

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11279

研究課題名(和文)新規キャリアー細胞を用いた伴侶動物難治性固形癌に対する前臨床有効性試験

研究課題名(英文) Preclinical efficacy study of novel carrier cells for refractory solid tumors in companion animals

研究代表者

濱田 雄行 (Hamada, Katsuyuki)

東邦大学・医学部・客員教授

研究者番号：90172973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：強力な抗腫瘍効果を有するキャリアー細胞EHMK-51-35を肺癌細胞よりクローニングし、マウス、ビーグル犬、ウサギに対する前臨床有効性試験を行った。200Gyの放射線照射により腫瘍形成能は消失した。投与するオンコリティックアデノウイルスAdE3-midkineに対する、特異的プライマーを作成し、定量した。AdE3-midkine単独投与およびAdE3-midkine感染キャリアー細胞投与後、ビーグル犬では、投与後生物活性を有するAdE3-midkineは認められなかった。キャリアー細胞投与後、ビーグル犬、ウサギにおいてADLの低下、DIC以外、重篤な副作用は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌に対する治療法は、従来の手術、放射線治療、ホルモン治療に加えて、最近、分子標的治療、ノーベル賞受賞となったチェックポイント阻害剤が注目されているが、これらは一部の難治性癌には有効性を示すが、癌全体の予後を改善するまでには至っていない。癌遺伝子治療は、新たな癌治療として期待されているが、GM-CSF導入ヘルペスウイルスtalimogene laherparepveが悪性黒色腫に認可されているが、それ以外の認可は、いまだされていない。今回の成績は、強力な抗腫瘍効果を示すキャリアー細胞の安全性が確認されたため、今後の早期の臨床導入が期待される。

研究成果の概要(英文)：EHMK-51-35 carrier cell with potent antitumor activity was cloned from lung cancer cells and tested for preclinical efficacy in mice, beagle dogs, and rabbits. 200 Gy of irradiation abolished tumorigenic potential. Specific primers were generated and quantified for the oncolytic adenovirus AdE3-midkine to be administered. No bioactive AdE3-midkine was found to be after administration. No serious adverse reactions other than decreased ADL and DIC were observed in beagle dogs and rabbits after administration of carrier cells.

研究分野：癌遺伝子治療

キーワード：oncolytic adenovirus companion animal preclinical test beagle dogs

## 1. 研究開始当初の背景

癌の死亡率は、年々増加し、30%近くまで増加している。これは、三大疾患の他の心疾患、脳血管疾患が、高血圧薬、高脂血症薬等の薬剤治療のめざましい進歩により制御されているのに対して、癌に対しては、抗癌剤、放射線治療、手術療法、ホルモン療法等の種々の改良にもかかわらず、有効な治療法が開発されていないことにある。乳癌に対するハーセプチン、CML に対するグリベック、B 細胞リンパ腫に対するリツキサン等の分子標的治療、抗体療法等の開発により、一部疾患に対しては、治療成績の改善傾向はあるものの、根治的な治療法とはなっていない。また、最近抗 PD-1 抗体によりサプレッサー T 細胞を抑制することにより、肺癌等の治療成績の改善が認められているが、これも根治的な効果とはなっていない。癌の遺伝子治療は、新たな治療法として期待され、1990 年に IL2、TNF を導入した TIL(tissue infiltrating lymphocyte) による悪性黒色腫による治療から、約 1000 の癌に対する遺伝子治療のプロトコールがアメリカで認可され臨床試験が行われている。2003 年に中国でアデノウイルス-p53 (Gendicine)、2005 年に E1B を欠失したオンコリティックアデノウイルス(Oncoline)が認可されたが、先進国では認可されていない。これは、抗体産生により用いられるウイルスベクターの感染抑制が起こるためである。2012 年に Lipoprotein lipase deficiency に対する AAV-LPL が EU において認可されたのが先進国で唯一認可された遺伝子治療薬である。これは、単一遺伝子疾患による遺伝子治療は、AAV、レトロウイルス、レンチウイルス等で一度染色体に組み込まれると、以後、効果が持続するためであり、1 回のみでの感染で有効性が認められるからである。一方、癌の遺伝子治療は、根治のためには頻回投与が必要であり、ウイルスベクターに対する抗体産生により、2 回目以降の感染が成立しないため、臨床的有用性が示されるに至っていない。

