

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：14101
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20H03529
研究課題名(和文) T細胞共刺激膜貫通リガンド蛋白搭載ウイルスベクター開発と革新的癌治療法への応用
研究課題名(英文) Development of T cell costimulatory ligand-carrying viral vector for anticancer therapy
研究代表者
野阪 哲哉 (Nosaka, Tetsuya)
三重大学・医学系研究科・教授
研究者番号：30218309
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：がんの免疫療法が注目されているが、現時点では効果は限定的である。我々は、マウス同種移植の実験系を用いて、投与部位のみならず遠隔部位の腫瘍も縮小・退縮させるT細胞活性化抗腫瘍ウイルスを開発した。遺伝子/蛋白同時搭載型RNAウイルスベクターBC-PIVにT細胞共刺激分子リガンドを搭載したもので、T cell-signaling anti-tumor virus (TAV)と名付けた。搭載リガンドとしてGITRLとOX40Lをtandemに挿入したものがTAVとして最も強い活性を示し、遠隔部位も含めて腫瘍を消失させた。さらに抗PD-1抗体の作用を増強させるケモカイン、サイトカインも同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
がんの克服は人類に残された大きな課題であり、免疫チェックポイント阻害剤(ICI)の開発はがんの治療に大きな革命をもたらしたが、いまだ全てのがんが治るわけではない。現在使用されているICIはがん免疫の「ブレーキ」解除薬である。我々は基礎実験段階であるが、がん免疫の「アクセル」増強薬を開発した。さらに、これらブレーキ解除、アクセル増強に加えてがん細胞を殺すT細胞の疲弊を防ぎ、働き場所に遊走しやすくする補助剤が抗がん作用において大きな効果を持つことを見出した。これらは実用化を目指して社会実装の準備中であるが、実現すれば医学的貢献にとどまらず、医療経済の効果も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cancer therapy entered a new era after development of immune checkpoint inhibitors. However, they cannot always kill cancer cells completely, and researchers are trying to develop agents that synergize to eradicate cancers. We generated a T cell-signaling anti-tumor virus (TAV) by using a novel RNA viral vector BC-PIV which we developed as a gene/protein dual carrier in collaboration with BioComo Inc. TAV was able to induce regression of autologously transplanted tumor cells after intratumoral injection not only on the injected, but also on the distant site. By screening of the T cell co-stimulatory ligands, we found that BC-PIV/GITRL-OX40L was the most effective TAV among the ligands when introduced into BC-PIV. However, TAV is not a panacea because TAV function depends on the timing of the expression of T cell costimulatory receptors. Therefore, we searched helper agents, and co-injection of BC-PIV/cytokine A and BC-PIV/chemokine B was found to synergize with the anti-PD-1 antibody.

研究分野：分子生物学、ウイルス学、免疫学、内科学

キーワード：T細胞共刺激分子 ウイルスベクター 抗腫瘍ウイルス 細胞傷害性T細胞 腫瘍免疫 OX40 4-1BB GITR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、PD-1、CTLA-4 という T 細胞における負のシグナルを阻害する抗体医薬ががんの免疫療法として脚光を浴びているが、OX40、4-1BB 等腫瘍壊死因子受容体 (TNFR) スーパーファミリー分子を介した正のシグナルを活性化するアゴニスト抗体も注目されている。しかし、後者は作用が強力にて、肝毒性など、克服すべき問題点も多く、次なるブレイクスルーが求められている。

我々は過去に、健常成人にはほとんど病原性を示さない呼吸器系ウイルスであるヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) をベクター化し、地元ベンチャー企業バイオコモ株式会社 (福村正之 代表取締役、大塚 順平 研究開発部長) と共同で、F 遺伝子欠損による自立増殖能欠損型 hPIV2ΔF (BC-PIV と命名) ベクター及び BC-PIV 増殖用のパッケージング細胞 Vero/BC-F を樹立した (Ohtsuka J. *et al.*, Gene Ther 21: 775-784, 2014、日米欧中

