

令和 4 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02687

研究課題名(和文) 全身投与可能ながん標的化改変ヘルペスウイルスによる転移性悪性腫瘍の治療法開発

研究課題名(英文) Treatment of metastatic tumors by systemic injection of tumor-retargeted oncolytic herpesviruses

研究代表者

内田 宏昭 (Uchida, Hiroaki)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：20401250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞だけに特異的に侵入し、静脈内投与可能な標的化腫瘍溶解性ウイルス療法が開発できれば、原発巣のみならず全身の転移巣にも有効な治療法となりえる。私たちは、単純ヘルペスウイルス(HSV)にがん細胞表面抗原を認識する単鎖抗体を組み込むことにより、標的細胞のみに侵入可能な標的化HSVの構築に成功した。ごく最近、これにHSVの膜融合活性を促進するsyn変異を搭載することにより、特異的侵入を遂げたウイルスを腫瘍塊の中で効率良く伝播させる方法を開発した。本ウイルスは、免疫不全マウスにて非常に大きな腫瘍でも単回のみ静脈内投与で退縮させ、静脈内投与薬としての臨床応用が有望であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍の新規治療法として単純ヘルペスウイルスを用いた腫瘍溶解性ウイルス療法が有望視され、本邦を含め広く臨床試験が進められてきたが、その投与経路のほとんどは腫瘍への直接投与の形にとどまっているというのが現状である。がん細胞だけにしか侵入できない標的化ウイルスが開発できれば、ウイルスの増殖能を弱めることなく本来の腫瘍溶解能を最大限に活用した治療戦略が可能となることに加え、これを静脈内投与することにより全身性の転移を来したがん症例を治療することも可能となりうる。本研究の成果は、難治性・転移性のがん症例にも適用可能な腫瘍溶解性ウイルス療法の開発につながり、臨床医学への実用化が大いに期待できる。

研究成果の概要(英文)：The route of administration of oncolytic herpes simplex virus (HSV) in the majority of clinical trials to date has been direct injection into the tumor. This appears to be one of the factors that may limit the therapeutic potential of oncolytic HSV as a single agent against systemically metastatic tumors. To overcome this limitation, we have developed a receptor-retargeted oncolytic herpes simplex virus employing a single-chain antibody for targeting tumor-associated antigens (RR-oHSV) and its modified version with additional mutations conferring syncytia formation (RRsyn-oHSV). Here, we investigated the in vivo anti-tumor effects of RRsyn-oHSV using human cancer xenografts in immunodeficient mice. Intra-venous administration of RRsyn-oHSV resulted in robust anti-tumor effects even against large tumors. These results strongly suggest that cancer patients with distant metastases could be effectively treated with our RRsyn-oHSV.

研究分野：がん

キーワード：がん

## 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の新規治療法として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、本邦を含め広く臨床試験が進められてきた。2015年に遺伝子組換え HSV 製剤 T-VEC (talimogene laherparepvec) が医薬品として承認されたことに伴い、本研究分野はさらに大きな期待を集めている。しかしながら、これまでの臨床試験で用いられてきた腫瘍溶解性ウイルスは、がん細胞のみならず正常細胞にも一旦は侵入してしまうという問題を抱えている。このため、侵入してしまった正常細胞の傷害を避けるためにウイルスの増殖能を弱めざるを得ず、これが腫瘍溶解能の低下にもつながりうるというジレンマが存在した。加えて、溶解に必要なウイルス量を腫瘍局所で確保するためにはウイルスを腫瘍内に直接投与せざるを得ず、これが遠隔転移を有する進行がんの治療では大きな障壁となってきた。これに対し、がん細胞だけにしか侵入できない標的化ウイルスが開発できれば、ウイルスの増殖能を弱めることなく本来の腫瘍溶解能を最大限に活用した治療戦略が可能となることに加え、これを静脈内投与することにより全身性の転移を来したがん症例を治療することも可能となりうる。

