector として活躍し, その有用性, 安全性には一定の評価が得られている。Vaccinia virus は熱に対し安定で, 凍結乾燥して保存できる。複数の大きな遺伝子 (25 kb) を導入することができ, 広く脊椎動物を宿主として持つ。そして投与方法が簡単, 製造コストが低い, などの利点がある^{7,8)} IL-1 β ⁹⁾, IL-2¹⁰⁾, IL-12¹¹⁾, B7-1 および B7-2¹²⁾ の遺伝子を導入した recombinant vaccinia virus を使って, 抗腫瘍効果が得られている。Recombinant vaccinia virus を生ワクチンとして活用しようという試みは, vaccinia virus が天然痘の撲滅に大いに貢献したことからきている。しかし, progressive

vaccinia, eczema vaccinatum, encephalitis などの副作用は無視できない問題であり, 1968年のアメリカ合衆国の報告によれば, ワクチン接種による合併症は100万人につき74人発生し, 死亡率は, 100万人につき1人であった¹³⁾ ワクチン接種は湿疹や免疫不全を有する患者には禁忌である。

Table. Family Poxviridae; Chordopoxvirinae (subfamily)

Genus	Prototype	Host
Orthopoxvirus	Vaccinia	Mammal
Parapoxvirus	Orf	Ungulate
Avipoxvirus	Canarypox	Bird
	Fowlpox	
Capripoxvirus	Sheeppox	Ungulate
Leporipoxvirus	Myxoma	leporid
Suipoxvirus	Swinepox	Swine

そこで, 弱毒化した vaccinia virus や宿主の限られた poxvirus を vector として利用することが考案された (Table)。ALVAC はカナリアの poxvirus (KANAPOX) 由来で, 鳥類にのみ感染, 増殖する。NYVAC は vaccinia virus の Copenhagen strain 由来で, 病原性や増殖に関連する遺伝子を含む18の open reading frames を欠損させてある¹⁴⁾ 両者とも哺乳動物の細胞内では増殖できないが, 導入された遺伝子蛋白は高レベルで産生されるという特徴がある^{14,15)} 今回, ALVAC, NYVAC により種々のサイトカインおよび B7-1 の遺伝子をマウス前立腺癌および膀胱癌細胞株に導入し, 導入された遺伝子が高レベルで発現していることが示された。抗腫瘍効果および腫瘍ワクチンとしての有用性は前立腺癌と膀胱癌でかなり差を認めたが, これは RM-1 と MBT-2 の免疫原性の違いからくるものと思われる。RM-1 では局

所の抗腫瘍効果は T cell も B cell も持たない SCID マウスでもみられており⁶⁾, IL-2 による NK cell の誘導や TNF- α による壊死の誘導が起こったのであろう²⁾。膀胱癌に関しては膀胱内注入という *in vivo* で使用するには理想的な方法があり, 臨床応用される日も近い。ALVAC の安全性についてはすでに臨床試験で証明されており^{16,17)}, 癌治療のみならず, HIV 感染やその他の virus 感染に対するワクチンとして poxvirus は有用である。

結 語

Poxvirus である canarypox virus 由来の ALVAC と vaccinia virus を弱毒化した NYVAC を利用して TNF- α , IL-2, IFN- γ , costimulatory 分子 B7-1 の遺伝子をマウス前立腺癌細胞株, 膀胱癌細胞株に導入し, *in vitro* でのこれらの遺伝子が高レベルで発現されていることを示した。さらに *in vivo* での抗腫瘍効果を認め, 膀胱癌では腫瘍ワクチンとして利用できる可能性がある。

文 献

- 1) 越田 : 特集 : 腫瘍免疫 遺伝子導入癌細胞ワクチン Mebio **13** : 92-101, 1996
- 2) Levitsky HI : Canarypox virus vectors for gene transfer in cancer immunotherapy. J Natl Cancer Inst **89** : 408-409, 1997
- 3) Baley PA, Yoshida D, Qian W, et al. : Progression to androgen insensitivity in a novel *in vitro* mouse model for prostate cancer. J Steroid Biochem Mol Biol **52** : 403-413, 1995
- 4) Russell JH, Rush BJ, Abrams SI, et al. : Sensitivity of T cells to anti-CD3-stimulated suicide is independent of functional phenotype. Eur J Immunol **22** : 1655-1658, 1992
- 5) Evans CH and Heinbaugh JA : Lymphotoxin cytotoxicity, a combination of cytolytic and cytostatic cellular responses. Immunopharmacology **3** : 347-359, 1981
- 6) Kawakita M, Rao GS, Ritchey JK, et al. : Effect of canarypox virus (ALVAC)-mediated cytokine expression on murine prostate tumor growth. J Natl Cancer Inst **89** : 428-436, 1997
- 7) Perkus ME, Tartaglia J and Paoletti E : Pox-virus-based vaccine candidates for cancer, AIDS, and infectious diseases. J Leukoc Biol **58** : 1-13, 1995
- 8) Moss B : Vaccinia virus : a tool for research and vaccine development. Science **252** : 1662-1667, 1991
- 9) Peplinski GR, Tsung K, Meko JB, et al. : *in vivo* gene therapy of a murine pancreas tumor with recombinant vaccinia virus encoding human interleukin-1 beta. Surgery **118** : 185-191, 1995
- 10) Bash JA : Recombinant vaccinia interleukin-2-infected tumor cell vaccines in immunotherapy of murine colon adenocarcinoma. J Immunother **14** : 269-272, 1993
- 11) Meko JB, Yim JH, Tsung K, et al. : High cytokine production and effective antitumor activity of a recombinant vaccinia virus encoding murine interleukin 12. Cancer Res **55** : 4765-4770, 1995
- 12) Hodge JW, Abrams S, Schlom J, et al. : Induction of antitumor immunity by recombinant vaccinia viruses expressing B7-1 or B7-2 costimulatory molecules. Cancer Res **54** : 5552-5555, 1994
- 13) Lane JM, Ruben FL and Neff JM. : Complications of smallpox vaccination, 1968 ; national surveillance in the United States. N Engl J Med **281** : 1201-1208, 1969
- 14) Tartaglia J, Perkus ME, Taylor J, et al. : NYVAC : a highly attenuated strain of vaccinia virus. Virology **188** : 217-232, 1992
- 15) Taylor J, Trimarchi C, Weinberg R, et al. : Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. Vaccine **9** : 190-193, 1991
- 16) Cadoz M, Strady A, Meignier B, et al. : Immunisation with canarypox virus expressing rabies glycoprotein. Lancet **339** : 1429-1432, 1992
- 17) Pialoux G, Excler J-L, Riviere Y, et al. : A prime-boost approach to HIV preventive vaccine using a recombinant canarypox virus expressing glycoprotein 160 (MN) followed by a recombinant glycoprotein 160 (MN/LAI). AIDS Res Hum Retroviruses **11** : 373-381, 1995

(Received on August 21, 1997)

(Accepted on September 4, 1997)