

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15144

研究課題名(和文)ヘルペスウイルス糖タンパク質の2重標的化改変によるがん治療ベクターの特異性の増強

研究課題名(英文)Development of highly specific oncolytic herpes virus vectors by modification of two envelope glycoproteins

研究代表者

内田 宏昭(Uchida, Hiroaki)

東京大学・医科学研究所・講師

研究者番号：20401250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：単純ヘルペスウイルス(HSV)を用いた腫瘍溶解性ウイルス療法が有望視されている。私たちは最近、単純ヘルペスウイルス(HSV)の外被糖蛋白質gDに単鎖抗体を挿入することにより、がん細胞表面抗原のみを介して細胞内に侵入する標的化HSVプラットフォームの構築に成功した。本研究では、別の外被糖蛋白質gBもgDと同様に標的化改変を施すことが可能であるかどうかにつき検討を行った。gB蛋白質の様々な部位に単鎖抗体あるいはリガンドを挿入したところ、変異gBの多くは細胞表面に発現することが確認された。さらに、ウイルスの細胞内侵入能を損わない変異gBも認められたことから、gBの標的化改変の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Herpes simplex virus (HSV) vectors are promising agents for oncolytic virotherapy. We have recently reported a fully retargeted HSV platform that incorporates single-chain antibodies (scFv) into gD to mediate entry exclusively via tumor-associated antigens, including epidermal growth factor receptor (EGFR). In this study, we sought to examine whether another envelope glycoprotein, gB, could also be genetically re-engineered to interact with tumor-associated antigens. We inserted an anti-EGFR scFv or the EGF ligand into a number of different portions of gB, and found that many, but not all, of the mutated gB proteins were expressed on the cell surface. We also found that the viruses incorporating some of the mutated gB proteins retained the capability of entering cells, suggesting the potential feasibility of gB retargeting.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：遺伝子治療 腫瘍溶解性ウイルス療法 ヘルペスウイルス 抗体 がん

1. 研究開始当初の背景

がんの新規治療法としてウイルスベクターを用いた腫瘍溶解性ウイルス療法が大きな期待を集めている。中でも腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス (HSV) 療法はすでに本邦を含め広く臨床研究が進行中であり、現在では欧米において皮膚およびリンパ節の切除不能な悪性黒色腫に対する治療法として医薬品承認に至っている。腫瘍溶解性 HSV 療法は変異・改変ウイルスが正常細胞と比較してがん細胞でより効率良く増殖することにより、がん細胞のみを殺傷する治療法である。これまでに開発されてきた腫瘍溶解性 HSV 療法は、ほぼあらゆる細胞に侵入するため、幅広いがん種への適用が可能である一方で、正常細胞にも侵入してしまうことから、安全性の確保のために増殖能を減弱せざるを得ず、そのために抗腫瘍効果の方も低下してしまうというジレンマが存在した。

私たちは、HSV の細胞内侵入過程を制御することによりこの問題を解決できないかと考えた。HSV の細胞内侵入は複数の外被糖蛋白質と宿主細胞表面受容体の結合により成立する。私たちは、細胞内侵入に必須の糖蛋白質のうち糖蛋白質 D (gD) の受容体結合能を欠失させると同時に、epidermal growth factor receptor (EGFR) あるいは carcinoembryonic antigen (CEA)、最近では epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) に対する単鎖抗体を挿入することにより、標的分子を発現する細胞内のみ侵入する gD 標的化 HSV の構築に独自に成功した。gD 標的化 HSV は、担がんマウスモデルにおいて高い抗腫瘍効果を示し、マウス脳内への直接投与による毒性評価では野生型 HSV の致死量の 10 万倍の粒子数を投与してもマウスに異常を来さなかったことから、高い安全性と有効性を兼ね備えるウイルスベクターであることが期待される。

