

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03515

研究課題名(和文)がん原発巣と転移巣の両方の根治を目指した抗がんウイルス療法の新戦略

研究課題名(英文) Novel strategy of cancer virotherapy for radical cure of both primary and metastatic 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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：両側の皮下にがんを移植したマウスにおいて、片側にがん治療ワクシニアウイルスを投与することで、投与側腫瘍を原発巣、非投与側腫瘍を転移巣として評価した。その抗がん効果は、がん細胞を融合すること、免疫賦活化遺伝子を搭載発現することで増強され、投与側だけではなく非投与側腫瘍に対しても極めて高い治療効果を発揮した。また、ワクシニアウイルスの腫瘍溶解を強める宿主因子は、抗がん効果を予測するバイオマーカーになり得ることを臨床検体を用いて示した。

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、ウイルスを投与しない転移巣における治療効果は限定的となる。この問題を克服すべく本研究では、ウイルスのがんを溶かす能力を増強する、全身のがん免疫を高める、ウイルスの抗がん効果を予測する新戦略を提案し、がんモデルマウスや臨床検体を用いて、がん原発巣と転移巣の両方の根治を可能にする抗がんウイルス療法になり得ることを示した。

研究成果の概要(英文)：In bilateral tumor-bearing mice, antitumor activity was assessed by unilateral injection of oncolytic vaccinia virus. The treated tumor and untreated tumor was evaluated as primary and metastatic tumor, respectively. Antitumor effects were enhanced by induction of cell-cell fusion and expression of multiple immunomodulators, leading to potent therapeutic effects on not only treated tumor but also untreated tumor. Furthermore, host cell factors, which regulates oncolytic activity of vaccinia virus, might be considered a promising biomarker to predict its antitumor activity.

研究分野：遺伝子治療学

キーワード：癌 ウイルス療法 遺伝子治療 バイオテクノロジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (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。

様々な腫瘍溶解性ウイルスを用いたがんウイルス療法の臨床試験が行われているが、これまで重篤な副作用は報告されていない。一方、殆どの臨床試験において、ウイルスは腫瘍内に投与されており、ウイルスを投与したがん原発巣における治療効果は十分であるが、ウイルスを直接投与しない転移巣での治療効果は限定的であること、そして投与した原発巣に対しても効果がある患者と効果がない患者が存在することが分かっている。

2. 研究の目的

本研究では、この問題点を克服すべく、第一・第二の作用機序である腫瘍溶解と抗腫瘍免疫の最適化というウイルス側からと、より効果のあるがん患者を選別するためのバイオマーカーの同定というがん細胞側からの両方向のアプローチを提案する。(1) 腫瘍細胞の融合を介したウイルス腫瘍溶解の増強、(2) 免疫制御遺伝子の発現を介した腫瘍微小環境における免疫反応の制御、(3) ウイルスの抗がん効果を予測するバイオマーカーの実証を試み、最終的にこれらを統合することで、がん原発巣と転移巣の両方の根治を目指した抗がんウイルス療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍細胞の融合を介したウイルス腫瘍溶解の増強

マウス大腸癌 CT26 細胞の両側皮下担がんマウスにおいて、腫瘍が約 60mm³ になった時点で、生理食塩水、10⁷ pfu の MDRVV、又は FUVAC を左側の腫瘍内にのみ 3 回投与した (0、2、4 日)。各ウイルスは発光酵素のホタルルシフェラーゼを搭載発現するので、その発光基質ルシフェリンを腹腔内投与することによって、非侵襲的にウイルス増殖分布を可視化した。

さらに同様に処置をしたマウスにおいて、治療 5~7 日後に投与側腫瘍、非投与側腫瘍、及び脾臓を採取した。腫瘍内のウイルスは免疫組織染色によって、腫瘍内に浸潤した免疫細胞は CD8+T 細胞や制御性 T 細胞 Treg などを同定するための各種抗体を用いたフローサイトメトリー解析によって評価した。又、腫瘍反応性 T 細胞の誘導は、脾細胞を回収し、標的又は非標的腫瘍細胞と共培養後の IFN- γ 産生によって評価した。

(2) 免疫制御遺伝子の発現を介した腫瘍微小環境における免疫反応の制御

複数の免疫制御遺伝子の発現によって抗腫瘍免疫の惹起を最適化できるかを明らかにするため、腫瘍反応性 T 細胞の活性化を誘導するサイトカインやリンパ球を誘引するケモカイン、刺激性の共シグナル、さらに腫瘍微小環境の免疫抑制メカニズムを阻害する分子を発現する免疫制御型 MDRVV を相同組換え法によって作製した。

