

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21580

研究課題名(和文) 増殖型ウイルス/CAR-T融合による革新的な癌免疫遺伝子・細胞治療技術の創出

研究課題名(英文) Generation of Innovative Cancer Immune Gene and Cell Therapy Technology by Replicating Virus and CAR-T

研究代表者

小戩 健一郎 (Kosai, Ken-ichiro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：90258418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：CAR-Tは、血液腫瘍に劇的治療効果を示すが、固形腫瘍には十分な効果を示していない。研究代表者は独創的な癌免疫遺伝子治療法を開発後、次世代の腫瘍溶解性ウイルス作製のためのm-CRA技術を独自開発した。第一弾のSurv.m-CRA(サバイビン反応性m-CRA)は、基礎研究で従来・競合技術へ優位性の性能を示し、First-in-humanの医師主導治験も実施した。本研究ではこれを基盤に、さらにm-CRAとCAR-T技術を融合し、効率的に全身性抗腫瘍免疫誘導ができる癌免疫治療技術を創出する研究を行った。材料の構築や作製を行い、解析や評価の実験系も確立しながら基盤となるm-CRA技術の研究を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害剤の開発で、癌免疫療法は有望の癌治療戦略と認識されたが、次世代の癌免疫治療として世界的に開発が進むOVとCAR-Tは、本邦では独自の基盤技術開発が遅れている。本研究はm-CRAとCAR-Tの相乗効果を創出する新技術の創出を試みたものであり、科学的な挑戦性、先駆性、独創性が高い。また最終的に革新的な癌免疫治療の創出と実用化に繋がれば、癌の制圧にも貢献できる社会的意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：CAR-T has shown dramatic therapeutic effects on hematologic tumors, but has not shown sufficient effects on solid tumors. In the field of gene/virus therapy, the principal investigator first developed an original cancer immune gene therapy method, and then developed an original next-generation OV, m-CRA technology. The first product, Surv.m-CRA (survivin-responsive m-CRA) has shown superior performance to conventional and competing technologies, and first-in-human investigator-initiated clinical trials was done. The objective of this study is to generate a cancer immunotherapy technology that can efficiently induce systemic anti-tumor immunity by integrating m-CRA and CAR-T technology. The research was conducted by constructing materials, as well as by establishing analyze systems, and conducting experiments, focusing on the development of the basic m-CRA technology.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：腫瘍溶解性ウイルス CAR-T 癌免疫治療

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) PD-1 抗体を中心とする免疫チェックポイント阻害剤の開発により、癌免疫療法は最有望の癌治療戦略と認識された。ただ一方で、効果不能の患者例や、治療効果がみられない癌腫も存在するという課題が未だ残っている。さらに新しいモダリティで、次世代の癌免疫療法として世界的に開発が進められているのは、「癌細胞で特異的にウイルスが増殖して癌細胞を殺傷する」OV (腫瘍溶解性ウイルス) と CAR-T (キメラ抗原受容体 T) 細胞である。しかしいずれも本邦では、独自の基盤技術開発が遅れているため、挑戦的かつ独創的な研究開発が求められている。
- (2) CAR-T (キメラ抗原受容体 T) 細胞は、患者さん自身の血液から細胞性免疫に関する T 細胞を取り出し、がん細胞を攻撃できるように体の外で遺伝子組み換えを行った T 細胞のことであり、その CAR-T 細胞を注射したがん細胞を殺傷する新しい治療法である。CAR-T 細胞療法は、血液腫瘍に対しては臨床で劇的な治療効果が示されているが、但し固形腫瘍には未だ十分な臨床効果が得られていない。その原因として、固形腫瘍は heterogeneity の問題、確実な腫瘍特異的な表面抗原がない、血液腫瘍とは生体内微小環境も違うこと、などの複数の原因が示唆されている。研究代表者は長年のがん研究の実績から、それらの要因に加えて、固形腫瘍内に CAR-T が十分に浸潤・増殖できないことに関して、ある独自の推察も持つに至り、本研究の発想に至った。
- (3) 研究代表者は遺伝子・ウイルス治療の分野で、まず独創的な癌免疫遺伝子治療法を世界に先駆け開発した。さらには次世代 OV を開発するため、その m-CRA (多因子増殖制御型アデノウイルス) のプラットフォーム作製技術を、完全オリジナルで本邦の自身の研究室で開発した。この m-CRA プラットフォーム技術により、第一弾として開発した Surv.m-CRA (サバイビン反応性 m-CRA ; 癌特異的高活性の survivin promoter でウイルス増殖を制御) は、基礎研究で従来・競合技術へ優位性の性能を示した。よって Surv.m-CRA の臨床応用、そして最終的な実用化を目指して、非臨床開発を行い、骨軟部肉腫患者への First-in-human の医師主導治験も実施した。よって m-CRA 技術の研究実績と材料とノウハウが整い、それらを基盤として、さらに新たな癌免疫治療技術を開発する状況が整ったところであった。