2. 研究の目的

多くのがん抗原は完全にごん細胞特異的ではなく、わずかながら一部の正常細胞にも発現しているため、gD 標的化 HSV はそれらの正常細胞を殺傷してしまうことが危惧される。私たちは、HSV の細胞内侵入が gD を含む複数の糖蛋白質により協調的に制御されていることに着目し、gD と同様に HSV の細胞内侵入に必須の糖蛋白質 B (gB) を標的化し、gD と gB で異なる分子を標的することにより HSV の細胞内侵入をさらに厳密に制御しようのではないかと考えた。本研究では、gB を標的化改変する技術を開発し、その成果を臨床医学だけでなく広く医学・生物学研究における特異的な遺伝子導入の基盤技術としての応用につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

gB の機能ドメインに関する論文報告ならびに立体構造のシミュレーション解析の結果をもとに、gD の標的化改変で詳細な検討を行ってきた抗 EGFR 単鎖抗体または EGF (標的化エレメント) をプロトタイプとして、gB に組み込むための挿入部位の候補を複数考案した。各挿入部位に 6 アミノ酸のリンカー配列もしくは標的化エレメントを挿入した gB 変異体を作製し、gB の細胞内ドメインを認識する抗体を用いた免疫染色にて細胞表面における gB 変異体の発現を評価した。gB 変異体を外被に発現する HSV を調製し、gB への標的化エレメントの挿入ならびに細胞表面における標的分子の有無により HSV の細胞内侵入効率が変わるかどうかにつき解析した。

4. 研究成果

検討に用いたすべての gB 変異体の細胞表面における発現効率は、野生型 gB よりも低下しており、数十から数百アミノ酸から構成される標的化エレメントのみならず 6 アミノ酸から構成されるリンカー配列であっても、挿入部位によっては gB の細胞表面への表出効率を著しく減弱させることが明らかとなった。

しかしながら、これらの gB 変異体を表出する HSV の細胞内侵入効率を評価したところ、野生型 gB を表出する HSV よりも細胞内侵入効率は減弱するものの、一部の gB 変異体を表出する HSV は細胞内に侵入しうることが明らかとなった。また、細胞内侵入効率の減弱度は分子サイズが比較的小さな EGF を挿入した gB 変異体を表出する HSV よりも、比較的大きな抗 EGFR 単鎖抗体を挿入した gB 変異体の方が大きいことが明らかとなった。この結果から、標的化エレメントの挿入により gB の立体構造に大きな変化が生じ、本来の膜融合能が失われた可能性、あるいは、標的化エレメントの挿入により gB の本来の受容体との結合能が阻害された可能性が示唆された。

次に、EGFR 陰性細胞ならびにその EGFR 強制発現細胞に対する侵入効率を検討したところ、野生型 gB を表出する HSV ではこれらの細胞それぞれに同程度の効率で侵入した一方、興味深いことに、gB 変異体を表出する HSV については、細胞に EGFR を強制発現することにより侵入効率がむしろ低下することが明らかとなった。これらの結果から、gB に挿入された標的化エレメントは標的分子への結合能を有している可能性が高く、今回の実験条件においては期待に反して侵入効率を減弱させる結果に至ったものの、本手法により HSV の細胞内侵入のトロピズムを変化させることが強く示唆された。さらに、抗 EGFR 単鎖抗体または EGF とは異なる単鎖

抗体またはリガンドを gB に挿入することにより EGFR 以外の分子を標的とした場合においても同様の結果が得られたことから、gB の標的化により様々な分子を標的化しうる可能性が示唆された。

以上の結果から、標的分子を発現する細胞への感染効率の減弱など様々な改善の余地があるものの、gB の標的化改変の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