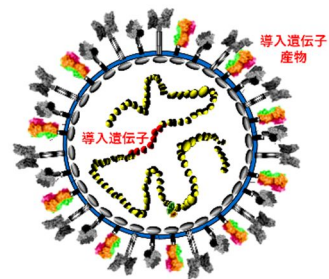


図1 BC-PIV

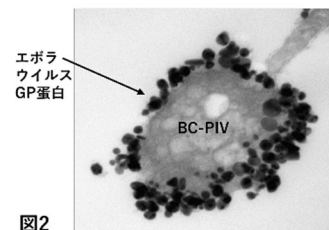


図2

で特許成立済み) BC-PIV は非常に強力な外来遺伝子発現能に加えて、ウイルス骨格自体がアジュバント活性を内包し、ヒト樹状細胞を成熟させる効果も併せ持つ (Hara K. *et al.*, Hum Gene Ther 24: 683-691, 2013)。このベクターシステムは、外来遺伝子を運搬・発現するのみならず、外来蛋白を高次構造維持状態でウイルスエンベロープ上に搭載することができる (Ohtsuka J. *et al.*, Sci Rep 9: 12901, 2019、日米中で特許成立済み、欧は対応中) (図 1)。我々は同技術を用いて、安全性・有効性の高い、筋肉注射エボラウイルスワクチン (Ohtsuka J. *et al.*, Sci Rep 9: 12901, 2019) (図 2) と経鼻 COVID-19 ワクチン (Ohtsuka J. *et al.*, iScience 24: 103379, 2021) の開発に既に成功している。

この間、本庶 佑 博士がノーベル賞を受賞される 2018 年の初頭に、注目すべき論文が米国から発表された。マウス実験において PD-1、PD-L1 抗体を含む免疫チェックポイント抗体、T 細胞の活性化を担う TNFR スーパーファミリー分子に対するアゴニスト抗体のうち、CpG アジュバントとともに用いた OX40 アゴニスト抗体の腫瘍内投与が最も効果が高く、非投与部位の腫瘍も含めた腫瘍消失効果が得られたという衝撃的なものだった (Sagiv-Barfi I. *et al.*, Sci Transl Med 10: eaan4488, 2018)。我々は、BC-PIV のエンベロープ上に OX40、4-1BB のリガンド (L) である OX40L、4-1BBL 蛋白 (マウス由来) を各々搭載したものを作製し、同種移植担がんマウスに局所投与したところ、投与部位のみならず遠隔部位にも劇的な抗腫瘍効果が得られ、肝障害などの明らかな副作用は見られなかった (T 細胞活性化抗腫瘍ウイルス、T cell-signaling anti-tumor virus; TAV と命名、未発表データ)。本研究では、T 細胞活性化を担う TNFR 型共刺激分子に対するリガンドを単独また複数 BC-PIV 上に各々 3 量体膜貫通蛋白として搭載、最も有効性・安全性の高い分子を同定し、T 細胞の生理的活性化シグナルを誘導する抗腫瘍ウイルスとしてがん治療への応用を検討することとした。

2. 研究の目的

OX40L、4-1BBL、GITR (Glucocorticoid-induced TNFR-related protein) L、CD30L、CD70 (CD27L) の 5 種類の T 細胞共刺激分子リガンドのうち、どのリガンド (の組み合わせ) が最も強い抗腫瘍効果を示すのかを明らかにし、負の免疫を阻害する免疫チェックポイント阻害剤のみではすべ

てをカバーできないがん免疫療法に正の免疫を活性化するための新たな選択肢を加え、がんの治癒に寄与することが目的である。

3. 研究の方法

上記 5 種のリガンドを各々単独もしくは 2 種共発現する BC-PIV を作製し、抗腫瘍効果を解析した。具体的には、B16F10 メラノーマ、CT26 大腸がんの 2 種のマウス固形がん細胞をそれぞれ同系統マウスの複数個所に同種移植し、5 ~ 7 mm 径に増殖した時点でがん組織の

