

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09600

研究課題名（和文）卵巣癌に対する遠隔感染能を強化した腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの開発

研究課題名（英文）Development of oncolytic vaccinia virus with enhanced remote infection capability for ovarian cancer

研究代表者

黒崎 創（KUROSAKI, Hajime）

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：70464295

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：遠隔感染形質強化型ワクシニアウイルスを多く産生しうる変異株を作製し、特に形態学的な特徴と中和抗体からの回避能力などの機能解析、評価方法を確立することができた。精製においては堅牢な工程と品質管理法が確立できたため、より再現性高く均一な品質のウイルスをマウスへ投与することが可能となった。in vivoにおいては血中滞留性の増加、担癌モデルマウスでの腫瘍部への感染の拡大傾向が観察され、治療効果の増強が示唆された。変異株の大元となるMDRVVについては論文として報告し、本研究によって蓄積された遠隔感染型ミュータント実験及び上記の明らかにされた内容についても現在特許取得に向けて進行中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現状の腫瘍溶解性ウイルス療法ではウイルスの全身投与での治療適応は困難とされ、米国で認可された腫瘍溶解性ヘルペスウイルスT-VECも悪性黒色腫への直接投与のみが適応となる。投与部位以外の腫瘍にウイルスを到達させることは困難であり、ウイルスが到達できない腫瘍への治療効果は大きく抑えられることが想定される。しかし、本研究の遠隔感染形質強化型ワクシニアウイルスを用いれば、投与部位の腫瘍組織からEEV形態を産生・放出することで、全身各所の腫瘍に対してもウイルスを到達させその治療効果を発揮することが可能になる。

研究成果の概要（英文）：We created a mutant strain capable of producing a large amount of vaccinia virus with enhanced remote infection characteristics, and established a method for functional analysis and evaluation, particularly of morphological characteristics and the ability to evade neutralizing antibodies. A robust purification process and quality control method were established, making it possible to administer to mice a virus with high reproducibility and consistent quality between lots. In vivo studies, we observed increased blood retention and a tendency for infection to spread to tumor sites in tumor-bearing mouse models, suggesting enhanced therapeutic efficacy. We have published a paper on MDRVV, the source of the mutant strain, and are currently working to obtain a patent for the remote infection mutant experiments accumulated in this study and the above-mentioned findings.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：腫瘍溶解性ウイルス がんウイルス療法 抗腫瘍性増強 遺伝子改変

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現状の腫瘍溶解性ウイルス療法ではウイルスの全身投与での治療適応は困難とされ、米国で認可された腫瘍溶解性ヘルペスウイルス T-VEC も悪性黒色腫への直接投与のみが適応となる。投与部位以外の腫瘍にウイルスを到達させることは困難であり、ウイルスが到達できない腫瘍への治療効果は大きく抑えられることが想定される。しかし、本研究の遠隔感染形質強化型ワクシニアウイルスを用いれば、投与部位の腫瘍組織から EEV 形態を産生・放出することで、全身各所の腫瘍に対してもウイルスを到達させその治療効果を発揮することが可能になる。

### 2. 研究の目的

生きたウイルスを利用したがんウイルス療法は、欧米を中心に非臨床・臨床試験が行われている。我々が注目するワクシニアウイルスの作用機序は、第一にウイルス増殖に伴うアポトーシスやネクローシスにより腫瘍を死滅溶解し、第二にその腫瘍溶解に伴い抗腫瘍免疫を誘導する。加えて、広範ながんに適応でき、強力な抗腫瘍効果を発揮し、全身投与ができる他に類のない特性を有する。

これまでの研究より、MAPK/ERK 経路や p53・RB 経路の制御異常を指標にして、癌細胞特異的に増殖し破壊する遺伝子組換えワクシニアウイルス (MDRVV) の開発に成功している。そこで本研究では、これらの基盤技術を基に、進行性卵巣癌に対する次世代のがんウイルス療法を可能にする遠隔感染形質を強化した新たな腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの開発を目指す。

### 3. 研究の方法

遺伝子相同組換えを応用して EEV 産生型改変ワクシニアウイルスを作出し、がん細胞に感染させた。感染後の細胞培養上清を回収し力価測定を行った。一方感染細胞をコメットアッセイし感染拡大を評価した。

感染上清中に分泌される EEV が過去の報告のように細胞膜で包まれるかどうか、電子顕微鏡タングステンネガティブ染色により観察した。

抗ウイルス免疫応答を回避するかどうかを検討するため、抗体存在下での中和アッセイによる機能性評価を行った。

精製・製造工程を確立し、in vivo 実験においても必要な大量の EEV 精製を行えるようになった。

担癌モデルマウスに精製 IMV とこの精製 EEV を尾静脈投与し、qPCR により血液中ワクシニアウイルス動態を調べた。

また上記の担癌モデルマウスへウイルス尾静脈投与後、ウイルス生体内分布をルシフェラーゼ発光により観察した。

### 4. 研究成果

ワクシニアウイルスの遺伝子 EEV 産生型変異体を作製し、正常型との比較を行ったところ、様々ながん細胞株における EEV (遠隔感染形態) の産生能の向上とそれに伴ってウイルス感染が拡大する様子が観察された。

