

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19911

研究課題名（和文）反復血管内投与可能なステルス型がん治療用ウイルス製剤の開発

研究課題名（英文）Systemic delivery of oncolytic vaccinia virus to tumors

研究代表者

中村 貴史（NAKAMURA, Takafumi）

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：70432911

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ワクシニアウイルスの宿主由来外膜に覆われた感染粒子に着目し、外膜上の宿主免疫の標的となっているウイルス膜蛋白を欠失することで元来の免疫回避能をさらに向上させ、かつウイルス産生に関与するウイルス蛋白に変異を導入することで産生効率を向上させた。これらの改良と併せて簡便で効率の良い製造工程を構築することによって高力価ウイルス液を調製することに成功し、マウスにおいて血管内投与により腫瘍に到達できるステルス型腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス療法は、局所療法が全身のがんにも治療効果を及ぼす革新的がん治療法であるが、ウイルス製剤の投与経路は主に腫瘍内であるため、体表にあるがんや超音波・CTガイド下で投与可能ながんに限定される。この問題を克服すべく本研究では、血管内投与により腫瘍に到達できるステルス型腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを提案し、マウスモデルを用いて、あらゆるがん種をウイルス療法の対象とするための基盤技術となり得ることを示した。

研究成果の概要（英文）：Based on the property of vaccinia virion covered with a host-derived outer membrane, partial deletion of glycoprotein enhanced neutralization escape without affecting the oncolytic potency of the virions, and introduction of mutation into viral protein increased productivity of the virions. By combining these improvements with the construction of a simple and efficient manufacturing process, we successfully prepared high titer solution of the virions and showed the possibility of systemic delivery of oncolytic vaccinia virus to tumors in mice.

研究分野：遺伝子治療学

キーワード：がん ウイルス療法 免疫回避 ドラッグデリバリー

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生きたウイルスを利用したがんウイルス療法は、感染した細胞・組織内で増殖伝播しながらそれらを死滅させるウイルス本来の性質をがん治療に利用する方法であり、従来の化学療法や放射線療法と比較して、様々なメカニズムによって腫瘍を攻撃できる利点がある。第一に感染したがん細胞・組織内で増殖伝播しながら、それらをアポトーシスやネクローシスを介して腫瘍溶解・死滅させる。第二にそれに伴う細胞性免疫の賦活化など多様な作用機序によって抗がん効果を発揮する。

本療法は、1900年代の初めから始まっていたが、当時は野生型に近いウイルスをがん患者に投与していたので、安全性の観点に問題があった。ところが今日、遺伝子工学技術や、ウイルス及びがんの分子病態解析が発展し、ウイルスが元来持っている正常組織に対する病原性を排除し、ウイルスをがん細胞だけで増殖させることが可能になった。これまで申請者も、様々なウイルスを基にして、腫瘍のみを標的破壊する腫瘍溶解性ウイルスの開発に成功してきた。

がんウイルス療法による局所療法が全身に治療効果を発揮するという、既存のがん治療法にはない新しい概念が実証されたことより、米国で2015年に悪性黒色腫、本邦で2021年に悪性神経膠腫に対する腫瘍溶解性ヘルペスウイルスが承認された。先進国でウイルス療法薬が誕生した現在、今後がん治療の選択肢にウイルス療法が加わることが予想される。しかしながら、ウイルス製剤の投与経路は主に腫瘍内であるため、体表にあるがんや超音波・CTガイド下で投与可能ながんに限定される。

2. 研究の目的

ワクシニアウイルスは増殖過程において、大部分が細胞内成熟ウイルス (IMV) という粒子形態をとるが、全体の数%、IMVが宿主由来の外膜に覆われた細胞外性被覆ウイルス (EEV) となる。この構造により、血中で容易に中和される IMV は腫瘍内投与に使われ、中和され難い EEV は血管内投与に適すると考えられている。そこで本研究では、この EEV の特性に着目し、この免疫回避能をさらに向上させるとともに、EEV の産生量が低いため十分な量のウイルス製剤が調製できない問題を克服することによって、血管内投与により腫瘍に到達できるステルス型腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの創出を目指す。

3. 研究の方法

(1) 宿主免疫回避能の増強

EEV は血中で中和され難い特性を持つが、EEV 外膜上のウイルス膜蛋白 B5R が依然宿主免疫の標的となっている。そこで標的となる4つの SCR を欠失したウイルス Δ EEV を作製し、抗ワクシニアウイルス血清と混合した後、卵巣がん A2780 細胞への感染能をウイルスに導入した GFP 蛍光発現によって評価した。