我々は、腫瘍特異的プロモーターを導入したオンコリティックアデノウイルスは、腫瘍特異的に腫瘍内で増殖し、抗体非存在下におけるヌードマウスの直径 5mm の小卵巣腫瘍内投与により根治した。(Hamada et al, Cancer Research, 2003)。一方、直径 1cm のヌードマウス巨大皮下卵巣腫瘍では、オンコリティックアデノウイルスでは抗腫瘍効果はなく、ウイルスの増殖に用いられている非小細胞性肺癌細胞株 A549 にオンコリティックアデノウイルスを感染したキャリアー細胞では、巨大皮下卵巣腫瘍においても抗腫瘍効果は認められた。さらに、syngeneic mouse model においては、腫瘍の発育速度が速いため、事前免疫していない A549 キャリアー細胞では抗腫瘍効果はなく、むしろ事前免疫して抗体存在下において皮下卵巣腫瘍に対して著明な抗腫瘍効果を示した。さらに、オンコリティックアデノウイルスにアデノウイルス-GM-CSF を共感染するとほぼ 100% の皮下腫瘍に完全腫瘍退縮が認められた (Hamada et al, Molecular Therapy, 2007)。しかしながら、卵巣癌腹腔内播種性モデルでは、全く抗腫瘍効果は認められなかった。このため、独自に樹立した肺癌細胞株 EHMK 細胞より限外希釈にて細胞クローンを選択したところ、A549 キャリアー細胞より抗体存在下で 12 倍の抗腫瘍効果を示す EHMK-51-35 をクローニングすることが出来た (特願 2015-195741)。この細胞にオンコリティックアデノウイルスおよびアデノウイルス-GM-CSF を感染させると、卵巣癌腹腔内播種性モデルにおいて 60% の完全腫瘍退縮が認められた。

我々は、既に農林水産省に二種申請を終了し、ビーグル犬を用いた安全性試験を基に一種申請を行い平成 28 年度中に終了する予定である。確認申請終了後、東京農工大学での P2A 動物実験施設において、伴侶動物のウサギの難治性固形癌に対して EHMK-51-35 キャリアー細胞による前臨床有効性試験を開始し、伴侶動物さらにヒトへの臨床試験開始のためその安全性と有効性を検討する。

## 2. 研究の目的

イヌ、ネコの伴侶動物は、日本で 2500 万匹以上飼育されており、年々増加している。死亡原因の 50% は癌である。一部の先進動物病院を除いて、地域動物病院では、癌に対しては姑息的手術が行われており、根治的手術を行うことは稀であり、再発が極めて多い。今回の研究は、ヒトへのトランスレーションを目指す前臨床有効性試験が第一義的であるが、動物医療が一つのマーケットを形成しており、十分その市場性があるものと思われる。このため、動物癌治療薬としての可能性を検討し、有効性と安全性の確認のため、動物医薬品としての承認を目指して、動物前臨床試験としても併せて施行する。

イヌ、ネコの伴侶動物は、表在性癌が多いため腫瘍内投与がしやすく、直視下に抗腫瘍効果が評価しやすい。また、深部臓器癌においても体重が最大 10kg 前後であるため、超音波診断装置下に直接注射することも容易である。このため、婦人科癌である乳癌、卵巣癌をはじめとして難治性固形癌をその治療対象とする。キャリアー細胞作成のための至適感染量および至適感染時間、また、凍結製剤が新鮮培養後の直接注射かについても検討を加える。Dose escalation により腫瘍径測定による抗腫瘍効果の有効性を検討し、副作用、体外への糞尿、血液、唾液等の排泄等についての安全性の検討をし、至適投与方法、至適投与量を決定する。

