

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07213

研究課題名(和文) 抗腫瘍免疫活性を增強したウイルス療法戦略の基礎研究

研究課題名(英文) Fundamental research on oncolytic viral therapy strategies with enhanced antitumor immune activity

研究代表者

岩井 美和子 (Iwai, Miwako)

東京大学・医科学研究所・技術専門員

研究者番号：50396884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：G47 は、正常細胞では複製できず、がん細胞のみを破壊する、強力な抗腫瘍効果と高い安全性を併せ持つがん治療用ウイルスであり、2021年に膠芽腫に対する日本初のウイルス療法薬として製造販売承認された。G47 は様々ながん腫に対して有効であり、既存の治療に抵抗性を示すような難治性がんに対する新規治療法として適応拡大に向けて開発が進められている。ウイルス療法においては感染したがん細胞に対して特異的な抗腫瘍免疫を惹起できるため、がんワクチンとしての効果をも併せ持つ。そこで、本研究ではG47 を基本骨格として抗腫瘍免疫惹起能を更に增強させるようなウイルスを作製し、ウイルス療法の治療効果の增強を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実用的なウイルス療法の開発にはがん細胞に対する強い抗腫瘍効果と同時に正常組織を傷害しないという安全性が重要になる。本研究は、既に治療薬として確立している第三世代 HSV-1 である G47 を基盤にしたものであり、安全性を担保し、かつ抗腫瘍免疫活性を增強して治療効果を增強することで、臨床応用を視野に入れた様々な難治性がんへの適応拡大につながる。

研究成果の概要(英文)：G47 is an oncolytic virus that can replicate selectively in and destroys only cancer cells, and provides high efficacy and effective antitumor immunity induction as well as high safety. In 2021, G47 was approved as a new drug for malignant glioma in Japan. G47 is effective against various types of cancer, and an expansion of applications is intended for cancer that is refractory to current standard therapies. G47 exhibits specific antitumor immunity in the course of replication in cancer cells, and thus act as an in situ cancer vaccine. In this study, we generated viruses that further enhances antitumor immunity using G47 as a backbone, and confirmed the enhancement of the therapeutic effect of newly constructed viruses.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：遺伝子治療 ウイルス療法

## 1. 研究開始当初の背景

近年、がんに対する新しい治療法としてウイルス療法が注目されている。ウイルス療法とは、正常細胞では複製することができず、がん細胞のみで複製するがん治療用ウイルスを用いて、ウイルスが複製する過程で、がん細胞を直接破壊する。増えたウイルスは周囲に広がり、再び近傍のがん細胞に感染して複製する、というサイクルを繰り返して抗腫瘍効果を発揮する。研究代表者の所属研究室では、腫瘍細胞選択的に複製する遺伝子組換え HSV-1 を用いたがんのウイルス療法の開発を進めている。所属研究室で開発された G47Δ は、病原性を司る 34.5 遺伝子の欠失と、ウイルスの DNA 合成に必要な ICP6 遺伝子の不活化を有する第二世代 (G207) から、更に 47 遺伝子を欠失させることにより作製された。47 遺伝子欠失により、感染したがん細胞の MHC class I の提示低下を阻止することで抗腫瘍免疫能を増強、つまり抗腫瘍免疫がウイルスに感染していないがん細胞をも攻撃するようになり、高い安全性と強力な抗腫瘍効果を実現した (Todo T et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001)。2009 年から膠芽腫 (悪性脳腫瘍) を対象とした first-in-human 臨床試験が日本で実施され、G47Δ の脳腫瘍内投与の安全性が確認された (Ino Y, Todo T. Gene Therapy and Regulation, 2010)。2013 年からは前立腺がんや嗅神経芽細胞腫を対象とした臨床研究も行われている。研究開始時には、膠芽腫を対象とした G47Δ の第 II 相試験が医師主導治験として進行中で、可及的早期の医薬品承認を目指しており、2016 年には厚生労働省により、G47Δ が先駆け審査指定品目に選定された。G47Δ は様々ながん腫に対しても有効であり、根治治療が困難、あるいは既存の治療法に抵抗性を獲得した難治性がんにも有効な治療手段になると期待されている。

G47Δ にはさまざまな機能を付加した「機能付加型 G47Δ」を作製することが可能であり、直接的な殺細胞作用に加え、増幅型の遺伝子発現ベクターとしての機能をもたせることができる。更に抗腫瘍免疫を惹起させる分子を搭載することで、投与局所においてウイルスの複製に伴って搭載タンパクが発現し、腫瘍微小環境の免疫状態を改善することで、G47Δ 自体の抗腫瘍免疫効果に加えて、更なる抗腫瘍免疫惹起能の増強が期待できる。また搭載遺伝子発現が投与部位に限局されることから、全身投与に比べると副作用は極端に軽減されると考えられる。またウイルス療法の利点として、複数種の機能付加型ウイルスを混合して同時に投与することも可能であり、様々な投与プランを検証することで最適な治療効果を見出せることが期待できる。

