

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号： 32659
 研究種目： 研究活動スタート支援
 研究期間： 2011～2012
 課題番号： 23800058
 研究課題名（和文） 標的化ヘルペスウイルスベクターと抗体テクノロジーの融合
 研究課題名（英文） Application of in-house monoclonal antibody resources to a fully retargeted oncolytic herpes simplex virus platform

研究代表者

内田 宏昭 (UCHIDA HIROAKI)
 東京薬科大学・生命科学部・准教授
 研究者番号： 20401250

研究成果の概要（和文）： 私たちは遺伝子治療ベクターの開発に汎用される単純ヘルペスウイルス（HSV）の癌標的化改変に独自に成功した。また私たちは癌に対するモノクローナル抗体を多数樹立してきた。これらの抗体を標的化 HSV 系へ適用したところ、それぞれ該当する癌抗原に依存した高効率の標的化エントリーが観察された。本研究成果は、癌標的化抗原・抗体セットのインハウスリソースを独自の標的化改変 HSV プラットフォームに適用可能であることを示す。

研究成果の概要（英文）： We have reported a fully retargeted herpes simplex virus (HSV) platform that incorporates single-chain antibodies to mediate virus entry exclusively via tumor-associated antigens. For further development of this system, we successfully took advantage of our own collection of monoclonal antibodies directed against human cancers. Our results indicate the adaptability of our system to different targeting ligands, leading to a new generation of broadly applicable and effective oncolytic HSV vectors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野： 医学

科研費の分科・細目： 医歯薬学・臨床腫瘍学

キーワード： 遺伝子治療、癌、腫瘍溶解ウイルス療法、単純ヘルペスウイルス、抗体医薬

1. 研究開始当初の背景

最近、癌に対する分子標的治療法として抗体医薬の有望性が再認識され、臨床研究が精力的に進められている。癌細胞にしか発現しない理想的な癌標的分子を同定し、それを高効率で認識する抗体を樹立することが切望されているが、成功例は未だ限定的である。また、次世代バイオセラピーとして期待され

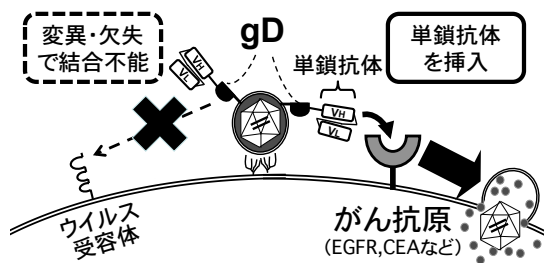
ている癌の遺伝子治療・ウイルス療法の開発においては、癌細胞だけにしか侵入せず、正常細胞には影響を与えないよう改変された標的化ベクターの開発を目指すべきだが、実用化されたものは国内外ともに皆無である。

私たちはこれまで、①抗体結合変異型アデノウイルスの癌細胞への抗体依存的な感染効率を指標としたスクリーニング系、②抗体

にタンパク合成阻害毒素を結合させたイミュノトキシン (Antibody-drug conjugate, ADC) の癌細胞殺傷効果を指標としたスクリーニング系を考案し、癌標的化治療のターゲット分子の新たな探索・同定を進めてきた。これら2種類の異なる抗体スクリーニング法を駆使し、様々なタイプの癌細胞株で免疫したマウスを用いて得られた抗体ライブラリーから系統的に癌標的化抗原・抗体セットを探索することにより、新規の標的化抗原・抗体セットをさらに同定してゆける可能性が大いに示唆された。

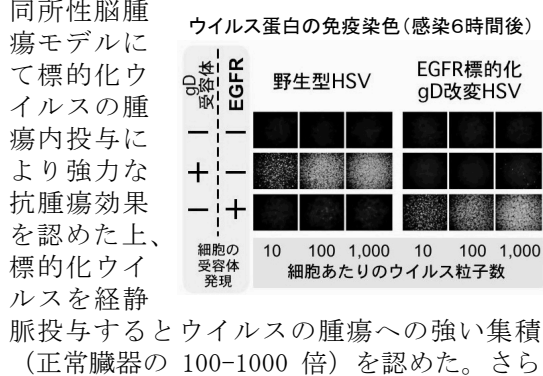
また、私たちはごく最近、ウイルス療法などの臨床研究に応用されている単純ヘルペスウイルス (HSV) の標的化改変に成功した。HSV 表面の糖タンパク D (gD) に変異・欠失を施すことにより、HSV の宿主域 (トロピズム) を改変することが可能であることを証明した (Uchida et al. J Virol. 2009)。さらに、HSV の細胞侵入効率を格段に高める糖タンパク B (gB) のハイパー変異を同定した (Uchida et al. J Virol. 2010)。そこで、ハイパー-gB 変異を施した HSV の gD に癌抗原を認識する単鎖抗体を組み込むことにより、標的細胞だけに高効率に侵入でき、癌細胞を殺傷しうる標的化 HSV の樹立に成功した。プロトタイプとして上皮成長因子受容体 (EGFR) をターゲットとした標的化 HSV を作製した (図1)。その結果、標的とする EGFR