## 3. 研究の方法

オンコリティックアデノウイルスはイヌ、ネコに対して腫瘍マーカーとして用いられ、ヒトにおける乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮体癌、伴侶動物の固形癌にも高いプロモーター活性を有する midkine プロモーターを導入した AdE3-midkine、免疫誘導非増殖型アデノウイルスとしてイヌに対しては Ad-cGM-CSF、ネコに対しては Ad-fGM-CSF を用いる。これら 3 種類に関しては、特異的なプライマーを設計し、各ベクター特異的な定量的リアルタイム DNA-PCR による測定方法を確立する。定量的リアルタイム DNA-PCR では生物活性を有しない変性したアデノウイルス DNA を検出する可能性があるため、さらに、PFU assay による生物活性の測定を併せて行う。ビーグル犬に対する安全性試験において、AdE3-midkin 単独投与、AdE3-midkine および Ad-cGM-CSF 共感染 EHMK-51-35 キャリアー細胞投与での、血中、尿、糞、唾液に生物活性を有するアデノウイルスの検出、定量的リアルタイム DNA-PCR によるアデノウイルス DNA の検出を行う。投与中は、全身所見による副作用、抗体価、CBC、血液生化学検査（肝機能、腎機能、脂質、糖代謝）、炎症反応（CRP、1AG）、止血機能等を測定することにより安全性を検討する。

臨床試験での治療対象は、乳癌、卵巣癌をはじめとするイヌ、ネコの難治性固形癌であり、今回は、ウサギの難治性扁平上皮癌を用いた前臨床有効性試験を行い、有効性と安全性を検討する。オンコリティックアデノウイルス AdE3-midkin とイヌには Ad-cGM-CSF を感染させた EHMK-51-35 キャリアー細胞を投与する。 $10^5 \sim 10^7$  個のキャリアー細胞の dose escalation を行い、副作用が投与量について至適条件を決定する。ウサギにおける抗腫瘍効果は、腫瘍径測定により、副作用については、CBC、生血液化学検査、止血機能等の測定を行い詳細な検討を行う。各アデノウイルスに特異的な定量的リアルタイム DNA-PCR および PFU assay で血液、糞、尿、唾液中のアデノウイルスを定量する。

#### 4. 研究成果

前臨床有効試験に使用する EHMK-51-35 キャリアー細胞の改良の研究を行った。EHMK-51-35 細胞は、肺癌由来細胞のキャリアー細胞であり、イヌ、ネコに投与した際には異種であるため生着する可能性は極めて低いが、生着する可能性が全くないとはいえない。このため、放射線照射によるヌードマウスへの腫瘍形成能を検討したところ、200Gy 以上の照射で腫瘍形成能が消失した。オンコリティックアデノウイルス感染後 EHMK-51-35 キャリアー細胞回収後の照射、オンコリティックアデノウイルス観戦前の EHMK-51-35 細胞へ照射とオンコリティックアデノウイルス産生能を検討したが差は認められなかった。このため、操作が簡便である放射線照射後にオンコリティックアデノウイルスを感染することとした。in vitro においてオンコリティックアデノウイルス感染 EHMK-51-35 細胞、放射線照射 EHMK-51-35 細胞、放射線照射後オンコリティックアデノウイルス感染 EHMK-51-35 キャリアー細胞を培養したところ、全ての細胞が 2 週間後に死滅し、安全性が確認された。オンコリティックアデノウイルスの感染条件と検討すると、200MOI、33 時間感染が最も強力な抗腫瘍効果を示したが、ビーグル犬投与によりキャリアー細胞の急速な死滅による DIC 症状が強く出た。電子顕微鏡的検討を行ったところ、大量のオンコリティックアデノウイルス産生により核膜破壊が起こることによるものと思われた。このため、20MOI、24 時間感染としたところ、ビーグル犬による DIC 症状は軽減したため、この条件でキャリアー細胞は作成し、凍結保存液は 5%アルブミンを 95%とグリセリン 5%として凍結融解後直接投与可能な剤型とした。

