

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月18日現在

機関番号：12601
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2016～2018
 課題番号：16K19181
 研究課題名(和文) 遺伝子組換えによる高い安全性と抗腫瘍効果に優れた新規腫瘍溶解性ウイルス療法の開発

 研究課題名(英文) Development of novel recombinant oncolytic virotherapy which has superiority in safety and antitumor efficacy

 研究代表者
 宮本 将平 (Miyamoto, Shohei)

 東京大学・医科学研究所・特任助教

 研究者番号：20758536
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに我々は、コクサッキーウイルスB群3型(CVB3)、エコーウイルス4型(EV4)、ワクチン型ポリオウイルス(PV)が強力な抗腫瘍効果を有することを報告してきた。より安全で効果的な腫瘍溶解性ウイルスを開発する為、我々は各々のウイルスゲノムを組換えたキメラウイルスを作製した。CVA21とPVからなるウイルスの多くは抗腫瘍効果を有していなかったが、CVB3とEV4からなるキメラウイルスは全て抗腫瘍効果を有しており、特にEV4にCVB3のP2領域を組換えたEBEは野生型EV4より高い力価を有することを明らかにした。これらの結果は、抗癌剤やワクチンの開発に有用な知見をもたらすと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、腫瘍溶解性ウイルスの研究は盛んに行われており、HSVを始め多くの腫瘍溶解性ウイルスが臨床試験で検討されているが、ほとんどのウイルスは治療効果が限定的であり治療薬として不十分なものが多い。この状況を打破するため、我々は新たな腫瘍溶解性ウイルスの探索を目的に、エンテロウイルス38種類を用いた抗腫瘍活性スクリーニングから見出した候補ウイルスよりキメラウイルスを作製した。その結果、有望な腫瘍溶解性エンテロウイルスを見出すことができた。本研究から得られた新規組換え腫瘍溶解性ウイルスは日本初のオリジナルウイルスとして、ウイルス療法の起爆剤になることを期待している。

研究成果の概要(英文)：Recently, the development of oncolytic virotherapy has been actively carried out and gathered attention. Research of enterovirus had been conducted for the understanding of its pathogenicity, particularly coxsackievirus A21 (CVA21) is one of the candidates for oncolytic virotherapy and many clinical trials have recently been underway. We previously reported that coxsackievirus B3 (CVB3), Echovirus 4 (EV4), and Poliovirus (PV) had potent oncolytic activity for cancer, and induced immunogenic cell death of CVB3-infected cells. To development the more safety and effectively virus, we generated chimeric virus at the P1, P2 and P3 region between CVB3, CVA21, EV4 and PV. Although some chimeras between CVA21 and PV were nonfunctional, most recombinant viruses between CVB3 and EV4 were viable, especially, EBE (EV4 with P2 region of CVB3) had higher titer than wild type EV4. These unique genomic insights could be useful for vaccine and anti-cancer development.

研究分野：腫瘍溶解性ウイルス

キーワード：腫瘍溶解性ウイルス コクサッキーウイルス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は日本国民の死因の第1位であり、2013年には364,872人が死亡している。早期発見例における治療成績のみならず罹患後の生存期間も延長しているが、悪性腫瘍による死亡率は依然として高く、新規治療法の導入が望まれている。近年、ウイルスの腫瘍細胞内での特異的増殖と腫瘍溶解性を誘導し、抗腫瘍活性を期待する「腫瘍溶解性ウイルス療法」(以下ウイルス療法と略)が開発され、1996年米国で複製可能遺伝子改変I型単純ヘルペスウイルス(以下HSV)を用いたウイルス療法が脳腫瘍に実施され、日本においても遺伝子改変HSVを用いた臨床研究が脳腫瘍患者に実施されており、安全性と有効性が示されてきている。現在ウイルス療法の臨床的安全性と腫瘍特異性は確認されてきているが治療効果は限定的であり、さらなる改良が望まれる。我々は新規ウイルス療法の開発を目的に、ピコルナウイルス科・エンテロウイルス属に着目して、これまでに38種類のウイルスを各種ヒト癌細胞株及び正常細胞に*in vitro*で感染させ、これらの細胞傷害効果について比較検討した。その結果、CVB3が正常肺線維芽細胞を傷害することなく、複数の肺癌細胞を特異的に溶解することを発見し、担ヒト肺癌ヌードマウスを用いた*in vivo*研究において原発及び転移巣で抗腫瘍効果を誘導することを報告した(Miyamoto et al. *Can Res.* 2012)。その他にも、コクサッキーウイルスA群11型(CVA11)がヒト大腸癌あるいは肺癌を用いた、エコーウイルス4型(EV4)がヒト食道癌細胞を用いた*in vivo*研究においてほとんど副作用なく抗腫瘍効果を誘導することや、ポリオウイルス(PV)が広範囲の癌種に対する非常に強力な*in vitro*での抗腫瘍効果を有することを見出した(図2)。