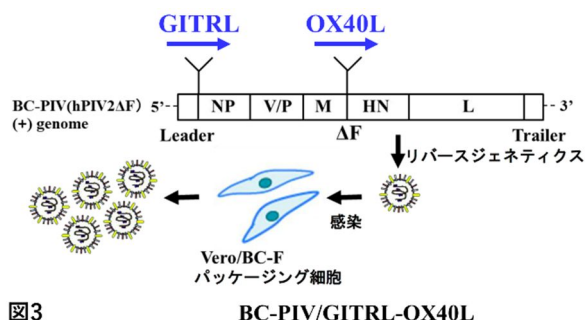


図3

BC-PIV/GITRL-OX40L

1ヵ所に TAV を隔日で 3 回腫瘍内投与 (1 回あたり $6 \times 10^7 \sim 2.4 \times 10^6$ PFU in 50 μ L PBS) し、投与部位、遠隔部位の腫瘍が縮小・退縮するか、観察する。コントロールとして空ベクター BC-PIV、PBS のみも投与する。陽性コントロールとして、抗 OX40 アゴニスト抗体 + CpG を投与する。各グループ、最低 5 匹のマウスを用いる。BC-PIV に挿入する外来遺伝子となる T 細胞共刺激分子はマウス OX40L、4-1BBL、GITRL、CD30L、CD70 (CD27L) である。これら 5 コンストラクトに搭載された蛋白の発現を Western blot 解析によって確認した後、各々担がんマウスに投与し、有効性・安全性の高い 2 分子を選別する。この 2 分子に関しては、縦列同時挿入型も、前後を入れ替えた 2 通りの方式で作製する。遺伝子挿入部位は BC-PIV における cloning site (CS) 1、2 を用いる (図 3 は一例; polycistronic genome における極性効果により、前に位置する CS1 に挿入した遺伝子の方が CS2 への挿入より発現が強い)。以上の 4 コンストラクト (単独型 2 個、縦列型 2 個) の中から有効性・安全性の面で最も優れているものを最終候補物とする。当該蛋白のウイルス上への搭載量が少ない場合は、hPIV2 HN 蛋白の細胞質ドメインとのキメラ型蛋白として搭載する。

また、必要に応じて免疫・分子生物学的解析、及びアジュバント補完実験も行う。

4. 研究成果

CT26 細胞の実験系では GITRL と OX40L による両受容体の同時活性化が抗腫瘍効果において最も優れていることを見出し、BC-PIV/GITRL-OX40L と名付けた (図 3、4)。BC-PIV/GITRL-OX40L は

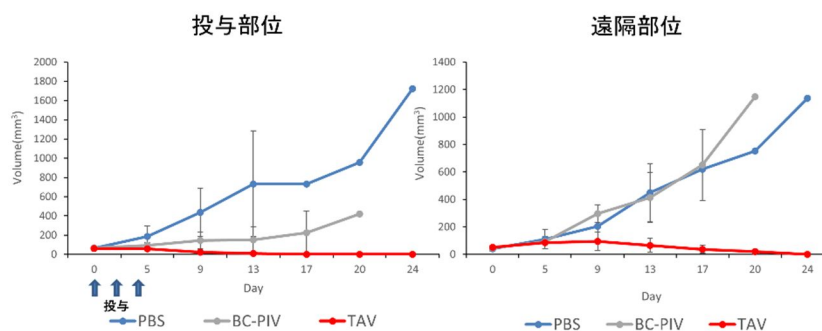


図4. BC-PIV/GITRL-OX40L (TAV) による抗腫瘍効果

CT26 細胞の移植による腫瘍を注入部位、遠隔部位とも完全消退させることができた (2.4×10^6 PFU のウイルスを 1 日おきに片側に 3 回投与)。並行して、TAV の分子生物学的、免疫学的解析として、市販の各種受容体蛋白を用いた ELISA によるリガンド-受容体結合を検出した。また、ネイティブ PAGE を用いた Western blot 法によって、各膜貫通型リガンド蛋白が 3 量体として組換えウイルス粒子上に搭載されていることも確認した。一方、B16F10 細胞は腫瘍内部の流動性が高く、移植実験での効果判定が困難であったが、BC-PIV/GITRL-OX40L 単独では腫瘍を消退させ