## 2. 研究の目的

私たちの研究グループは最近、HSV の受容体標的化改変に独自に成功した (Shibata et al., Gene Ther. 2016; Uchida et al., Mol Ther. 2013; Uchida et al., J Virol. 2010)。すなわち、HSV の細胞への侵入を担うエンベロップ糖タンパク質 gD を本来の受容体に結合不能とした上で、これに EGFR・CEA・EpCAM など様々な腫瘍関連抗原に対する単鎖抗体 (scFv) を挿入する (図1) ことにより、標的細胞のみに効率良く侵入する標的化 HSV の構築に成功した (図2)。動物実験では、担

がんマウスにて標的化 HSV の腫瘍内投与により強力な抗腫瘍効果を認めた。私たちはさらに、HSV の膜融合活性を促進する変異 (syn 変異) を複数導入することに

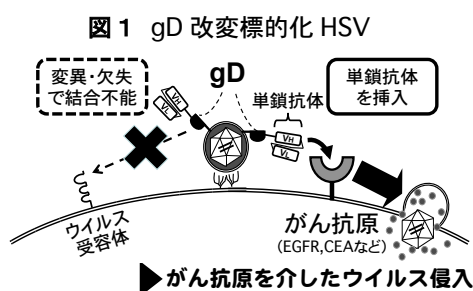
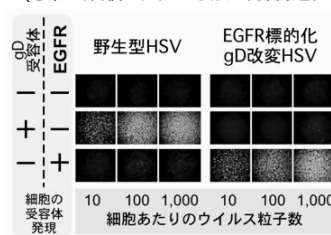


図2 標的化 HSV の特異性 (感染6時間後のウイルス蛋白の免疫染色)



より、特異的侵入を遂げたウイルスを効率良く細胞間伝播させ、強力な殺細胞効果をもたらす方法を開発した (Okubo et al., J Virol. 2016)。標的化 HSV に gB および gK の syn 変異のうち一つあるいは両方を組み込んだウイルスを作製して比較検討したところ、親株のウイルスでは小さなプラークしか生じなかったヒト膀胱がん細胞株において、両方の syn 変異を搭載したウイルスは非常に大きな多核巨細胞からなるプラークを形成し、強力な殺がん細胞活性を示した。しかも、感染した標的がん細胞がこれに隣接する非標的細胞と融合して感染が波及してしまうことは認められず、syn 変異の導入は標的化 HSV の高いがん特異性を維持しつつその殺がん細胞活性を増強するという極めて有望な結果を得た。

このように、受容体標的化改変および膜融合促進変異を施した HSV は、培養細胞での検討において強力な殺がん細胞活性を発揮することが明らかとなった。しかしながら、これら両方の改変を施した HSV が、受容体標的化改変のみを施した HSV と比較して、生体内での抗腫瘍効果においてどの程度の優位性を有するかについては不明であった。そこで本研究では、これらの標的化 HSV の有用性を評価し、その臨床応用を目指した研究に取り組んだ。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞

ヒト悪性神経膠腫細胞株 U87 は 10% FBS 添加イーグル最小必須培地を用いて培養した。

### (2) ウイルス

EGFR 標的化 HSV (KGNE) ならびにその gB および gK に syn 変異 (gB:R858H および gK:A40T;

以下、BhKt 変異と呼称する)を導入したウイルス (KGNE-BhKt) は以前報告したものを使用した (Shibata et al., Gene Ther. 2016; Okubo et al., J Virol. 2016)。

### (3) 動物実験

重度複合免疫不全マウス SCID-Beige の皮下に U87 細胞を移植した。治療を開始する時点での腫瘍体積の平均値が近似するようにマウスをグルーピングし、ウイルスを腫瘍内あるいは尾静脈内に投与し、その後の腫瘍体積を経時的に計測した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒトがん細胞株の皮下腫瘍モデルに対する腫瘍内投与による抗腫瘍効果の比較