## 2. 研究の目的

G47Δ は、正常細胞では複製できず、がん細胞のみを破壊する、強力な抗腫瘍効果と高い安全性を併せ持つがん治療用ウイルスであり、現在、前立腺がん・嗅神経芽細胞腫を対象とした臨床研究が進行し、更には膠芽腫に対する第 II 相の医師主導治験が所属研究室で完了して、2021 年には日本初のウイルス療法薬が悪性神経膠腫を適応症として製造販売承認された。このウイルス療法は様々ながん腫に対して有効であり、既存の治療に抵抗性を示すような難治性がんに対する新規治療法として適応拡大に向けて開発が進められている。

ウイルス療法においては感染したがん細胞に対して特異的な抗腫瘍免疫を惹起できるため、がんワクチンとしての効果をも併せ持つ。そこで、G47Δ を基本骨格として、抗腫瘍免疫惹起能を更に増強させるようなウイルスを開発し、ウイルス療法の治療効果の増強を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) G47Δ を基本骨格とした抗腫瘍免疫惹起能を更に増強させるウイルスの作製を行う。所属研究室で開発された任意の遺伝子カセットを確実に挿入し、短期間で作製可能な G47Δ を基本骨格とする bacterial artificial chromosome (BAC) システムを利用する。作製したウイルスの搭載した分子の発現確認は、ELISA 等で行う。

また、CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いて、既存のがん治療用 HSV-1 ゲノムに新たな欠失変異を作成し、治療効果の高い新規がん治療用 HSV-1 を作製する。遺伝子欠失の確認は、欠失部位の PCR やシーケンスにより行う。

遺伝子改変 HSV-1 ウイルスは、時としてその複製・感染能力が減弱することがある。そこで作製したウイルスの基本的性質である複製能および感染効率を、空カセットを挿入したコントロールウイルス、T-01 と相違があるかどうかを *in vitro* で確認する。

(2) 作製した新規ウイルスを用いて、同系マウス皮下腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果の検証を行う。まず作製したウイルスの抗腫瘍効果をマウス片側皮下腫瘍モデルにて T-01 と比較検討する。次に抗腫瘍免疫が惹起されているかどうかを、マウス両側皮下腫瘍モデルを用いて、片側の皮下腫瘍のみにウイルス投与を行った場合に、遠隔の非投与側腫瘍に対しても抗腫瘍効果を示すかどうかを見ることで検討する。治療効果が見られた場合には、抗腫瘍免疫効果をリアルタイム PCR による遺伝子発現解析、および皮下腫瘍の免疫化学組織染色にて検証する。また作製したウイルスのカクテル投与も検討する。

#### 4. 研究成果

(1) G47 $\Delta$ を基本骨格として抗腫瘍免疫惹起能を更に増強させる分子を搭載したウイルスを3種類(T-IMF (Immunomodulatory factor) 1, T-IMF2, T-IMF3)作製した。ウイルスの作製には所属研究室で開発された任意の遺伝子カセットを確実に挿入し、短期間で作製可能な bacterial artificial chromosome (BAC) システムを利用した。作製したウイルスのゲノム構造の確認、および ELISA にて搭載した分子の発現確認を行った。*In vitro*で新規作製ウイルスの感染能・複製能および殺細胞効果を T-01 と比較したところ、ほぼ同等の効果を示し、遺伝子の搭載および遺伝子欠失による感染、複製能・殺細胞効果の減弱は認められなかった。

また、CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いて、既存のがん治療用 HSV-1 ゲノムに新たな欠失変異を作成して新規がん治療用 HSV-1 (G47 $\Delta$ -d1) を作製し、ゲノム編集技術が HSV-1 作製に応用可能であることを実証した。遺伝子欠失の確認は、欠失部位の PCR およびシーケンスにて確認した。*In vitro*で G47 $\Delta$ -d1 の感染能・複製能および殺細胞効果を G47 $\Delta$ と比較したところ、親株の G47 $\Delta$ に比べて複製能は減弱が認められたものの、殺細胞効果において低い力価では G47 $\Delta$ より速いタイミングで殺細胞効果を示すことが分かった (図1)。