その後、我々はCVB3の副作用を克服すべく、各組織に特異的に発現するmicro RNA(miR-1及びmiR-217)に相補的な配列を搭載したCVB3-miRTの作製に成功し、CVB3で引き起こされる膵炎、筋炎の消失及び膵、肝機能障害の正常化を認め、安全性の向上を確認できた(図3)(特許名:組換えコクサッキーウイルス、出願番号:61/812943、出願日:2013年4月17日)。さらに、我々は免疫刺激性サイトカインである顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(以下GM-CSF)搭載CVB3に着手し、ポリオウイルスゲノムに含まれるプロテアーゼ認識配列を利用することにより、既知の遺伝子改変では困難であった遺伝子組換えCVB3-GM-CSFの開発に成功した。本結果より他のエンテロウイルスの配列を利用することでそのウイルスの特性を引き継ぐことが可能であることを見出した。

また、CVB3-miRTにおいて臨床応用を念頭に置いた精製法を確立し(図4)、サルおよびマウスにおける毒性試験を実施した。その結果、有効投与量群では高い安全性を示したが、最大投与量群では一過性に生化学検査での異常が見られた為、さらなる安全性の向上が望まれる。

2. 研究の目的

悪性腫瘍に対する新しい治療法の開発は急務である。我々はこれまでにエンテロウイルス38種について殺腫瘍細胞能を指標とした大規模スクリーニングを行い、幾つかの新規腫瘍溶解性エンテロウイルスを見出し、その中でもコクサッキーウイルスB群3型(以下CVB3と略)は肺癌、悪性中皮腫、乳癌細胞に対する抗腫瘍作用に優れていることを明らかにした。その後、CVB3の臨床応用を目指し安全性向上を図ることを目的に遺伝子改変腫瘍溶解性CVB3-miRTを作製した。本研究の目的はこれまでの我々の研究成果を基盤に、スクリーニングにより見出された様々な腫瘍溶解性エンテロウイルスの構造・非構造遺伝子を組換えて各々の長所を取り入れた全く新しい理想的腫瘍溶解性エンテロウイルスを開発することである。

3. 研究の方法

細胞及び培養方法

本研究に使用したNCI-H1299(H1299)細胞はAmerican Type Culture Collection(ATCC)より購入した。H1299細胞は10% fetal bovine serum(FBS)含有RPMI 1640培地を用いて継代培養を行い維持した。また、細胞は37℃、5% CO₂で平衡化したインキュベーター中で培養を行った。

ウイルス

各種エンテロウイルスは国立感染症研究所ウイルス第二部腸管ウイルス第二室の清水博之先生より譲渡頂いた。これらのウイルスはH1299細胞を用いて増殖させた。

野生型ウイルスプラスミド作製

1×10⁶ cellsの培養細胞にmultiplicity of infection(MOI)が0.1となるように野生型ウイルスを感染させRNA抽出を行った。抽出後精製したRNAを逆転写反応にてcDNAとした。

各野生型ウイルスのcDNAに対し、任意の制限酵素配列を末端に付加したプライマーを用いて、cDNAをPCRによって増幅し、制限酵素処理、Ligation反応を行いpBluescript II KS(+)に挿入し、野生型ウイルスのプラスミドを作製した。

