

令和 2 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19468

研究課題名（和文）標的化改変ヘルペスウイルスを用いた造血器腫瘍の治療法開発

研究課題名（英文）Development of oncolytic herpes simplex virus vectors retargeted to hematological malignancies

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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：悪性腫瘍に対する新たな治療法として、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ている。最近、私たちの研究グループの内田らは、HSVのエンベロープに表出する糖タンパク質gDに変異および欠失を施すことにより本来の受容体に結合不能とすると同時に、様々な腫瘍表面抗原に対する単鎖抗体を挿入することにより、標的とする腫瘍細胞のみに効率よく侵入することができる標的化HSVを構築することに成功した。本研究では、この標的化HSVを造血器腫瘍の治療に応用するための基礎検討を行った。その結果、私たちの標的化HSVは、固形腫瘍のみならず造血器腫瘍に対しても有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス（HSV）療法の研究開発はこれまで主に固形腫瘍を対象として進められてきており、これを造血器腫瘍の治療に応用することを目的とした研究はほとんど進められていないのが現状であった。本研究では、私たちの研究グループの内田らが独自に開発した標的化HSVの特長を活かすことにより、造血器腫瘍を対象とした腫瘍溶解性HSV療法の可能性に挑んだ。本研究で得られた成果をさらに発展させてゆくことにより、造血器腫瘍の実地臨床に耐え得る高い治療効果と安全性を両立した新たな治療薬を創出できる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Oncolytic herpes simplex virus (HSV) has become a novel therapeutic modality for malignant diseases. Recently, we reported that HSV entry can be retargeted to cells expressing tumor-associated antigens by insertion of single-chain antibodies into the envelope glycoprotein gD that is detargeted from its canonical receptors. In the current study, we sought to apply our retargeted HSV platform to the development of oncolytic HSV vectors retargeted to hematological malignancies. Retargeted HSV vectors offer an attractive platform for the creation of a new generation of oncolytic HSV with improved efficacy and specificity.

研究分野：がん

キーワード：がん

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、難治性・進行性の悪性腫瘍に対する新たな治療法として、単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus, 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。腫瘍溶解性ウイルス療法とは、何らかの変異を有するウイルスが正常細胞に比べて腫瘍細胞においてより効率よく増殖できることを利用して腫瘍のみを選択的に破壊することを意図した治療法である。2015年には Amgen 社が開発した T-Vec (talimogene laherparepvec, Imlygic) が欧米にて悪性黒色腫を対象とする医薬品として承認されるに至り、本研究分野はますます大きな期待を集めている。しかしながら、これまで腫瘍溶解性 HSV 療法の研究開発は主に固形腫瘍を対象として進められてきており、これを造血器腫瘍の治療に応用することを目的とした研究はほとんど進められていないのが現状である。その主な原因と考えられることとして、そもそも造血器腫瘍の多くが HSV の受容体 (herpesvirus entry mediator および nectin-1) を十分に発現していないために HSV の侵入の段階で抵抗性を示すという可能性が挙げられる。さらに、これに加えて、これまでに開発が進められてきた腫瘍溶解性 HSV は腫瘍細胞だけでなく正常細胞にも侵入してしまうため、ウイルスを全身投与する形での治療に適用することが難しいと判断されてきたという可能性も考えられる。これらの問題はいずれも、腫瘍細胞だけにしか侵入できないように HSV に標的化改変を施すことにより克服される。

最近、私たちの研究グループの内田らは、HSV のがん標的化改変に独自に成功した (Uchida et al., *Current Cancer Drug Targets*, 2018; Okubo et al., *Journal of Virology*, 2016; Shibata et al., *Gene Therapy*, 2016; Uchida et al., *Molecular Therapy*, 2013; Uchida et al., *Journal of Virology*, 2013; Uchida et al., *Journal of Virology*, 2010; Uchida et al., *Journal of Virology*, 2009)。HSV のエンベロープに表出する糖タンパク質 gD に変異および欠失を施すことにより本来の受容体に結合不能となるよう改変すると同時に、epidermal growth factor receptor (EGFR)・carcinoembryonic antigen (CEA)・epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) など異なる腫瘍表面抗原を特異的に認識する単鎖抗体を挿入する (図1) ことにより、ターゲットとする腫瘍細胞のみに効率よく侵入することができる標的化 HSV を構築することが可能となった (図2)。ヒトがん細胞株を移植した免疫不全マウスモデルを用いた動物実験では、標的化 HSV の腫瘍内への直接投与により強力な抗腫瘍効果を認めた。さらに、同様のモデルにおいて、標的化 HSV を尾静脈より全身投与すると腫瘍への強い集積 (正常臓器の 100-1,000 倍) を認めた。加えて、毒性評価においては、この標的化 HSV は野生型 HSV の致死量の 10 万倍の粒子数を脳内に投与してもマウスに異常を生じないという有望な結果を得た。現在、この標的化改変 HSV のプラットフォームを基盤として、幅広く様々なタイプの腫瘍をそれぞれ個別に標的化することが可能な治療システムの構築を目指して研究を進めている。