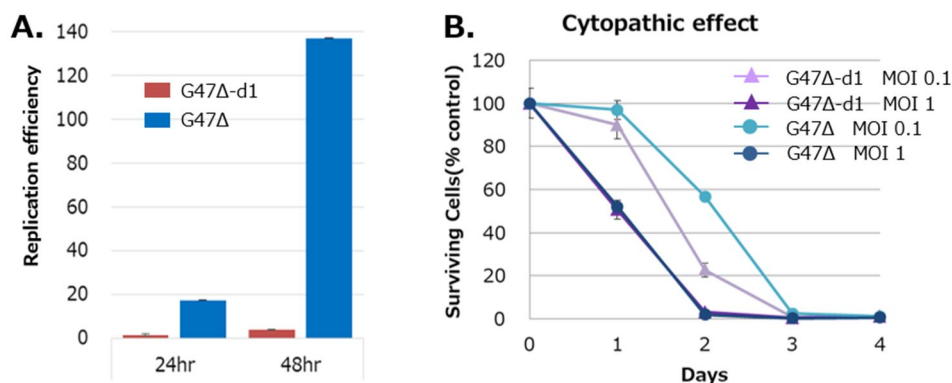


図1. マウス乳がん細胞株 4T1 に対する複製能 (A) ならびに殺細胞効果 (B)

(2)次に、作製した T-IMF1, T-IMF2, T-IMF3 を用いて、同系マウス皮下腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果の検証を行った。まず、神経芽腫 Neuro2a・A/J マウス、悪性黒色腫 cloneM3・DBA/2 マウス、腎細胞がん Renca・Balb/c マウスの片側皮下腫瘍モデルにおいて検証した。いずれのモデルにおいても、T-01 に比べ、新規ウイルスの治療効果が高いことが示された。G47 $\Delta$ -d1 に関しては、乳がん細胞 4T1・Balb/c マウス片側皮下腫瘍モデルにおいて G47 $\Delta$ に比べ、高い治療効果を得ることを確認できた。続いて、マウス両側皮下腫瘍モデルを用いて、片側の皮下腫瘍のみにウイルス投与を行った場合に、遠隔の非投与腫瘍に対する抗腫瘍効果の検証を行ったところ治療側のみならず、非治療側においても T-01 に比べ、新規ウイルスの治療効果が高いことが示された (図2)。

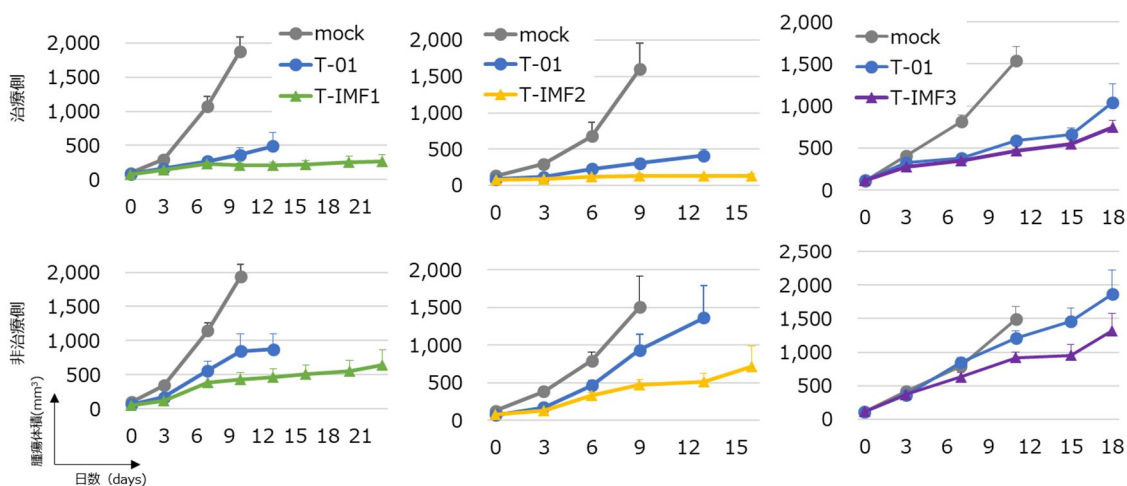


図2. 悪性黒色腫 cloneM3・DBA/2 マウス両側皮下腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果

遠隔の非投与腫瘍に対して見られた抗腫瘍免疫効果をリアルタイム PCR による遺伝子発現解析、および皮下腫瘍の免疫化学染色にて検証したところ、リアルタイム PCR では抗腫瘍免疫関連遺伝子の発現増加が認められ、免疫化学染色では T-IMF 投与群では、mock および T-01 投与群と比較して CD8 陽性細胞ならびに CD4 陽性細胞の増加が認められた (図3)。