キメラウイルスプラスミド作製

各野生型ウイルスプラスミドの構造遺伝子(P1)・非構造遺伝子領域(P2及びP3)においてPCRを行い、DNA断片同士を結合させる為In-Fusion HD Cloning Kit(タカラバイオ)を用いて、キメラウイルスプラスミドを作製した。

ウイルス粒子作製

T7 polymeraseを用いてプラスミドをRNAに転写し、H1299細胞にRNAを導入した。その後、24時間後、上清を新たに用意したH1299細胞に加え、cytopathic effect(CPE)が70%程度確認出来た時点で、細胞のみを回収した。細胞を凍結融解にて破碎し、ウイルス粒子を回収した。

ウイルス力価測定

細胞を 96 穴プレートに 5×10^3 cells で播種し、37 °C、5% CO₂ で 5 時間孵置した。ウイルスは OPTI-MEM で 100 倍希釈したものを力価測定用のウイルス原液とした（この希釈倍率の常用対数は力価測定計算式で使用：L）。ウイルス原液を 10 倍希釈ずつ段階希釈し（この希釈倍率の常用対数も計算式で使用：d）、希釈系列液（10 倍希釈毎）を作製した。希釈系列液を細胞へ 50 μL（計算式で使用：v）添加し、120 時間後に 50%以上細胞変性効果が認められた穴数（合計を 8 で除算した値を計算式で使用：S）を算定し、ウイルス力価を以下の式を用いて算出した。

$$\text{Log}_{10}(\text{TCID}_{50}/\text{mL}) = L + d(S - 0.5) + \log_{10}(1/v)$$

腫瘍溶解性エンテロウイルスの閉鎖経路精製法の開発

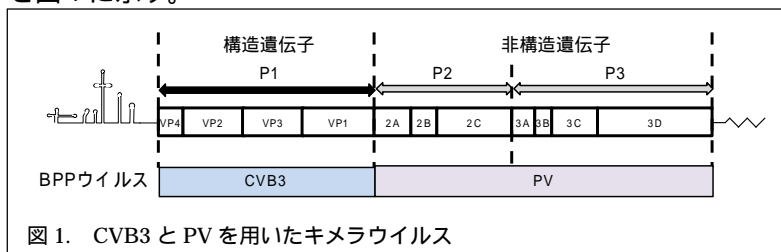
製造に用いる 293 細胞は、Life technologies 社より購入し入手した。細胞は、培養バッグを用いて、同社無血清培地にて 37 °C、5 % CO₂ で平衡化したインキュベーター内で振盪培養した。フィルターを用いてウイルス培養上清から夾雑物を除去した後、限外濾過にてウイルス培養上清の濃縮を行った。また、10 倍濃縮を行ったウイルス液に対し、再度限外濾過にて溶媒を置換した。陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによるウイルス精製は AKTA pure (GE Healthcare 社) を用いて実施した。塩濃度勾配溶離液にてウイルス溶出分画を明らかにした後、段階的溶出でウイルスの精製を実施した。

4. 研究成果

異種エンテロウイルス間でのキメラウイルス作製

本研究においてキメラウイルスは「P1, P2, P3」の順に各々の配列を供与する野生型ウイルスの略称を並べて表現する。その際ウイルス名は「CVA21 : A」「CVB3 : B」「EV4 : E」「PV1 : P」と省略する。