腫瘍溶解性 HSV の抗腫瘍効果の検討に頻用される U87 細胞を SCID-Beige の皮下に移植したモデルを用いて、KGNE および KGNE-BhKt の抗腫瘍効果を評価した。U87 細胞は EGFR を内因性に発現しており、 $10^7$  プラーク形成単位 (pfu) の EGFR 標的化 HSV (KNE) を腫瘍内投与することにより有意な抗腫瘍効果を発揮することが確認されている細胞株である (Uchida et al., Mol Ther. 2013)。

本モデルにおける腫瘍体積が約  $300 \text{ mm}^3$  に達した際に、KGNE および KGNE-BhKt を腫瘍内投与した (図 3)。その結果、 $10^2$  pfu の KGNE 投与群は PBS 投与群と比較して有意な抗腫瘍効果を発揮しなかったのに対して、 $10^3$  pfu の KGNE 投与群は有意な抗腫瘍効果を発揮した。一方、

驚くべきことに、KGNE-BhKt 投与群は、 $10^1$  pfu というごくわずかの投与量でも腫瘍の退縮がみられた。これらの結果から、BhKt 変異の導入により、in vivo における RR-oHSV の抗腫瘍効果が著明に増強することが示唆された。

### (2) より巨大な皮下腫瘍モデルに対する腫瘍内投与による抗腫瘍効果の比較

上述の検討により KGNE-BhKt が KGNE に比べて優れた抗腫瘍効果を発揮し得ることが示唆されたことを踏まえ、他の研究グループによる過去の報告において治療対象とされている腫瘍よりも巨大な腫瘍に対しても、KGNE-BhKt の腫瘍内投与による抗腫瘍効果がみられるか否かを検討することとした。腫瘍体積が約  $780 \text{ mm}^3$  に達した時点で  $10^7$  pfu の KGNE および  $10^2$  pfu の KGNE-BhKt を腫瘍内投与し、その後の抗腫瘍効果を検討した (図 4)。PBS 投与群では腫瘍内投与から 10 日後の測定で全てのマウスの腫瘍体積がエンドポイントに達した。KGNE 投与群では、6 匹中 5 匹の腫瘍体積が 10 日後にエンドポイントに達し、6 匹中 1 匹の腫瘍体積が

15 日後にエンドポイントに達した。これに対し KGNE-BhKt は、その投与量 ( $10^2$  pfu) が KGNE の 10 万分の 1 であるにも関わらず、6 匹中 5 匹で急速な腫瘍の退縮がみられた。これらのマウスの腫瘍は完全に退縮するに至り、観察期間中に腫瘍の再増大の兆候はみられなかった。これらの結果から、KGNE-BhKt は KGNE よりも 10 万倍以上の抗腫瘍効果を有していることが示唆された。