## 2. 研究の目的

- (1) 前項記載の背景や実績を基盤として、本研究では研究代表者の m-CRA 技術と CAR-T 技術を融合し、効率的に全身性抗腫瘍免疫誘導ができる癌免疫治療技術を発想するに至った。その新技術により、原発巣の局所治療で多発転移巣まで治療できるような、新しい癌免疫治療法が創出できる可能性を持つ、挑戦的萌芽研究を行うことを本研究目的とする。

### 3. 研究の方法

- (1) 新規 m-CRA と新規 CAR-T の開発として、医師主導治験で良好な結果も得ている Surv.m-CRA のウイルス遺伝子骨格を基盤とし、さらに CAR-T を活性化できる遺伝子を加えた新規の Surv.m-CRA を開発する。
- (2) 癌免疫誘導効果を増強するために、種々のサイトカインやケモカインを発現する各種の Surv.m-CRA も開発する。
- (3) これらの新規 Surv.m-CRA について、ウイルスの特性、搭載した遺伝子の発現、免疫誘導の効果、治療効果などを、in vitro ならびに in vivo 動物モデルで解析する。

### 4. 研究成果

- (1) 研究計画に記載のように、各種の新規の Surv.m-CRA を作製した。
- (2) それらの Surv.m-CRA について、ウイルスの動態や性能、つまり腫瘍特異的なウイルス増殖作用、腫瘍溶解性など、ならびに導入遺伝子の発現の正しさ、発現レベルなどの基本性能を in vitro の実験で確認し、正しいウイルスが作製できていることを確認した。
- (3) ヒトアデノウイルスはマウスではウイルス増殖は効率的にはおきないため、非臨床の GLP (Good Laboratory Practice) 準拠の安全性試験（毒性試験など）では、ヒトアデノウイルスがある程度の効率で増殖できるシリアンハムスターが標準モデルとなっている。しかしハムスターでの薬効薬理試験や、in vivo の免疫解析の系は、十分確立されていなかった。よって2種類のハムスター由来の癌細胞により、免疫を保持した Syngenic hamster tumor model を樹立した。In vivo 腫瘍殺傷効果の実験系として、皮下へのハムスター癌細胞の移植により癌腫瘍を形成させ、そこに m-CRA を注入して、その後の腫瘍サイズの縮小効果、ならびに組織学的解析を行った。さらに微小環境を反映し、臨床の病態をより反映できる同所性モデル（そのがん細胞の起源と同じ臓器に移植する）を作製し、同所性腫瘍に m-CRA を注入した後に、生存期間を観察して、生存率で臨床的により近い治療効果も反映する in vivo 実験モデルでも実験を行った。さらに治療後の全身性抗腫瘍免疫を評価できるチャレンジテスト（m-CRA 治療後に同じ癌細胞と異なる癌細胞を移植して、その癌細胞に特異的な抗腫瘍免疫の誘導能（転移巣への治療効果の反映）の系も確立した）これらの動物モデルで、従来の Surv.m-CRA に比べて全身性の抗腫瘍免疫の誘導をさらに効率よくできる技術や、科学的知見を幾つか見出した。
- (4) また、様々な免疫細胞を検出する免疫組織化学染色や、フローサーマーター解析の実験系などを確立した。前述の新たな Surv.m-CRA での様々な in vivo 治療実験を行い、それらの動物の組織の免疫学的解析を行うことで、免疫誘導効果も実証した。