研究 (1) の CT26 細胞の両側皮下担がんモデルマウスにおいて、同様の評価法により、免疫制御遺伝子を発現しないワクシニアウイルスと比べて各免疫制御型 MDRVV の抗腫瘍効果が増強するかどうか、さらに免疫制御遺伝子の組合せ発現により、さらなる増強効果が得られるかどうかを検証した。

(3) ウイルスの抗がん効果を予測するバイオマーカーの実証

UCA1 は、様々な腫瘍細胞における発現亢進が報告されている。それゆえ広範な腫瘍においてUCA1 の発現亢進とそれに連動した miRNA の発現低下や、Rho ファミリー低分子量タンパク質の活性化がワクシニアウイルスの抗がん効果を予測するバイオマーカーになるかを明らかにする。様々ながん細胞株において、ワクシニアウイルスの増殖能と腫瘍溶解能はウイルスの GFP 発現・FLuc 発光の定量と細胞生存アッセイ、UCA1 や miRNA はリアルタイム PCR、活性型低分子量 G タンパク質の検出は G-LISA によって解析した。

細胞株を用いた解析によって、これらの宿主因子と MDRVV の増殖性・腫瘍溶解性の相関関係が確認できたがん種に関しては、これまで構築してきた癌患者の手術検体より採取した腫瘍 (正常組織含) の組織片培養や初代細胞培養において、上記と同様に評価した。

4. 研究成果

(1) 腫瘍細胞の融合を介したウイルス腫瘍溶解の増強

従来の腫瘍溶解性ワクシニアウイルス MDRVV では見られない細胞融合しながら増殖する FUVAC に注目する。FUVAC は、MDRVV を細胞中で複製させている際、細胞融合しながら増殖するウイルスとして発見され単離したウイルスで、VGF と O1 遺伝子の欠失に加え、K2L 遺伝子にナンセンス変異を有している。

マウス大腸癌 CT26 細胞の両側皮下担がんモデルマウスにおいて片側腫瘍へのみウイルスを投与し、その後のウイルス増殖分布と抗腫瘍効果を検証した。MDRVV

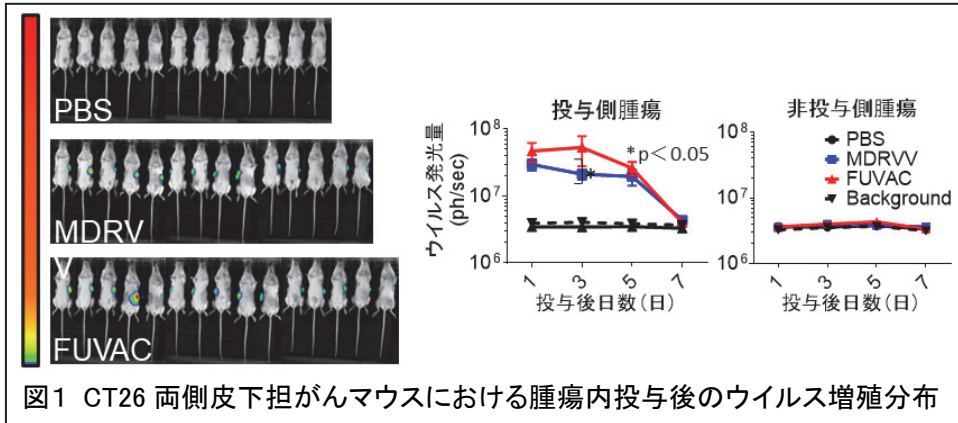


図1 CT26 両側皮下担がんマウスにおける腫瘍内投与後のウイルス増殖分布

および FUVAC の増殖は、投与側腫瘍内においてのみ検出され、ウイルス投与 3 日後では MDRVV に比べ FUVAC の増殖が高くなっていった (図 1)。どちらのウイルスとも非投与側腫瘍内では検出されないにも関わらず、MDRVV と比べ FUVAC は投与側だけではなく非投与側腫瘍に対しても有意な治療効果を発揮した (図 2)。

組織学・免疫学的解析により、FUVAC は、①投与側腫瘍内で細胞融合によりウイルス増殖と腫瘍溶解を増強し、②免疫応答誘導性細胞死 ICD を高めるとともに、③腫瘍内の制御性 T 細胞 Treg、腫瘍関連マクロファージ TAM や骨髄由来免疫抑制細胞 M-MDSC を減少させた。次いで④ウイルスを投与した腫瘍だけではなく投与しない腫瘍への細胞傷害性 T 細胞 CTL の浸潤を高め、強力な抗腫瘍免疫応答を惹起し、MDRVV と比べて高い抗がん効果を発揮する作用機序を解明した (図 3)。