ることができなかつた。しかし、我々が開発中の BC-IMA (ある種の食用植物に共生する細菌のリポ多糖、三重大学・バイオコモで出願し、国内特許成立済み) の B16F10 腫瘍への共投与実験では、注入部位の腫瘍は消退させた。BC-IMA の単独投与自体にも抗腫瘍効果があったが、一定期間後、再増殖を伴った。B16F10 細胞で効果が弱い一つの原因として、腫瘍内部の流動性によりベクターの停留時間が短いことが考えられた。実際、ベクターを投与する際の基剤に粘稠性を持たせると、抗腫瘍効果が増強した(未発表データ)。BC-PIV/GITRL-0X40L は TAV として著効を示すが、リガンドに対する各受容体の発現が一過性であるために、これらシグナルを介した抗腫瘍効果を得るための投与タイミングの見極めが容易ではないことが明らかになってきた。さらに、細胞傷害性 T 細胞の疲弊の問題もある。一方、現在のヒトのがん免疫療法では、PD-1 系の阻害薬とのコンビネーションで広く効果を示す「万能抗がん剤」の開発が求められている。我々は CT26 細胞移植モデルを用いて BC-PIV/0X40L と抗マウス PD-1 抗体の共投与の効果を調べたところ、増強効果がないことが判明した。そこで、各種サイトカイン、ケモカインを BC-PIV を用いて発現させるベクターを作製し、CT26 細胞を使った抗マウス PD-1 抗体との共投与実験(単独または複数投与での抗マウス PD-1 抗体との共投与)を行ったところ、抗マウス PD-1 抗体と非常に相性の良いサイトカイン、ケモカイン(の組み合わせ)を同定することができた。すなわち、アクセルを踏み込むタイミングを見極めることは むずかしいが、アクセルを無理に踏みこまずとも、ブレーキを解除した状態で、実行部隊が疲弊せず、効率よく現場へ直行できる状態を誘導すれば、安定した抗腫瘍効果が得られることが判明した(米国特許仮出願中)。以上の結果は現在のオブジーボなどの奏効率を飛躍的に上昇させる可能性を示唆しており、興味深い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 野阪哲哉	4. 巻 54 (Suppl)
2. 論文標題 新型コロナウイルスに対する次世代型鼻スプレーワクチン開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 脳と発達	6. 最初と最後の頁 S89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Ohtsuka J, Imai M, Fukumura M, Maeda M, Eguchi A, Ono R, Maemura T, Ito M, Yamayoshi S, Kataoka Y, Kawaoka Y, Nosaka T	4. 巻 24
2. 論文標題 Non-propagative human parainfluenza virus type 2 nasal vaccine robustly protects the upper and lower airways against SARS-CoV-2.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103379	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 該当する
1. 著者名 D'Alessandro-Gabazza CN, Yasuma T, Kobayashi T, Toda M, Abdel-Hamid AM, Fujimoto H, Hataji O, Nakahara H, Takeshita A, Nishihama K, Okano T, Saiki H, Okano Y, Tomaru A, D'Alessandro VF, Shiraishi M, Mizoguchi A, Ono R, Ohtsuka J, Fukumura M, Nosaka T, et al. & Gabazza EC	4. 巻 13
2. 論文標題 Inhibition of lung microbiota-derived proapoptotic peptides ameliorates acute exacerbation of pulmonary fibrosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 1558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-29064-3.PMID: 35322016	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 該当する
1. 著者名 Sawaki A, Miyazaki K, Yamaguchi M, Takeuchi T, Kobayashi K, Imai H, Tawara I, Ono R, Nosaka T, Katayama N.	4. 巻 111
2. 論文標題 Genetic polymorphisms and vincristine-induced peripheral neuropathy in patients treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone therapy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 686-691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02832-x	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 Ono R, Masuya M, Inoue N, Shinmei M, Ishii S, Maegawa Y, Mahrjan BD, Katayama N, Nosaka T.	4. 巻 16(3)
2. 論文標題 Tet1 is not required for myeloid leukemogenesis by MLL-ENL in novel mouse models.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0248425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0248425	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 小笠良一、野阪哲哉	4. 巻 78 増刊号3
2. 論文標題 血液腫瘍モデル動物の現状と展望. In: 金倉謙 編集. 造血器腫瘍学(第2版)-基礎と臨床の最新研究動向 - . II. 造血器腫瘍の基礎	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 152-158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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3件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野阪哲哉
2. 発表標題 新型コロナウイルスに対する次世代型鼻スプレーワクチン開発
3. 学会等名 第64回日本小児神経学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野阪 哲哉、福村 正之、大塚 順平
2. 発表標題 ワクチン開発と今後の課題
3. 学会等名 第31回日本産業衛生学会全国協議会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryoichi Ono, Masahiro Masuya, Makoto Shinmei, Satomi Ishii, Yuri Maegawa, Bishnu Devi Maharjan, Naoyuki Katayama, Tetsuya Nosaka
2. 発表標題 Tet1 is not necessarily essential for MLL-ENL-induced myeloid leukemia
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 固形がんに対し免疫チェックポイント阻害剤を増強するペイロードを導入した非増殖型hPIV2ベクター	発明者 福村正之、大塚順平、松川泰久、野阪哲哉、大塚智美	権利者 バイオコモ、三重大
産業財産権の種類、番号 特許、63/449.055	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 SARS-CoV-2 vaccine	発明者 野阪、小埜、河岡、今井、山吉、福村、大塚	権利者 三重大、東大、バイオコモ
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/026368	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>三重大学大学院医学系研究科 感染症制御医学・分子遺伝学分野 https://www.medic.mie-u.ac.jp/microbiol/ 三重大学卓越型研究施設 次世代型VLPワクチン研究開発センター https://www.mie-u.ac.jp/research/vlp-vakzin/</p>

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------