(2) EEV の産生効率の向上

EEV の産生効率を上げるため、EEV の産生に関与するウイルス蛋白に変異を導入した Δ EEVmut を作成し、肺がん A549 細胞における産生量を評価した。

(3) EEV の大量産生法の確立

EEV は、感染細胞の上清に放出されるため、通常の前製法である密度勾配遠心法は不向きである。そこで細胞密度、ウイルス量 (MOI)、ウイルス感染細胞の培養時間をパラメータとして EEV ウイルスの産生条件を最適化するとともに、多量の上清ウイルス液を処理できる閉鎖系精製法を構築した。

(4) マウスにおける評価

C57BL/6 マウスにおいて 2×10^8 pfu の Δ EEVmut、または IMV を静脈投与し、各タイムポイントで採血し血中のウイルスのコピー数を測定することによって、各ウイルスの血中滞留性を評価した。さらに担がんモデルマウスにおいて同様に静脈内投与し、その後の生体内におけるウイルス増殖を評価した。

4. 研究成果

(1) 宿主免疫回避能の増強

Δ EEV は EEV よりも明らかに抗血清による中和を逃れながら感染・増殖・伝播した。一方、正常な B5R をもつウイルス由来の IMV、または B5R 部分欠損したウイルス由来の Δ IMV は、予想通り両方とも免疫回避能は示さなかった (図1)。

(2) EEV の産生効率の向上

A549 細胞における Δ EEVmut の産生量は、従来の EEV と比較して約 20 倍増加させることに成

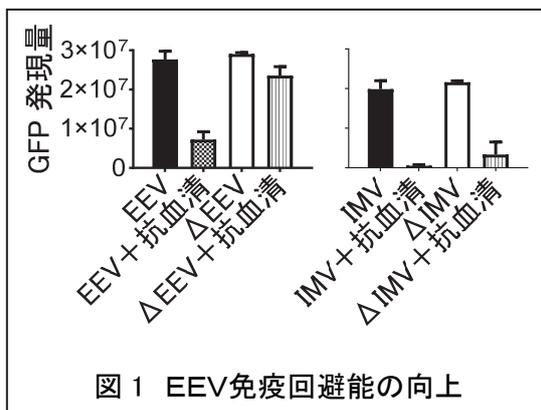
功した。

(3) EEV の大量産生法の確立

EEV は従来 10^7 pfu/ml の力価しか得られなかったが、新たに構築した製造工程により IMV に匹敵する高力価 EEV (10^9 pfu/ml) の調製を完了した。

(4) マウスにおける評価

マウスにおいて静脈投与した Δ EEVmut は IMV と比較して血中滞留性が向上した ($P < 0.01$)。また担がんモデルマウスにおいて、静脈投与後の Δ EEVmut は IMV と比較して腫瘍における高いウイルス増殖を示した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurosaki H, Nakatake M, Sakamoto T, Kuwano N, Yamane M, Ishii K, Fujiwara Y, Nakamura T	4. 巻 10
2. 論文標題 Anti-Tumor Effects of MAPK-Dependent Tumor-Selective Oncolytic Vaccinia Virus Armed with CD/UPRT against Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 985
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10050985	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6件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中村貴史
2. 発表標題 次世代がん治療用遺伝子組換えワクシニアウイルスの開発と臨床展開
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nakamura T
2. 発表標題 Next-generation oncolytic vaccinia virus for cancer immuno-virotherapy
3. 学会等名 Cell & Gene Therapy and Cancer Immunotherapy Asia（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nakatake M, Kurosaki H, Nakamura T
2. 発表標題 Combination of fusogenic oncolytic vaccinia virus and HDAC inhibitor treatment synergistically induces anti-cancer effect through enhancing viral cell-cell fusion
3. 学会等名 第28回日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nakatake M, Kuwano N, Kaitsurumaru E, Kurosaki H, Nakamura T
2. 発表標題 Fusogenic oncolytic vaccinia virus increases immune checkpoint blockade sensitivity by remodeling the tumor immune microenvironment
3. 学会等名 14th International Oncolytic Virotherapy Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nakamura T
2. 発表標題 Novel Poxvirus Vectors
3. 学会等名 24th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村貴史
2. 発表標題 日本発がん治療用ウイルスによる次世代バイオ創薬
3. 学会等名 日本薬学会創薬セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中村貴史	4. 発行年 2023年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 腫瘍内科：特集 新しいがん免疫療法研究の展開と臨床応用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

鳥取大学医学部医学科 ゲノム再生医学講座 ゲノム医療学分野
<https://www.med.tottori-u.ac.jp/introduction/medicine/about/3318/3708/27470.html>

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