- (5) CAR-T ならびに腫瘍溶解性ウイルスの研究領域は、世界でも競争が激しく、科学的進展が著しい分野であり、様々な新技術が創出されて報告されている。競合技術の解析という点に加え、新しい遺伝子構築や今後の方向性を常に検証するため、これらの分野の最新情報も収集・検討して戦略を構築した。
- (6) 今回の研究は独創先駆性の高い、挑戦的な研究であり、本研究の期間内の萌芽的な目的としては、上記のような研究を実施した。今後はさらにこの研究を発展させるとともに、また今回の研究を基盤とした新たな試みの研究も行うべく、プランを構想している。我々の m-CRA 技術による OV 療法と、CAR-T 技術を融合させ、新たな画期的な癌免疫治療法が完成できるように、継続して取り組んでいきたいと思っている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 Maki Watanabe, Yuya Nishikawaji, Hirotaka Kawakami, and Ken-ichiro Kosai.	4. 巻 13
2. 論文標題 Adenovirus Biology, Recombinant Adenovirus, and Adenovirus Usage in Gene Therapy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses.	6. 最初と最後の頁 2502
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v13122502	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 渡邊真季, 西川路侑耶, 小賤健一郎	4. 巻 -
2. 論文標題 腫瘍溶解性アデノウイルスの作製・調製法と次世代の癌免疫治療への応用・展望	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 創薬研究者がこれだけは知っておきたい最新のウイルス学	6. 最初と最後の頁 397-403
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Mitsui Kaoru, Takahashi Tomoyuki, Ide Kanako, Matsuda Eriko, Kosai Ken-ichiro	4. 巻 541
2. 論文標題 Optimization of adenoviral gene transfer in human pluripotent stem cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 78-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.01.009	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 Matsuda Eriko, Obama Yuki, Kosai Ken-ichiro	4. 巻 268
2. 論文標題 Safe and low-dose but therapeutically effective adenovirus-mediated hepatocyte growth factor gene therapy for type 1 diabetes in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 119014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2020.119014	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13件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小賤健一郎
2. 発表標題 独自開発の腫瘍溶解性ウイルス / 遺伝子治療の基礎・応用研究から非臨床・臨床開発まで
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三井薫、高橋知之、井手佳菜子、松田恵理子、小賤健一郎
2. 発表標題 アデノウイルスベクターを用いたヒト多能性幹細胞への高効率遺伝子導入法
3. 学会等名 日本解剖学会第77回九州支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三井薫、高橋知之、井手佳菜子、松田恵理子、小賤健一郎
2. 発表標題 Optimization of Highly Efficient Gene Transfer with Adenoviral Vectors in Human Pluripotent Stem Cells.
3. 学会等名 第27回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永野聡、小賤健一郎
2. 発表標題 独自開発の増殖制御型アデノウイルスSurv.m-CRA-1を用いたFirst-In-Human医師主導治験
3. 学会等名 第5回日本臨床薬理学会 九州・沖縄地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永野聡、小戩健一郎、篠原直弘、佐々木裕美、谷口昇
2. 発表標題 進行性骨軟部腫瘍に対する独自開発の増殖制御型アデノウイルスを用いた医師主導治験
3. 学会等名 第141回西日本整形・災害外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小戩健一郎、永野聡
2. 発表標題 Research and Development, Nonclinical Studies and First-In-Human and Phase / Clinical Trials of Conditionally Replicating Adenovirus Targeting and Treating with Multiple Factors (m-CRA) for Next-Generation Oncolytic Virus Immunotherapy.
3. 学会等名 第27回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永野聡、小戩健一郎
2. 発表標題 腫瘍溶解性ウイルス療法の開発と展望
3. 学会等名 第94回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ken-ichiro Kosai
2. 発表標題 Cancer Gene Therapy In Particular Oncolytic Virus Immunotherapy.
3. 学会等名 4th International Conference on Translational Medicine and Health Sciences(ICTMHS2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田恵理子、小戩健一郎
2. 発表標題 難治性疾患に対する増殖因子HGFとHB-EGFの生体内作用の解明と治療薬への研究
3. 学会等名 日本解剖学会第76回九州支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西川路侑耶、伊地知暢広、三井薫、小戩健一郎
2. 発表標題 次世代の腫瘍溶解性ウイルスの開発と癌と再生医学への治療応用
3. 学会等名 日本解剖学会第76回九州支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三井薫、伊地知暢広、井手佳菜子、小戩健一郎
2. 発表標題 COVID-19下でのオンライン組織学実習への取り組み
3. 学会等名 日本解剖学会第76回九州支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田恵理子、小戩健一郎
2. 発表標題 1型糖尿病マウスに対する安全性と低用量による治療効果を確保した肝細胞増殖因子HGFアデノウイルス遺伝子治療
3. 学会等名 第14回桜ヶ丘地区基礎系研究発表会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 Satoshi Nagano, Toshitaka Futagawa, Eriko Sumi, Nobuhiro Ijichi, Munekazu Yamakuchi, Masanori Nakajo, Teruto Hashiguchi, Yasuo Takeda, Takashi Yoshiura, Akira Shimizu, Muneo Takatani, Setsuro Komiya, Ken-ichiro Kosai.
2. 発表標題 Survivin-responsive Conditionally Replicating Adenovirus for Patients with Advanced Sarcoma Demonstrated Potent and Long-term Efficacy and High Safety in Phase 1 Clinical Trial.
3. 学会等名 2020 ASCO Annual Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計7件