図1 HSVの標的化改変



を発現する細胞のみに侵入する標的化ウイルスとなり、しかもその感染効率は、野生型 HSV が本来の受容体を介して侵入するレベルにまで達した (図2)。動物実験ではマウス皮下および

図2 標的化HSVの特異性



にマウス脳内投与後の毒性評価では、標的化ウイルスは野生型ウイルスの致死量の 10 万倍の粒子数を投与してもマウスに異常を生じなかった。

2. 研究の目的

このように、私たちが開発した標的化 HSV のターゲット分子特異性はきわめて高いため、あとは癌細胞しか認識しない理想的な標的化抗体さえ得られれば、癌だけを狙い撃ちして強力に殺傷できる画期的なウイルス製剤の開発は十分に実現可能である。

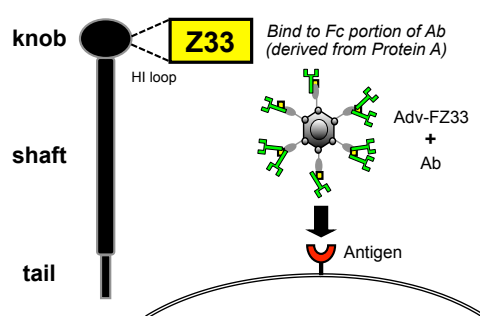
そこで本研究では、私たち独自の抗体スクリーニング系を駆使して、新たな癌標的化抗原・抗体のセットを系統的に探索するとともに、そのリソースを標的化 HSV プラットフォームに総動員することにより、臨床応用が可能な標的化バイオ医薬の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) アデノウイルス (Adv-FZ33) 系による標的分子の系統的探索

難治癌の治療法の開発にとって、選択的な治療薬剤の導入の戦略を編み出すことが鍵である。私たちは、腫瘍の標的化に好適な表面抗原はどのような分子かという疑問に答えることを目指して、黄色ブドウ球菌プロテイン A 由来の抗体結合 Z33 モチーフを Ad5 ファイバーノブ内の HI ループに持つアデノウイルス Adv-FZ33 を作製し、抗体を介した細胞への遺伝子導入発現量を測定し、高い標的化をもつ抗体を選別した (図3)。

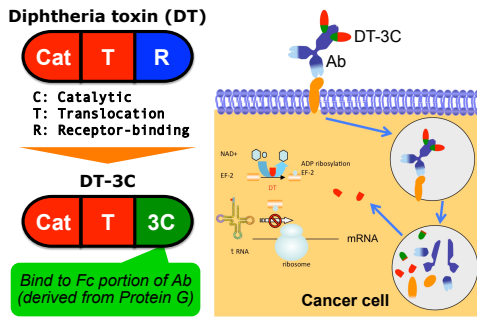
図3 アデノウイルス (Adv-FZ33) 系



(2) イミュノトキシン (DT-3C) 系による標的分子の系統的探索

アデノウイルス系による抗体スクリーニング系に加えて、私たちが標的化抗体にタンパク合成阻害毒素を結合させてイミュノトキシンを作製する簡便かつユニークな系を独自に樹立した。これは図4に示すように、連鎖球菌プロテインG由来の抗体結合ドメイン 3C を持つ組換え改変ジフテリアトキシン DT-3C を大腸菌で作製し、これを用いて細胞毒性効果を指標に好適な抗体をスクリーニングする系である。

図4 イミュノトキシン(DT-3C)系



(3) 抗原の決定

得られた抗体がどのような細胞と反応するか、フローサイトメトリーで解析する。標的細胞を用いて免疫沈降実験を行う。まず比較的少量の細胞を用いて、生細胞表面をビオチンラベルする。細胞を可溶化し、各抗体と反応させてから免疫沈降する。沈降物をSDS-PAGEで分離し、アビジン-HRP系を用いて発色させ、抗原の分子量を決定する。その上で非ビオチン標識細胞を用いて免疫沈降し、切り出した抗原バンドを質量分析に供し、データベース検索により抗原タンパクを同定する。質量分析の情報に基づいて、該当するcDNAを発現ベクターに組み込んで293T細胞やCHO-K1細胞に強制発現させ、あるいはsiRNAを用いて発現陽性細胞での遺伝子発現を抑制し、フローサイトメーター解析を行って当該抗体と抗原の反応性を確認する。