EEV 産生型変異体を作製する大元となる株について論文化した。

感染上清中 EEV は電子顕微鏡により細胞膜で包まれている形態をとっており、一方で IMV は過去報告されているように桑の実構造も観察された。(図 1)

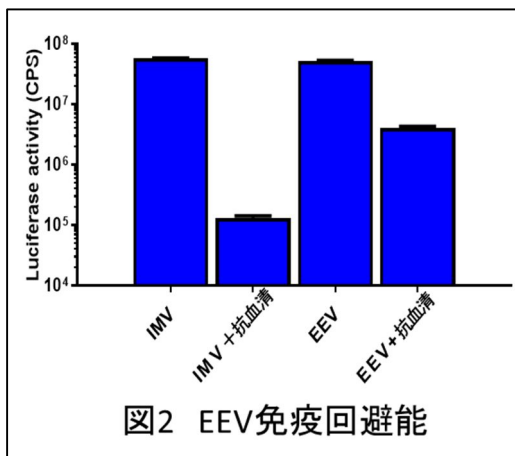
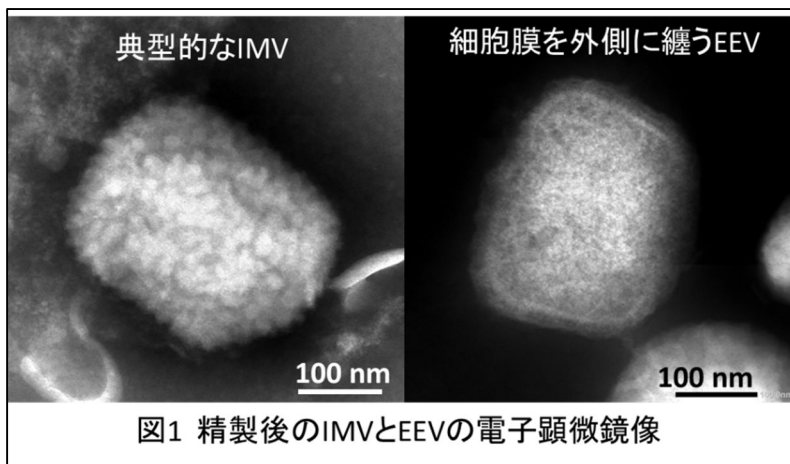
抗ウイルス免疫応答を回避するか否かの検討については、中和アッセイにより EEV は IMV よりも十倍近く抗体回避能力を有していることがわかり(図 2)、独自の EEV 評価方法を確立した。in vitro における EEV の品質評価法についてもほぼ確立できたことは、大量生産、あるいは精製時における Lot 間の重大な品質の差を見極めるうえで非常に役立つものといえる。

精製・製造工程確立については、再現性良い堅牢な EEV 精製工程と品質管理法が確立できた。

担癌モデルマウスに精製 IMV とこの精製 EEV を尾静脈投与し、qPCR により血液中ワクシニアウイルス血中滞留性を調べた結果、元来の IMV と比して血中滞留性が向上していることがわかった。

ウイルス生体内分布については、担癌モデルマウスでの腫瘍部への EEV 感染の拡大傾向が観察され、治療効果の増強が示唆された。

本研究によって蓄積された遠隔感染型ミュータント実験及び上記の明らかにされた内容についても現在特許取得に向けて進行中である。



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 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kurosaki Hajime, Nakatake Motomu, Sakamoto Teruhisa, Kuwano Nozomi, Yamane Masato, Ishii Kenta, Fujiwara Yoshiyuki, Nakamura Takafumi	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 ~ 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 該当する
1. 著者名 Nakatake Motomu, Kuwano Nozomi, Kaitsurumaru Emi, Kurosaki Hajime, Nakamura Takafumi	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakao S, Arai Y, Tasaki M, Yamashita M, Murakami R, Kawase T, Amino N, Nakatake M, Kurosaki H, Mori M, Takeuchi M, Nakamura T.	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 online ahead of print
2. 論文標題 Fusogenic oncolytic vaccinia virus enhances systemic antitumor immune response by modulating the tumor microenvironment.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 30682-1
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2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 changes the tumor immune microenvironment by cell fusion and enhances systemic anti-tumor immunity.
3. 学会等名 23rd 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 (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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