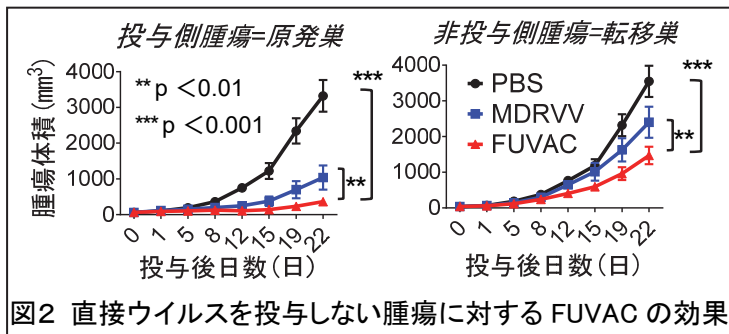


図2 直接ウイルスを投与しない腫瘍に対する FUVAC の効果

(2) 免疫制御遺伝子の発現を介した腫瘍微小環境における免疫反応の制御

MDRVV を投与した局所の腫瘍 (= 原発巣) での治療効果は十分に得られるものの、MDRVV を投与しない遠隔の腫瘍 (= 転移巣) では十分な治療効果が得られなかった。ワクシニアウイルスは、190kbp の線状二重鎖 DNA をゲノムにもつ大型ウイルスであるためベクターとしての能力が高く、複数かつ長いサイズの外来治療遺伝子を同時に搭載発現できる。この特性を活かして MDRVV に 4 種類の外来遺伝子を同時に搭載発現できるシステムを構築し、様々な免疫制御遺伝子を搭載発現させ、CT26 細胞の両側皮下担がんモデルマウスにて抗がん効果を検証した。その結果、作用機序が異なる 2 種類の免疫制御遺伝子、腫瘍反応性 T 細胞の活性化を誘導するサイトカイン IL-12 とリンパ球を誘引するケモカイン CCL-21 を搭載発現した免疫制御型 MDRVV は、ウイルス投与側腫瘍だけではなく非投与側腫瘍に対しても十分な治療効果を発揮し、MDRVV と比べ生存期間を延長させた。

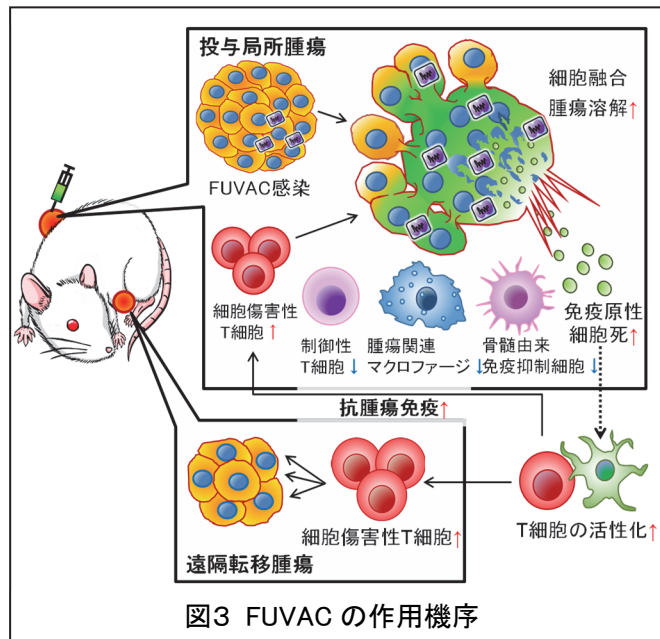


図3 FUVAC の作用機序

(3) ウイルスの抗がん効果を予測するバイオマーカーの実証

卵巣がんと大腸がんにおいて、UCA1 の発現亢進、miR-18a および miR-182 の発現低下や Cdc42 の活性化は、MDRVV の増殖性・腫瘍溶解性との相関関係が確認された。さらに 3 人の卵巣癌患者

の初代細胞培養においても、同様に相関関係が確認され、これらの宿主因子は、がん治療用ワクシニアウイルスの抗がん効果を予測するバイオマーカーとして有用であることが実証された。

以上、(1)～(3)の結果より、最終的にこれらを統合することで、がん原発巣と転移巣の両方の根治を目指した抗がんウイルス療法になり得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 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 -