1. Shibata T, Uchida H*, Shiroyama T, Okubo Y, Suzuki T, Ikeda H, Yamaguchi M, Miyagawa Y, Fukuhara T, Cohen JB, Glorioso JC, Watabe T, Hamada H, Tahara H. Development of an oncolytic HSV vector fully retargeted specifically to cellular EpCAM for virus entry and cell-to-cell spread. *Gene Therapy*. In press. *Corresponding author.
2. Nishii Y, Yamaguchi M, Kimura Y, Hasegawa T, Aburatani H, Uchida H, Hirata K, Sakuma Y. (2015) A newly developed anti-Mucin 13 monoclonal antibody targets pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *International Journal of Oncology*. 46:1781-1787.
3. Tanaka K, Miyata H, Sugimura K, Kanemura T, Mizote Y, Hamada-Uematsu M, Yamasaki M, Wada H, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y, Tahara H*. Negative influence of programmed death-1-ligands on the survival of esophageal cancer patients treated with chemotherapy. *Cancer Science*. In press. *Corresponding author.
4. Ma Z, Li W, Yoshiya S, Xu Y, Hata M, Eldaravish Y, Markova T, Yamanishi K, Yamanishi H, Tahara H, Tanaka Y, Okamura H. Augmentation of immune checkpoint blockade therapy with IL-18. *Clinical Cancer Research*. In press.
5. Sekino S, Kashiwagi Y, Kanazawa H, Takada K, Baba T, Sato S, Inoue H, Kojima M, Tani K. (2015) The NESH/Abi-3-based WAVE2 complex is functionally distinct from the Abi-1-based WAVE2 complex. *Cell Commun Signal*. 13:41.
6. Koizumi T, Terada T, Nakajima K, Kojima M, Koshihara S, Matsumura Y, Kaneda K, Asakura T, Shimizu-Ibuka A,

Abe K, Misaka T. (2015) Identification of key neoculin residues responsible for the binding and activation of the sweet taste receptor. *Sci Rep*. 5:12947.

7. 内田宏昭, 田原秀晃 (2015) 大腸癌の遺伝子治療・ウイルス療法 日本臨床 1077:569-573.

[学会発表](計8件)

1. 内田宏昭 がん表面抗原のみを介して侵入する標的化改変ヘルペスウイルスベクターの開発 第2回 IMSUT-CGCT シンポジウム 2016年2月 東京
2. Uchida H. Exploration of cancer-targeting antibodies using an HSV-based screening system for development of novel HSV vectors fully retargeted to cancer cells. *The 21th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy*. July 2015. Osaka, Japan. 【シンポジウム指定登壇】
3. 城山智貴, 内田宏昭, 大久保優, 柴田智子, 福原武志, 山口美樹, Justus B. Cohen, Joseph C. Glorioso, 渡部徹郎, 濱田洋文, 田原秀晃 腫瘍細胞表面抗原を介して侵入する標的化単純ヘルペスウイルスベクターの開発 第7回血液疾患免疫療法研究会 2015年9月 東京
4. Shibata T, Uchida H, Shiroyama T, Suzuki T, Okubo Y, Fukuhara T, Yamaguchi M, Miyagawa Y, Cohen JB, Glorioso JC, Watabe T, Hamada H, Tahara H. Generation of an EpCAM-retargeted HSV vector by application of in-house monoclonal antibody resources. *The 42st IMSUT Founding Commemorative Symposium*. June 2015. Tokyo, Japan.
5. Okubo Y, Uchida H, Ikeda H, Fukuhara T, Kojima M, Yamaguchi M, Miyagawa Y, Cohen JB, Glorioso JC, Watabe T, Hamada H, Tahara H. Exploration of cancer-targeting antibodies using an HSV-based screening system. *The 42st IMSUT Founding Commemorative Symposium*. June 2015. Tokyo, Japan.
6. 内田宏昭 がん細胞表面抗原を介して細胞内侵入する標的化改変単純ヘルペスウイルスベクターの開発 第56回日本臨床ウイルス学会 2015年6月 岡山 【招待講演】
7. Tahara H. Why do you need to involve the immune system? *The 20th Taiwan Joint Cancer Conference (TJCC)*. May 2015. Taipei, Taiwan. 【招待講演】
8. 田原秀晃 樹状細胞研究から始まった癌免疫療法のパラダイムシフト 第25回日本樹状細胞研究会 2015年7月

岡山 【招待講演】

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/sur+trans/sur+be/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 宏昭 (UCHIDA HIROAKI)

東京大学・医科学研究所・講師

研究者番号： 20401250

(2) 研究分担者

小島 正樹 (KOJIMA MASAKI)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号： 90277252

田原 秀晃 (TAHARA HIDEAKI)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号： 70322071

(3) 連携研究者

該当なし。