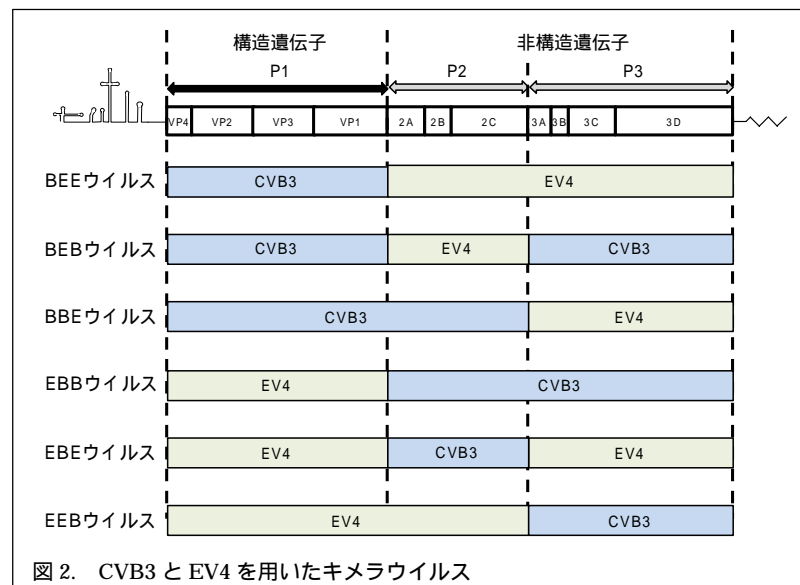
まず、当研究室で主に研究対象としている CVB3 と、先行研究におけるスクリーニングで広範囲の癌種に対して強力な抗腫瘍効果を示した PV1 をキメラウイルスの親に選定し、CVB3 の構造遺伝子と、PV1 の非構造遺伝子を用いてキメラウイルスを作製した。このキメラウイルスはエンテロウイルス種が異なる 2 つのウイルスを組換えたものであり、作製したキメラウイルスの配列を図 1 に示す。



CVB3 と PV のキメラウイルス RNA ゲノムを細胞に導入して、ウイルス粒子の作製を試みたところ、H1299 細胞において CPE は確認出来なかった。

同種エンテロウイルス間でのキメラウイルス作製

上記の異なるエンテロウイルス種に属する野生型ウイルス同士の組み合わせにおいては、感染性を持つキメラウイルスは作製出来なかった。次に、エンテロウイルス種が同じである 2 つのウイルスを組換えたキメラウイルスを作製した。本研究で主に研究対象とした CVB3 は Enterovirus-B に属しており、同じ種に属する EV4 を組換え対象として選定した。同種に絞った場合作製する組み合わせが減少する為、研究計画を変更し、さらに非構造遺伝子のどの領域がウイルス力価に影響を与えているのかを検討する事とした。つまり、非構造遺伝子における P2 および P3 領域のみを組換えたキメラウイルスを追加で作製した。作製したキメラウイルスの配列を図 2 に示す。



次に、各々の組換え部位がウイルス力価にどのように影響するのかを検討するため、作製した CVB3 と EV4 間のキメラウイルス 6 種と、コントロールとして野生型の CVB3 と EV4 の計 8 種類のウイルスの力価測定を実施した (図 3)。

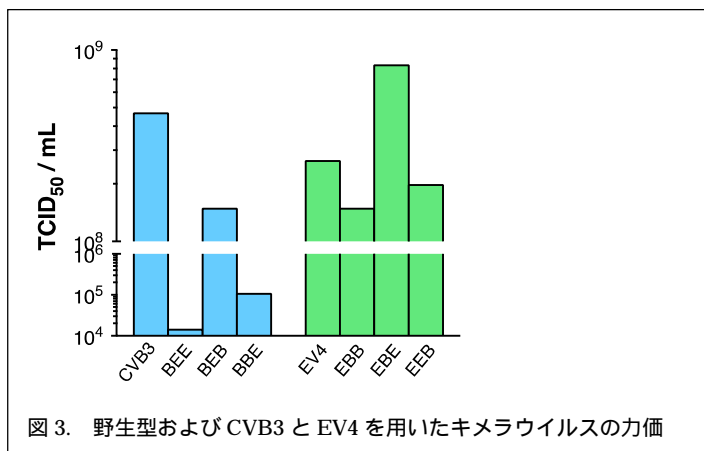


図 3. 野生型および CVB3 と EV4 を用いたキメラウイルスの力価

その結果、野生型のウイルスに対して別種のウイルスの非構造遺伝子を組換えることでウイルス力価が変化する可能性が示唆された。また、組換える領域によってウイルス力価が増減することが明らかになった。CVB3 の構造遺伝子を固定し、P2 及び P3 領域を EV4 由来としたキメラウイルスにおいては、全て感染力は保有しているものの野生型 CVB3 より力価が低い結果となったが、EV4 の構造遺伝子を固定したキメラウイルスにおいては、EBE ウイルスが最も力価が高く、次いで EBB ウイルス、EEB ウイルスとなった。以上の結果より、CVB3 の P2 領域のみを組換えて作製した EV4 キメラウイルスは野生型 EV4 と比較してより高いウイルス力価を示すことが明らかになった。