図1 gD 改変標的化 HSV

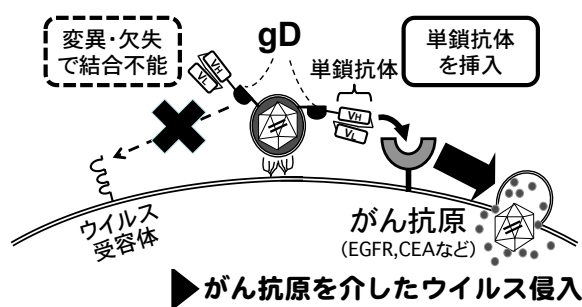
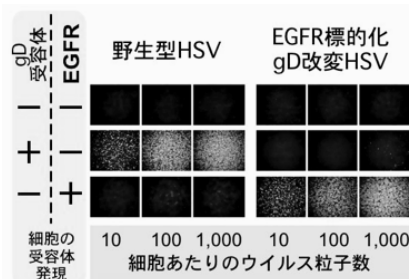


図2 標的化 HSV の特異性
(感染6時間後のウイルス蛋白の免疫染色)



2. 研究の目的

以上のような背景を踏まえ、本研究においては、私たちの標的化改変 HSV のプラットフォームを造血器腫瘍の治療法の開発に応用することを目指した基礎検討を行った。

3. 研究の方法

ヒトの多発性骨髄腫など造血器腫瘍の細胞株 10 種類における HSV 受容体の発現について、フローサイトメトリーにより解析した。次に、これらの細胞株について HSV 感染に対する感受性を評価することを目的に、野生型の gD を持ち EGFP 発現カセットをレポーター遺伝子として

挿入した組換え HSV を MOI 3 の条件で感染させ、その 16 時間後における EGFP の発現を検討した。また、これらの細胞株のうち、ある既知の腫瘍関連抗原を細胞表面に発現している細胞株に着目して、この腫瘍関連抗原を特異的に認識する単鎖抗体を私たちの標的化改変 HSV のプラットフォームに遺伝子工学的に挿入して作製した組換え HSV を感染させ、上述の方法で感染性の検討を行った。

さらに、私たちの研究グループにおいて独自に考案し作製した抗体探索用プローブを用いて、ヒト造血器腫瘍をはじめとする各種ヒトがん細胞株の表面に発現する抗原を認識する抗体のスクリーニングを施行した。具体的には、ヒト造血器腫瘍などの細胞株を BALB/c マウスの腹腔内に複数回投与して免疫した。免疫したマウスの脾細胞をマウス骨髄腫細胞株 P3U1 とポリエチレングリコール法により融合させ、抗体産生ハイブリドーマのライブラリーを作製した。これらに対して独自の抗体探索プローブによるスクリーニングを行い、選抜された抗体が認識する抗原を免疫沈降・質量分析により決定した。

4. 研究成果

フローサイトメトリーにより HSV 受容体が発現しているか否かについて検討した結果、今回の研究において検討したすべてのヒト造血器腫瘍細胞株において HSV 受容体の発現が検出された。その一方で、非常に興味深いことに、野生型の gD を持つ HSV 亜株を感染させる実験を行ったところ、これらのヒト造血器腫瘍細胞株のうち約半数では HSV 感染に対する感受性が認められたが、残りの約半数は HSV 感染に対する抵抗性を示した。また、それらの細胞株における HSV 受容体の発現のレベルと野生型の gD を持つ HSV 感染に対する感受性との間には明らかな相関は見られなかった。これらの研究結果は、HSV の侵入受容体の発現のみが HSV 侵入の可否を規定するとは限らないことを示唆する点で、学術的に意義深い知見をもたらすものと考えられる。今後、これら約半数の細胞株の感染抵抗性がどのようなメカニズムで生じているのかについて検討してゆく予定である。