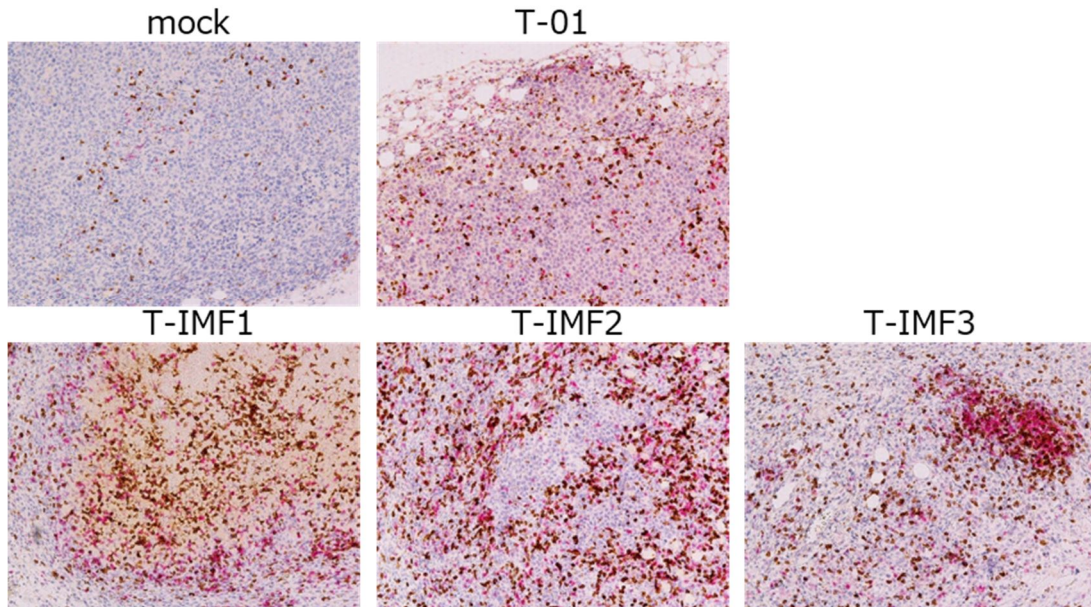


図 3. 神経芽腫 Neuro2a・A/J マウス両側皮下腫瘍モデルにおける、非投与側腫瘍の免疫化学組織染色（ウイルス投与後 9 日目）。CD8 陽性細胞を DAB 染色（茶色）、CD4 陽性細胞を Fast red 染色（ピンク色）した。

更に作製した異なる分子を発現する複数種のウイルスをカクテルとして同時投与、あるいは逐次投与を行うなど様々な投与プランを検証し、最大の治療効果が得られるよう治療プロトコルを最適化し、臨床応用が可能な候補を絞り込んだ。本研究の成果により、治療効果の増強、副作用の回避を視野に入れたウイルス療法の複合的治療戦略の可能性に繋がる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Sugawara K, Iwai M, Yajima S, Tanaka M, Yanagihara K, Seto Y, Todo T	4. 巻 17
2. 論文標題 Efficacy of a third-generation oncolytic herpes virus G47 in advanced stage models of human gastric cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Ther Oncolytics	6. 最初と最後の頁 205-215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omto.2020.03.022	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 T, Tateishi R, Iwai M, Koike K, Todo T	4. 巻 18
2. 論文標題 Neoadjuvant use of oncolytic herpes virus G47 enhances the antitumor efficacy of radiofrequency ablation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Ther Oncolytics	6. 最初と最後の頁 535-545
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omto.2020.08.010	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 笠原駿, 内橋俊大, 須河内昭成, 栗岡恭子, 田中晋, 岩井美和子, 古郷幹彦, 藤堂具紀
2. 発表標題 マウス舌がんモデルにおけるB7-1発現型第三世代がん治療用単純ヘルペスウイルスI型の治療効果と安全性
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅原弘太郎, 岩井美和子, 瀬戸泰之, 藤堂具紀
2. 発表標題 がん治療用ヘルペスウイルスG47 と抗CTLA-4抗体の併用による食道扁平上皮癌に対する新規治療戦略
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩井美和子、福原浩、田中実、藤堂具紀
2. 発表標題 Preclinical safety studies of an oncolytic herpes simplex virus type 1 armed with interleukin-12.
3. 学会等名 第25回日本遺伝子治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木沙依、稲生靖、岩井美和子、福原浩、藤堂具紀
2. 発表標題 Therapeutic efficacy of oncolytic herpes simplex virus type 1 expressing an immunomodulatory molecule in mouse neuroblastoma and melanoma models
3. 学会等名 第24回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木沙依、稲生靖、岩井美和子、福原浩、藤堂具紀
2. 発表標題 免疫修飾機能を付加した新規がん治療用単純ヘルペスウイルス1型の非臨床評価
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩井美和子、稲生靖、福原浩、藤堂具紀
2. 発表標題 IL-12発現型がん治療用ヘルペスウイルスの非臨床安全性および体内分布評価
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	藤堂 具紀 (TODO Tomoki)		

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