キャリアー細胞投与後の各アデノウイルスを検出するために、各アデノウイルス特異的なリアルタイム定量的 DNA-PCR による検出システムを構築した。各アデノウイルスに対する特異的プライマー作成のため、各アデノウイルスのシャトルベクターを用いて PCR およびリアルタイム定量的 DNA-PCR を行った。pXC1 は野生型アデノウイルス (AdE3) 作成用のシャトルプラスミド、pXC1-448-mid 0.6 は腫瘍溶解性アデノウイルス (AdE3-midkine) 作成用のシャトルプラスミド、pCA13-cGMCSF はイヌ cGM-CSF 発現非増殖性アデノウイルス (Ad-cGM-CSF) 作成用のシャトルプラスミド、pCA13-fGM-CSF はネコ fGM-CSF 発現非増殖性アデノウイルス (Ad-fGM-CSF) 作成用のシャトルプラスミドで、各プラスミドに対する特異性と定量性を検討した後に、各アデノウイルスに対する特異性と定量性についても検討した。各アデノウイルスに対する特異的プライマーは、各プラスミド、各アデノウイルスに対して特異的に定量的に測定できることが明らかとなった。また、キャリアー細胞を投与した供試験犬から採取したサンプルで、 $1 \times 1000000$  細胞を投与された供試験犬の血漿サンプルにおいて投与後 1 日目 ( $6.96 \text{ copy/ml}$ )、3 日目 ( $1.64 \times 10 \text{ copy/ml}$ ) に腫瘍溶解性アデノウイルス AdE3-midkine DNA が特異的に検出された。 $2 \times 1000000$  細胞を投与された供試験犬の血漿サンプルにおいて投与後 1 日目 ( $2.62 \times 10 \text{ copy/ml}$ )、3 日目 ( $5.43 \times 10 \text{ copy/ml}$ ) に腫瘍溶解性アデノウイルス AdE3-midkine DNA が特異的に検出された。野生型アデノウイルス (AdE3)、Ad-cGM-CSF、生物活性を有するアデノウイルスは検出されなかった。

アデノウイルス単独による副作用を検討するために、ビーグル犬を用いて検討を行った。DNA-PCR により経時的な体内動態を調べて、すべての検体にアデノウイルス DNA は検出されなかったが、生物活性を有するオンコリティックアデノウイルスについては、PFU assay は DNA-PCR より感度が勝るため、今回は PFU assay により検討した。オンコリティックアデノウイルス AdE3-midkine を  $10 \sim 10^7$  PFU 皮下投与後、24 時間後、4 日後、11 日後に屠殺し、経時的なオンコリテ

ックアノデウイルスの体内分布を検討した。24時間屠殺例においては、注射前、注射後3時間、6時間、12時間、24時間に血液、唾液、尿、糞便を採取し、オンコリティックアノデウイルスの存在をPFU assayにより定量した。4日後屠殺例においては、注射前、注射後1日、2日、3日、4日に同様にサンプリングした。11日後屠殺例においては、注射前、注射後1日、2日、3日、4日、5日、7日、9日、11日に同様にサンプリングした。3匹の屠殺した犬に関しては、全臓器を摘出し、オンコリティックアノデウイルスの存在をPFU assayで検討した。すべての犬において、血液、唾液、尿、便、摘出臓器において生物活性を持つオンコリティックアノデウイルスは検出できなかった。

キャリアー細胞およびアデノウイルス単独による副作用を検討するために、ビーグル犬を用いて検討を行った。キャリアー細胞は、オンコリティックアデノウイルス AdE3-midkine を20M01感染させ、 $1 \times 10^4$ 細胞、 $1 \times 10^5$ 細胞、 $1 \times 10^6$ 細胞、 $1 \times 10^7$ 細胞のキャリアー細胞をビーグル犬計4頭の大腿部筋肉内に注射し、14日間、採血して、血液生化学所見および全身所見における副反応を検討した。アデノウイルス単独ではオンコリティックアデノウイルス AdE3-midkine を $1 \times 10^{10}$  PFUをビーグル犬計3頭の大腿部筋肉内投与を行い、1~11日間の血液生化学所見および全身所見における副反応を検討した。キャリアー細胞を投与した4匹のビーグル犬において、 $10^4$ 細胞以上投与したすべてのビーグル犬に抗アデノウイルス抗体の上昇が認められた。 $1 \times 10^6$ 細胞、 $1 \times 10^7$ 細胞のキャリアー細胞を投与すると、炎症反応のCRP、1AG、total bile acidの上昇とdaily activitiesの低下、 $1 \times 10^7$ 細胞のキャリアー細胞を投与すると、赤血球のMPV、PDW、P-LCRの増加、生化学的検査のALP、LDH、lipase、amylaseの上昇とRBC、Ht、HBG、PLTの減少が認められた。以上より、 $1 \times 10^7$ 細胞のキャリアー細胞を投与すると、DICが発症している可能性があり、 $5 \times 10^6$ 細胞以下での治療を行うべきと思われた。AdE3-midkine単独投与では、3頭とも投与24時間後より炎症反応のCRP、1AGの上昇が認められたが、他の血液生化学的検査、daily activitiesに異常は認められなかった。