また、本研究において検討したヒト造血器腫瘍細胞株のうち一部において、ある既知の腫瘍関連抗原が発現していることが判明した。この抗原がヒト造血器腫瘍細胞株に発現していることはほとんど知られていないため注目に値するものと考えられた。そこで、私たちの標的化改変 HSV のプラットフォームにこの抗原を特異的に認識する単鎖抗体を遺伝子工学的に挿入して作製した組換え HSV を感染させる実験を行うこととした。その結果、期待通り、この腫瘍関連抗原を発現する細胞株はすべてこの標的化 HSV に対する感受性を示した一方、この腫瘍関連抗原を発現しない残りの細胞株はすべてこの標的化 HSV に対する抵抗性を示した。これらの研究結果から、この抗原を発現する造血器腫瘍に対して私たちの標的化改変 HSV が新たな治療薬となりうる可能性が示唆された。すなわち、私たちの標的化 HSV の有効性は、これまで報告してきた固形腫瘍を対象とした場合のみではなく、造血器腫瘍を対象とした場合においても発揮される可能性があると考えられた。

さらに、私たちの研究グループにおいて考案した抗体探索プローブを用いて、ヒト造血器腫瘍などの各種ヒトがん細胞株の表面に発現する抗原を特異的に認識するがん標的化治療用の抗体の機能的スクリーニングを施行した結果、すでにごん標的化治療のターゲットとして注目されてきた分子を含め、正常細胞よりも腫瘍細胞に高発現する表面抗原を特異的に認識する新たな抗体を複数取得することに成功した。今後はこれらの抗体のヒト正常細胞に対する反応性を検討し、腫瘍選択性の高い抗体を私たちの標的化改変 HSV のプラットフォームに適用してゆきたいと考えている。

本研究では、私たちのグループが開発した標的化 HSV のプラットフォームの特長を活かし、これまででは研究開発が進んでこなかった造血器腫瘍を対象とした腫瘍溶解性 HSV 療法の可能性についての基礎検討を進めた。本研究で得られた成果をさらに発展させてゆくことにより、造血器腫瘍の実地臨床に耐え得る高い治療効果と安全性を両立した新たな治療薬を創出できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okamoto Hayato, Yoshimatsu Yasuhiro, Tomizawa Taishi, Kunita Akiko, Takayama Rina, Morikawa Teppei, Komura Daisuke, Takahashi Kazuki, Oshima Tsukasa, Sato Moegi, Komai Mao, Podyma-Inoue Katarzyna A., Uchida Hiroaki, Hamada Hirofumi, Fujiu Katsuhito, Ishikawa Shumpei, Fukayama Masashi, Fukuhara Takeshi, Watabe Tetsuro	4. 巻 9
2. 論文標題 Interleukin-13 receptor 2 is a novel marker and potential therapeutic target for human melanoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-39018-3	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 Yamada Shinji, Itai Shunsuke, Furusawa Yoshikazu, Sano Masato, Nakamura Takuro, Yanaka Miyuki, Handa Saori, Hisamatsu Kayo, Nakamura Yoshimi, Fukui Masato, Harada Hiroyuki, Mizuno Takuya, Sakai Yusuke, Ogasawara Satoshi, Murata Takeshi, Uchida Hiroaki, Tahara Hideaki, Kaneko Mika K., Kato Yukinari	4. 巻 37
2. 論文標題 Detection of Tiger Podoplanin Using the Anti-Cat Podoplanin Monoclonal Antibody PMab-52	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 224 ~ 228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2018.0033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanemura Takashi, Miyata Hiroshi, Makino Tomoki, Tanaka Koji, Sugimura Keiji, Hamada-Uematsu Mika, Mizote Yu, Uchida Hiroaki, Miyazaki Yasuhiro, Takahashi Tsuyoshi, Kurokawa Yukinori, Yamasaki Makoto, Wada Hisashi, Nakajima Kiyokazu, Takiguchi Shuji, Mori Masaki, Doki Yuichiro, Tahara Hideaki	4. 巻 109
2. 論文標題 Immunoregulatory influence of abundant MFG-E8 expression by esophageal cancer treated with chemotherapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3393 ~ 3402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13785	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 TANAKA TOSHIHIRO, UCHIDA HIROAKI	4. 巻 38
2. 論文標題 Inhibition of Survivin by Adenovirus Vector Enhanced Paclitaxel-induced Apoptosis in Breast Cancer Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4281 ~ 4288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.12725	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Shinji, Kaneko Mika K., Itai Shunsuke, Chang Yao-Wen, Nakamura Takuro, Yanaka Miyuki, Ogasawara Satoshi, Murata Takeshi, Uchida Hiroaki, Tahara Hideaki, Harada Hiroyuki, Kato Yukinari	4. 巻 37
2. 論文標題 Epitope Mapping of Monoclonal Antibody PMab-48 Against Dog Podoplanin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 162 ~ 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2018.0006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2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2018-203553	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔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	田原 秀晃 (Tahara Hideaki) (70322071)	東京大学・医科学研究所・特任教授 (12601)	