(4) 癌標的化抗体の単鎖抗体化とHSVへの組み込み

以上の結果として得られた癌標的化抗体パネルから、特に難治癌の特異的標的化に有用であると考えられるものを厳選する。該当する抗体産生ハイブリドーマ株からmRNAを抽出し、抗体遺伝子のうちV_LおよびV_Hをコードする遺伝子配列をそれぞれRT-PCR法にてクローニングする。PCRでは縮重プライマーを用いる。本来のgD受容体に結合できないようすでに変異・欠失を加えた改変型gDのN末端近くに、リンカー配列を介して連結させたV_LおよびV_H(単鎖抗体、scFv)のコード配列を挿入する。得られた標的化gD変異体をコードするプラスミドの一過性発現により、gDノックアウトウイルス(ハイパーgB変異を挿入済み)のエンベロープに標的化gDを発現させたウイルスサンプルを簡便に作製し、その標的細胞への侵入の効率をレポーター遺伝子の発現を測定することにより検討する。一過性発現アッセイにより陽性の結果を得た標的化gD変異体に対してその遺伝子配列を、すでにハイパーgB変異を挿入してあるHSVゲノムのgDコード領域に組み込むことにより、組換え標的化ウイルスを作製する。

HSVゲノムの操作はBAC(bacterial artificial chromosome)システムを用いることにより容易に施行できる。

4. 研究成果

抗体結合変異型アデノウイルスAdv-FZ33を用いたスクリーニングを様々なタイプのヒト癌細胞株(25種類)に対して行った。その結果、これまでに615クローンの高効率標的化抗体を樹立し、うち413クローンの抗原同定を完了した。抗原の種類は重複を除くと61種類に及んだ(図5)。この中には非常に興味深いことに、EGFRやCD20などすでに抗体医薬として腫瘍の標的治療に用いられているもの、あるいはCD44、CD71、CA12、EPCAM、TROP2、MCSP、CD146、CD228、PSMA、CEACAMs、CD276、CD147、CD98hc、CD47、EPHA2、CD73、IL13RA2など、腫瘍標的治療の候補分子として注目され臨床開発途上のものが高い比率で含まれていた。

図5 アデノウイルス(Adv-FZ33)系にて得られた抗原・抗体リスト

	Antigen	No. of Ab		Antigen	No. of Ab
1	Integrins	59	33	CD81	3
2	CD9	29	34	TMEM2	3
3	CD276 (B7-H3)	24	35	F3 (CD142_TF)	2
4	BSG (CD147)	21	36	MF12 (CD228)	2
5	CD55 (DAF)	20	37	ICAM3 (CD50)	2
6	EPCAM	20	38	EGFR	2
7	CEACAMs	18	39	IGF1R (CD221)	2
8	MHC class I	18	40	L1CAM	2
9	TFRC (CD71)	15	41	PRNP (CD230)	2
10	SLC3A2 (CD98hc)	15	42	PTGFRN (CD315)	2
11	CD59	12	43	CD151	2
12	Na/K-ATPases	11	44	PSCA	1
13	CD46	10	45	LYPD3 (G4.4A)	1
14	CD109	8	46	MS4A1 (CD20)	1
15	MCAM (CD146)	8	47	CD82	1
16	CD47	8	48	CD99	1
17	MHC class II	8	49	DSG2	1
18	EPHA2	8	50	CDH1 (E-cadherin)	1
19	CD44	7	51	SPINT1 (HAI-1)	1
20	CSPG4 (MCSP)	6	52	JAM3	1
21	FOLH1 (PSMA)	6	53	NCAM2	1
22	NT5E (CD73)	5	54	NLGN4X	1
23	TACSTD2 (TROP2)	4	55	PRSS8	1
24	ADAM10	4	56	SCARB1	1
25	PVR (CD155)	4	57	THY1 (CD90)	1
26	IL13RA2	4	58	ANKX2	1
27	ALPP/ALPPL2	4	59	BCAP31 (BAP31)	1
28	MME (CD10)	3	60	CA12	1
29	ENG (CD105)	3	61	PVRL2 (CD112, nectin-2)	1
30	ANPEP (CD13)	3			413
31	F11R (CD321, JAM1)	3		Not determined	202
32	ICAM1 (CD54)	3			615

さらに、抗体結合改変毒素DT-3Cを用いたスクリーニングでは、これまでに429クローンの高効率標的化抗体を樹立し、うち259クローンの抗原同定を完了した。

以上のような癌標的化抗原・抗体リストの中から8種類の抗原を選び、これに対する抗体産生ハイブリドーマ細胞株から抗体遺伝子V_LおよびV_Hを、縮重プライマーを用いたRT-PCR法によりクローニングした。BLAST検索により、これらがすべてマウス抗体遺伝子であることを確認した。これらのうち複数の抗体クローンにつきV_LおよびV_Hをリンカー配列で連結させたscFvを作製し、その抗原への結合を確認した。2種類の抗原に対するscFvを本来のgD受容体に結合できないようすでに変異・欠失を加えた改変型gDのN末端近くに挿入した。標的化gD変異体を一過性に発現させ、gDノックアウトウイルス(ハ