次に、同種内の CVA21 と PV 間のキメラウイルスゲノムを作製した。作製したキメラウイルスの配列を 図 4 に示す。

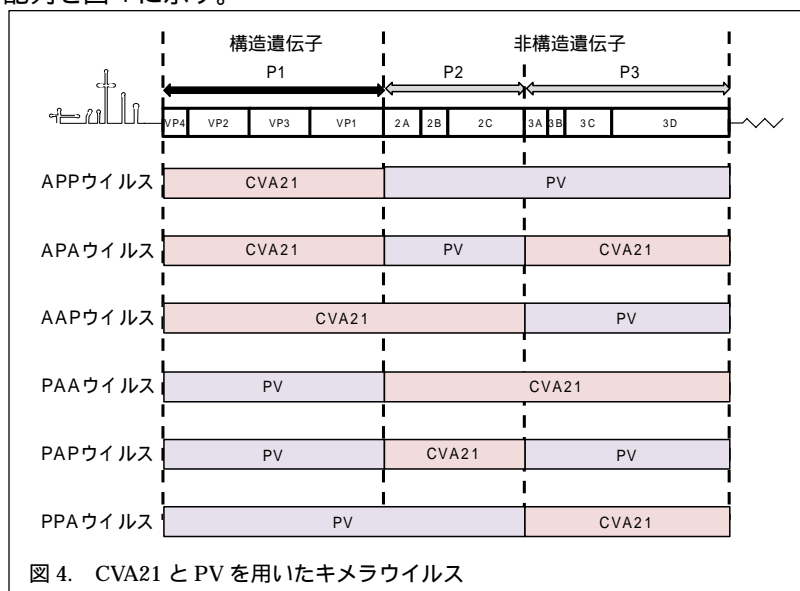


図 4. CVA21 と PV を用いたキメラウイルス

さらに、前述のキメラウイルスと同様に各々の組換え部位がウイルス力価にどのように影響するのかを検討するため、作製した CVA21 と PV 間のキメラウイルス 6 種と、コントロールとして野生型の CVA21 と PV の計 8 種類のウイルスの力価測定を実施した (図 5)。

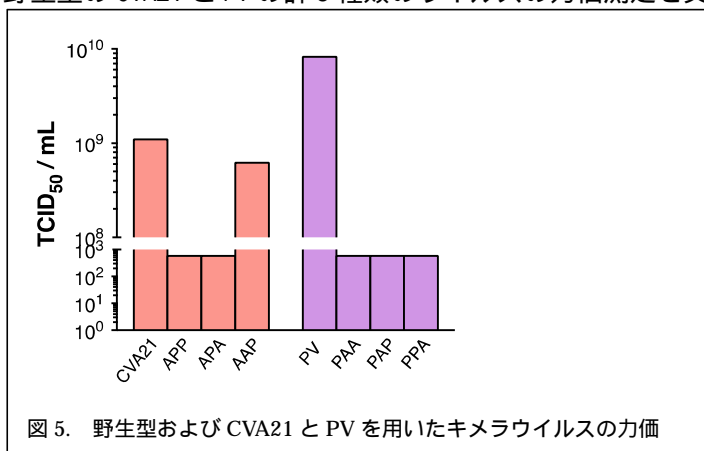


図 5. 野生型および CVA21 と PV を用いたキメラウイルスの力価

力価を比較した結果、CVA21 と PV の間のキメラウイルスは AAP を除いて全てウイルス力価が検出限界以下であった。AAP においても野生型 CVA21 とほとんど変わらない力価を示したに留まった。