1. 著者名 Nakatake M, Kuwano N, Kaitsurumaru E, Kurosaki H, Nakamura T	4. 巻 29
2. 論文標題 Fusogenic oncolytic vaccinia virus enhances systemic antitumor immune response by modulating the tumor microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 1782-1793
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymthe.2020.12.024	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 Nakao Shinsuke, Arai Yukinori, Tasaki Mamoru, Yamashita Midori, Murakami Ryuji, Kawase Tatsuya, Amino Nobuaki, Nakatake Motomu, Kurosaki Hajime, Mori Masamichi, Takeuchi Masahiro, Nakamura Takafumi	4. 巻 12
2. 論文標題 Intratumoral expression of IL-7 and IL-12 using an oncolytic virus increases systemic sensitivity to immune checkpoint blockade	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 eaax7992
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scitranslmed.aax7992	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 Nakatake Motomu, Kurosaki Hajime, Kuwano Nozomi, Horita Kosuke, Ito Mai, Kono Hiromichi, Okamura Tomotaka, Hasegawa Kosei, Yasutomi Yasuhiro, Nakamura Takafumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Partial Deletion of Glycoprotein B5R Enhances Vaccinia Virus Neutralization Escape while Preserving Oncolytic Function	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 159 ~ 171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omto.2019.05.003	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15件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Nakatake M, Kuwano N, Kaitsurumaru E, Kurosaki H, Nakamura T
2. 発表標題 Fusogenic oncolytic vaccinia virus enhances systemic antitumor immune response and sensitivity to immune checkpoint blockade by remodeling the tumor microenvironment
3. 学会等名 第27回日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakao S, Tasaki M, Yamashita M, Nakamura T
2. 発表標題 Oncolytic vaccinia virus carrying IL-7 and IL-12 alters intratumoral TCR repertoire, systemically sensitizing tumors to immune checkpoint blockade
3. 学会等名 第27回日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村貴史
2. 発表標題 次世代腫瘍溶解性ワクシニアウイルスによる腫瘍微小環境の統合的制御を介したウイルス療法の新戦略
3. 学会等名 第28回日本遺伝子細胞治療学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

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 viral platform
3. 学会等名 14th International Oncolytic Virotherapy Conference (招待講演) (国際学会)
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 changes the tumor immune microenvironment by cell fusion and enhances systemic anti-tumor immunity
3. 学会等名 23th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakao S, Yamashita M, Tasaki M, Kawase T, Nakatake M, Kurosaki H, Mori M, Takeuchi M, Nakamura T
2. 発表標題 Oncolytic vaccinia virus encoding IL-7 and IL-12 systemically sensitizes tumors to anti-PD-1 antibody in a syngeneic mouse model
3. 学会等名 Annual Meeting of American Association for Cancer Research 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakamura T
2. 発表標題 Fusogenic oncolytic vaccinia virus enhances systemic antitumor immune response by modulating the tumor microenvironment
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020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

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の創薬
3. 学会等名 金沢大学薬学シンポジウム2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamura T
2. 発表標題 Next-generation oncolytic vaccinia virus for cancer virotherapy
3. 学会等名 Asia Pacific Consortium of Gene and Cell Therapy 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakatake M, Kurosaki H, Nakamura T
2. 発表標題 Tumor-specific replication-competent oncolytic vaccinia virus with stealth effect by engineering viral glycoprotein B5R
3. 学会等名 The 12th International Oncolytic Virotherapy Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakatake M, Kurosaki H, Nakamura T
2. 発表標題 Novel approach for systemic cancer virotherapy by using oncolytic vaccinia virus
3. 学会等名 第25回日本遺伝子治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamura T
2. 発表標題 Next-generation oncolytic vaccinia virus for cancer virotherapy
3. 学会等名 国際遺伝子細胞治療シンポジウムIGCT (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019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	

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 新規遺伝子組換えワクシニアウイルス及びその利用	発明者 中村貴史、飼鶴丸恵美、中武大夢、黒崎創	権利者 鳥取大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/041825	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 細胞融合を誘導するワクシニアウイルス及びその利用	発明者 中村貴史、桑野望、 中武大夢、黒崎創	権利者 鳥取大学、 (株)エボル ブ・バイオセラ
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/018976	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 新規遺伝子組換えワクシニアウイルス及びその利用	発明者 中村貴史、飼鶴丸恵 美、中武大夢、黒崎 創	権利者 鳥取大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-191128	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 細胞融合を誘導するワクシニアウイルス及びその利用	発明者 中村貴史、桑野望、 中武大夢、黒崎創	権利者 鳥取大学、 (株)エボル ブ・バイオセラ
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-091609	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------