図3 U87細胞の皮下腫瘍モデルに対する腫瘍内投与による抗腫瘍効果

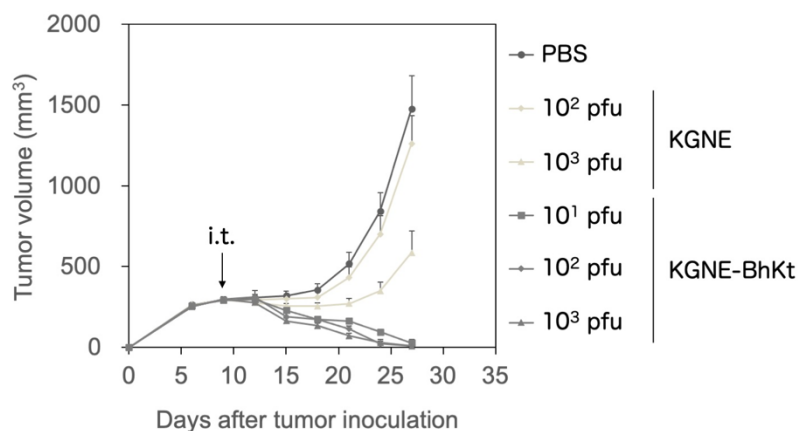
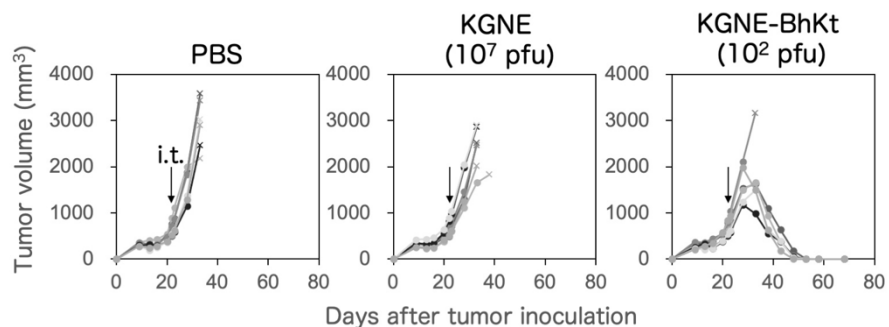


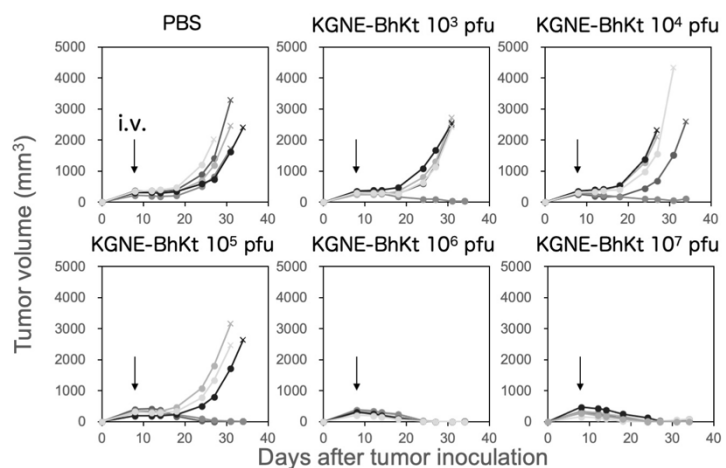
図4 より巨大なU87細胞の皮下腫瘍モデルに対する腫瘍内投与による抗腫瘍効果



### (3) 全身投与による抗腫瘍効果の検討

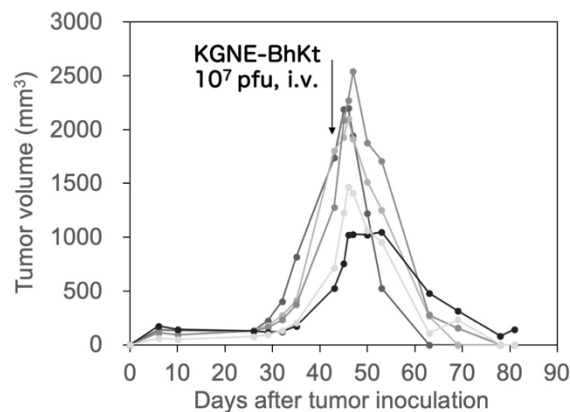
以上の検討により、KGNE-BhKt の腫瘍内投与による格段に高い抗腫瘍効果がみられたため、同様のマウスモデルに対して KGNE-BhKt を静脈内投与した際の抗腫瘍効果を検討することとした。腫瘍体積が約 310 mm<sup>3</sup> に達した際に、10<sup>3</sup> から 10<sup>7</sup> pfu の KGNE-BhKt を尾静脈に投与した (図5)。その結果、10<sup>3</sup> および 10<sup>4</sup> pfu の静脈内投与で 5 匹中 1 匹、10<sup>5</sup> pfu の静脈内投与で 5 匹中 2 匹、10<sup>6</sup> および 10<sup>7</sup> pfu の静脈内投与で全てのマウスで腫瘍の退縮がみられた。