腫瘍溶解性エンテロウイルスの閉鎖経路精製法の開発

腫瘍溶解性エンテロウイルスの臨床展開を想定し、腫瘍溶解性エンテロウイルスの閉鎖経路精製法を検討した。我々は培養バック、無血清浮遊培養、閉鎖経路による限外濾過法とクロマトグラフィー法を利用したエンテロウイルス精製法の独自開発に成功した。

精製後のウイルス溶液を電気泳動 (SDS-PAGE) にてタンパク質を分離後、Oriole 蛍光ゲル染色にてバンドを検出した (図 6)。

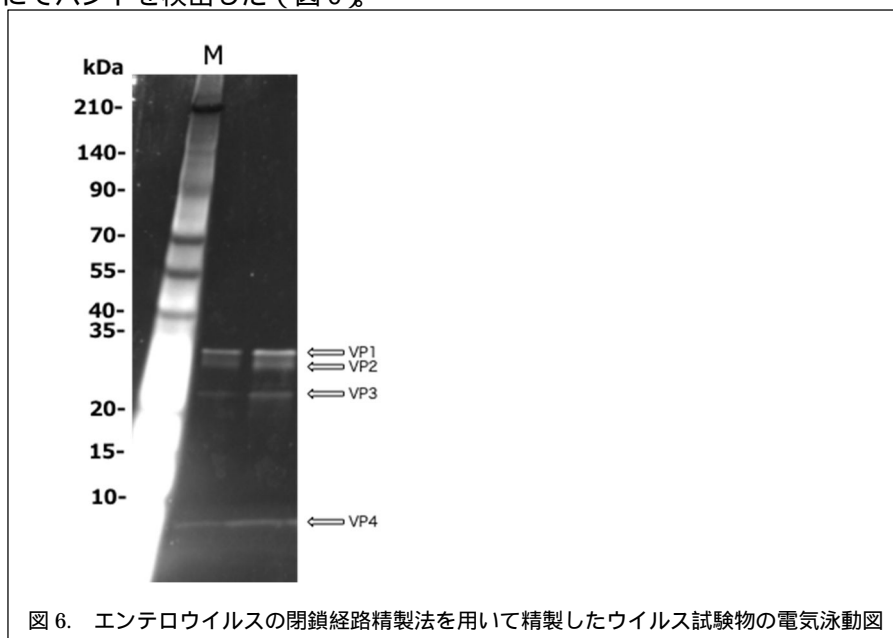


図 6. エンテロウイルスの閉鎖経路精製法を用いて精製したウイルス試験物の電気泳動図

その結果、ウイルス精製液にはほとんど夾雑物が確認されず、ウイルスのカプシド由来タンパク質 VP1~VP4 のバンドのみが確認され、非常に高い水準で精製されていることが明らかとなった。本製造法は細胞培養開始時からウイルス精製完了までを閉鎖系で行うことが可能であり、品質管理の面から非常に有望な精製であると考えられる。本製造法を用いることで、開発した腫瘍溶解性エンテロウイルスをスムーズに臨床へ展開できることが期待される。