オンコリティックアデノウイルス AdE3-midkine 感染キャリアー細胞の安全性と比較するためにオンコリティックアデノウイルス AdE3-midkine 単独での安全性試験を行った。AdE3-midkineの急性安全性を評価するため、 $10^{10}$ PFUのAdE3-midkineをビーグル犬3頭の大腿部にそれぞれ1回大腿筋肉内注射した。24時間後、4日後、11日後に犬を屠殺し、臓器を取り出して組織学的検査を行い、AdE3-midkine特異的なプライマーを用いたqPCRを実施した。では注射前、注射直後、3時間、6時間、12時間、24時間後に、血液、唾液、尿、便を採取して屠殺した。では、注射前、注射直後、1日目、2日目3日目、4日目に血液、唾液、尿、便を採取して屠殺した。では、注射前、注射直後、1日目、2日目、3日目、4日目、5日目、7日目、9日目、11日目に血液、唾液、尿、便を採取して屠殺した。炎症反応性のマーカーである1AGは注射後2~4日目にかけて増加した。CRPは、AdE3-midkineの注射後3時間で増加し始め、2日目にピークを迎え、9日目に正常値に戻った。その他のCBCおよび生化学検査の臨床血液検査は注射前後に変化しなかった。ビーグル犬3頭のいずれにも異常な臨床症状は検出されなかった。qPCR検査で、血液、唾液、尿、糞便中にAdE3-midkineは検出されなかった。以上により、オンコリティックアデノウイルス AdE3-midkine 単独では、オンコリティックアデノウイルス AdE3-midkine は体内で急速に消失し、体内外で認められなかった。また、軽度の急性炎症反応は認められたが、副作用は全く認められなかった。

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 MATSUNAGA WATARU, HAMADA KATSUYUKI, TAGAWA MASATOSHI, MORINAGA TAKAO, GOTOH AKINOBU	4. 巻 41
2. 論文標題 Cancer Cell-specific Transfection of hCas9 Gene Using Ad5F35 Vector	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3731 ~ 3740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15164	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 Ito Tomoko, Sugiura Kikuya, Hasegawa Aya, Ouchi Wakana, Yoshimoto Takayuki, Mizoguchi Izuru, Inaba Toshio, Hamada Katsuyuki, Eriguchi Masazumi, Koyama Yoshiyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Microbial Antigen-Presenting Extracellular Vesicles Derived from Genetically Modified Tumor Cells Promote Antitumor Activity of Dendritic Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 57 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13010057	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 Hamada Katsuyuki, Takagi Soichi, Kuboshima Hajime, Shimada Hideaki, Takagi Kazuko, Yasuoka Toshiaki, Matsubara Keiichi, Sassa Yukiko, Furuya Tetsuya, Suzuki Kazuhiko, Uchide Tsuyoshi, Mizutani Tetsuya, Tani Kenzaburo, Itoh Hiroshi, Sugiyama Takashi	4. 巻 21
2. 論文標題 Cloning of carrier cells infected with oncolytic adenovirus driven by midkine promoter and biosafety studies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Gene Medicine	6. 最初と最後の頁 e3064 ~ e3064
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgm.3064	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 濱田雄行
2. 発表標題 新規キャリアー細胞EHMK-51-35の腹腔内播種性卵巣癌腫瘍に対する抗腫瘍効果
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ウイルス導入用組成物	発明者 濱田雄行	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、52104710545	出願年 2020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	打出 毅  (Uchide Tsuyoshi)  (20327456)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授   (12605)	
研究分担者	古谷 哲也  (Furutani Tetsuya)  (60647676)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授   (12605)	
研究分担者	杉山 隆  (Sugiyama Takashi)  (10263005)	愛媛大学・医学系研究科・教授   (16301)	
研究分担者	小山 義之  (Koyama Yoshiyuki)  (00162090)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・客員研究員   (24403)	
研究分担者	高木 哲  (Takagi Toru)  (50396305)	麻布大学・獣医学部・教授   (32701)	

#### 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
---------	---------