イパー-gB 変異を挿入ずみ) のエンベロープに標的化 gD を発現させたウイルスサンプルを作製したところ、対応する抗原を発現した標的細胞への特異的な侵入を確認することができた。現在、BAC (bacterial artificial chromosome) システムを用いた組換え標的化ウイルスの作製を行っている。早期の臨床応用に向けて、非常に有望な結果であると考えられる。

現在、イミュノトキシン (Antibody-drug conjugate, ADC) 治療に関しては国内外で多くの研究が重ねられているが、標的抗原はイミュノトキシン治療に適しているという直接的な実験証拠から選ばれた分子ではなく、また抗体は ELISA など別の選別法で得られたものが流用されている。このため、臨床応用に耐えうる優れたイミュノトキシン活性が得られるものは稀であり、多くのイミュノトキシン開発は世界的に見ても行き詰まっている状況である。私たちの抗体結合改変毒素 DT-3C を用いたスクリーニング法は、実際の標的化治療をシミュレートした、イミュノトキシン作製に好適な抗体を得るための直接的な選別法であり、イミュノトキシンに使用するために特に優れた標的抗原・抗体をセットで選ぶことができる。私たち独自に開発したユニークな系であり、さらに系統的な探索を進めてゆくことによって、難治癌の新しい抗体医薬としてきわめて有望なイミュノトキシン抗体の樹立が期待できる。

今後はイミュノトキシン治療のターゲット分子・高効率抗体の系統的探索を一層推し進めるとともに、得られた標的抗原・抗体のうち臨床応用が特に有望なものに関しては、実用化への基盤となる前臨床研究を進めてゆく。各種の細胞組織での発現に関する個別診断と、標的化抗体イミュノトキシンを介した選択的薬剤投与による細胞傷害アッセイや動物治療実験などの特性評価を進める。さらに、より効果の高い次世代標的化トキシンの開発を行う。以下に述べるような in vivo (動物モデルでの) 標的化を目的として、腫瘍を取りまく組織環境への働きかけも加味しながら、難治進行癌に対する効果的な多重標的化治療の開発を進めていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Uchida H, Marzulli M, Nakano K, Goins WF, Chan J, Hong CH, Mazzacurati L, Yoo JY, Haseley A, Nakashima H, Baek H, Kwon H, Kumagai I, Kuroki M, Kaur B, Chiocca EA, Grandi P, Cohen JB, Glorioso JC. Effective treatment of an

orthotopic xenograft model of human glioblastoma using an EGFR-retargeted oncolytic herpes simplex virus. *Mol Ther*. 2013;21(3):561-9.

2. Wang PY, Currier MA, Hansford L, Kaplan D, Chiocca EA, Uchida H, Goins WF, Cohen JB, Glorioso JC, Kuppevelt TH, Mo X, Cripe TP. Expression of HSV-1 receptors in EBV-associated lymphoproliferative disease determines susceptibility to oncolytic HSV. *Gene Ther*. In press.
3. Uchida H, Chan J, Shrivastava I, Reinhart B, Grandi P, Glorioso JC, Cohen JB. Novel mutations in gB and gH circumvent the requirement for known gD receptors in HSV-1 entry and cell-to-cell spread. *J Virol*. 2013;87(3):1430-42.

[学会発表] (計 5 件)

1. 内田宏昭 高性能癌標的化抗体の網羅的探索と標的化ヘルペスウイルスベクター系の完成 バイオテック 2012 アカデミックフォーラム 2012 年 4 月 東京
2. 内田宏昭、濱田洋文、Justus B. Cohen、Joseph C. Glorioso 標的化ヘルペスウイルスでがんを狙い撃ち—エンベロープ糖タンパクの遺伝子工学的改変 第 2 回医薬工 3 大学包括連携推進シンポジウム 2012 年 3 月 東京
3. 内田宏昭、中野賢二、Chang-Sook Hong, William Goins, Janet Chan, Heechung Kwon, 熊谷泉, 黒木政秀, Justus Cohen, Joseph Glorioso 単純ヘルペスウイルスのターゲティング—2 種類のウイルス糖タンパクの同時改変 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 名古屋
4. Uchida, H. Fully retargeted herpes simplex virus vector by co-engineering of viral glycoproteins. *The 17th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy*. Hakata, Japan. 2011. (招待講演)
5. 内田宏昭, Justus Cohen, Joseph Glorioso 腫瘍細胞のみに感染可能な標的化ヘルペスウイルスベクターの実現 第 111 回日本外科学会定期学術集会 2011 年 5 月 東京 (紙上開催)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 宏昭 (UCHIDA HIROAKI)
東京薬科大学・生命科学部・准教授
研究者番号： 20401250

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：