産業財産権の名称 再発した原発性骨軟部腫瘍の治療用医薬組成物	発明者 小賤健一郎、永野 聡、二川俊隆	権利者 株式会社ウィッ ク・バイオテッ ク・ファーマ
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-084823	出願年 2021年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 糖尿病に対するHB-EGF遺伝子治療	発明者 小賤健一郎、松田恵 理子	権利者 鹿児島大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-33714	出願年 2021年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 糖尿病に対する低用量の肝細胞増殖因子遺伝子治療	発明者 小賤健一郎、松田恵 理子	権利者 鹿児島大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-192844	出願年 2020年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 安全を確保しながら転移性がんまで効果的に治療可能な、搭載する免疫誘導遺伝子の最適 発現レベルを与える発現制御システムを有する腫瘍溶解性ウイルス(腫瘍溶解性免疫治療)	発明者 小賤健一郎、伊地知 暢広	権利者 鹿児島大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願 2019-552379	出願年 2020年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 安全を確保しながら転移性がんまで効果的に治療可能な、搭載する免疫誘導遺伝子の最適 発現レベルを与える発現制御システムを有する腫瘍溶解性ウイルス(腫瘍溶解性免疫治療)	発明者 小賤健一郎、伊地知 暢広	権利者 鹿児島大学
産業財産権の種類、番号 特許、16/758,019	出願年 2020年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 安全を確保しながら転移性がんまで効果的に治療可能な、搭載する免疫誘導遺伝子の最適 発現レベルを与える発現制御システムを有する腫瘍溶解性ウイルス(腫瘍溶解性免疫治療)	発明者 小賤健一郎、伊地知 暢広	権利者 鹿児島大学
産業財産権の種類、番号 特許、18875645.6	出願年 2020年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 安全を確保しながら転移性がんまで効果的に治療可能な、搭載する免疫誘導遺伝子の最適 発現レベルを与える発現制御システムを有する腫瘍溶解性ウイルス(腫瘍溶解性免疫治療)	発明者 小賤健一郎、伊地知 暢広	権利者 鹿児島大学
産業財産権の種類、番号 特許、201880072138.9	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔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	三井 薫  (Mitsui Kaoru)  (40324975)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授    (17701)	
研究分担者	伊地知 暢広  (Ijichi Nobuhiro)  (80380624)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教    (17701)	

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