図5 U87細胞の皮下腫瘍モデルに対する静脈内投与による抗腫瘍効果



この検討結果を踏まえ、腫瘍体積が約 500-1,800 mm<sup>3</sup> に達したマウスに KGNE-BhKt を静脈内投与したところ、全てのマウスで急速な腫瘍の退縮がみられた (図6)。この結果から、KGNE-BhKt は腫瘍体積が 1,800 mm<sup>3</sup> に達するほどの巨大な腫瘍をも静脈内投与により退縮させることが示唆された。これらの結果から、受容体標的化改変および膜融合促進変異を施した HSV は、静脈内投与薬としても極めて有望な特性を有することが示唆された。

図6 より巨大なU87細胞の皮下腫瘍モデルに対する静脈内投与による抗腫瘍効果



### (4) 免疫正常マウスにおける抗腫瘍効果の検討

本研究により、受容体標的化改変および膜融合促進変異を施した HSV は生体内で極めて高い抗腫瘍効果を発揮でき、静脈内投与薬としての応用も有望であると考えられた。そこで、これらの検討を免疫正常マウスにて施行してゆくために、ヒトがん細胞株に近似した HSV 感受性を示す同系がん細胞株の選別を試みた。その結果、多くのマウスがん細胞株は著しく HSV 感受性が低く適切なモデルを構築することは困難であることが判明した。しかしながら、いくつかのマウスがん細胞株においてはヒトがん細胞株に比較的近似した HSV 感受性を示すことが明らかとなった。そこで、これらのマウスがん細胞株を免疫正常マウスに移植したモデルを構築し、私たちの標的化 HSV を腫瘍内投与したところ、強力な抗腫瘍効果が認められた。今後は、これを静脈内投与した後の腫瘍組織への送達と抗腫瘍効果の効率について検討してゆく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ikeda Hitomi, Uchida Hiroaki, Okubo Yu, Shibata Tomoko, Sasaki Yasuhiko, Suzuki Takuma, Hamada-Uematsu Mika, Hamasaki Ryota, Okuda Kosaku, Yamaguchi Miki, Kojima Masaki, Tanaka Masato, Hamada Hirofumi, Tahara Hideaki	4. 巻 95
2. 論文標題 Antibody Screening System Using a Herpes Simplex Virus (HSV)-Based Probe To Identify a Novel Target for Receptor-Retargeted Oncolytic HSVs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01766-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01766-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Takuma, Uchida Hiroaki, Shibata Tomoko, Sasaki Yasuhiko, Ikeda Hitomi, Hamada-Uematsu Mika, Hamasaki Ryota, Okuda Kosaku, Yanagi Shigeru, Tahara Hideaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Potent anti-tumor effects of receptor-retargeted syncytial oncolytic herpes simplex virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 265 ~ 276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2021.08.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Miki, Hirai Sachie, Idogawa Masashi, Uchida Hiroaki, Sakuma Yuji	4. 巻 413
2. 論文標題 Anthrax toxin receptor 2 is a potential therapeutic target for non-small cell lung carcinoma with MET exon 14 skipping mutations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 113078 ~ 113078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2022.113078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 がん治療のための腫瘍溶解性ウイルス	発明者 内田宏昭・田原秀晃	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/42526	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 がん治療のための腫瘍溶解性ウイルス	発明者 内田宏昭・田原秀晃	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-553970	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 ONCOLYTIC VIRUS FOR CANCER THERAPY	発明者 内田宏昭・田原秀晃	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、US17/288227	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 ONCOLYTIC VIRUS FOR CANCER THERAPY	発明者 内田宏昭・田原秀晃	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、EP198805350	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山口 美樹  (Yamaguchi Miki)  (10530454)	札幌医科大学・医学部・助教    (20101)	
研究分担者	田原 秀晃  (Tahara Hideaki)  (70322071)	東京大学・医科学研究所・特任教授    (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------