本研究において P2 及び P3 領域がウイルス力価に影響を与えている可能性が示唆されたが、その他の領域においてもまだ明らかになっていない点は多い。CVB3 と EV4 の組み合わせからは、EV4 に CVB3 の P2 領域を導入することが力価の上昇に寄与することが判明し、EBE ウイルスはこれまでにない高力価を実現した。今後は EBE ウイルスを新規腫瘍溶解性ウイルスとして開発を進めていくと同時に、本研究で組換えの最小単位が P1・P2・P3 領域という区分であったが、今後はより細かく分類し、2A 遺伝子のみを組換えたキメラウイルスなど、それぞれの領域ごとに更に詳細に検討していく予定である。また、EBE ウイルス療法は日本初のオリジナルウイルスとして、ウイルス療法の起爆剤になることを期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Kohara H., Utsugisawa T., Sakamoto C., Hirose L., Ogawa Y., Ogura H., Sugawara A., Aoki T., Iwasaki T., Takayoshi Asai T., Doisaki S., Yusuke Okuno Y., Muramatsu H., Abe T., Kurita R., Miyamoto S., Sakuma T., Shiba M., Yamamoto T., Ohga S., Yoshida K., Ogawa S., Ito E., Kojima S., Kanno H., Tani, K. KLF1 Mutation E325K induces cell-cycle arrest in erythroid cells differentiated from congenital dyserythropoietic anemia (CDA) patient-specific induced pluripotent stem cells. *Exp Hematol.* (in press) 査読有
2. Jia Y., Miyamoto S., Soda Y., Takishima Y., Sagara M., Liao J., Hirose L., Hijikata Y., Miura Y., Hara K., Iwanaga A., Ota Y., Tani K. Extremely low organ toxicity and strong antitumor activity of miR-34-regulated oncolytic coxsackievirus B3. *Mol Ther Oncol.* 査読有, 12, 2019, 246-258.
3. Wang B., Ogata H., Takishima Y., Miyamoto S., Inoue H., Kuroda M., Yamada K., Hijikata Y., Murahashi M., Shimizu H., Okazaki T., Nakanishi Y., and Tani K.: A novel combination therapy for human oxaliplatin-resistant colorectal cancer using oxaliplatin and coxsackievirus A11. *Anticancer Res.* 査読有, 38(11), 2018, 6121-6126.

4. Sakamoto C., Kohara H., Inoue H., Narusawa M., Ogawa Y., Hirose-Yotsuya L., Miyamoto S., Matsumura Y., Yamada K., Takahashi A., and Tani K.: Therapeutic vaccination based on side population cells transduced by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene elicits potent antitumor immunity. *Cancer Gene Ther.* 査読有, 24(4), 2017, 165-74.
5. Nosaki K., Hamada K., Takashima Y., Sagara M., Matsumura Y., Miyamoto S., Hijikata Y., Okazaki T., Nakanishi Y., and Tani K.: A novel, polymer-coated oncolytic measles virus overcomes immune suppression and induces robust antitumor activity. *Mol Ther Oncol.* 査読有, 3, 2016, 16022.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Shohei Miyamoto, The current preparative status of oncolytic coxsackievirotherapy toward clinical trial. 第 24 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会, 2018
2. Shohei Miyamoto, Development of oncolytic coxsackievirus therapy for the clinical trial. The 5th IMSUT-CGCT Symposium 2018, 2018
3. Shohei Miyamoto, Oncolytic Coxsackievirus therapy as an immunostimulator. 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016

〔図書〕(計 1 件)

Miyamoto S., Sagara M., Kohara H., and Tani K.: Oncolytic coxsackievirus therapy as an immunostimulator. *Rinsho Ketsueki.* 58(8), 2017, 977-82.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 遺伝子改変コクサッキーウイルス及び医薬組成物

発明者: 宮本将平、賈楊、岩永篤文、谷憲三朗

権利者: 国立大学法人東京大学、新日本製薬株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2017-083019

出願年: 2017 年 04 月 19 日

国内外の別:

取得状況 (計 1 件)

名称: 遺伝子改変コクサッキーウイルス

発明者: 宮本将平、井上博之、相良京、谷憲三朗

権利者: 国立大学法人九州大学、新日本製薬株式会社

種類: 特許

番号: 特許第 6396891 号、US10076547B2

取得年: 2018 年 09 月 07 日、2018 年 09 月 18 日

国内外の別: 国内、米国

〔その他〕

アウトリーチ活動 (研究室見学受け入れ)

2016 年 5 月 2 日 愛知県西尾市立一色中学校

2016 年 6 月 1 日 愛知県江南市立古知野中学校

2017 年 2 月 7 日 東京学芸大学附属高等学校

2017 年 8 月 4 日 立命館慶祥高等学校

2018 年 8 月 1 日 宮城県仙台第二高等学校

2018 年 8 月 3 日 立命館慶祥高等学校

2018 年 9 月 20 日 徳島文理高等学校

2018 年 12 月 12 日 群馬県立太田高等学校

2019 年 3 月 14 日 富山県立高岡高等学校

6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。