

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659227

研究課題名（和文）

麻疹ウイルス抗体ディスプレイライブラリーを用いた癌標的治療法の開発

研究課題名（英文）

Development of tumor-targeted therapy using measles virus-displayed antibody library

研究代表者 中村 貴史

(Nakamura Takafumi)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：70432911

研究成果の概要（和文）：

これまで弱毒化麻疹ウイルスのリバースジェネティクス法により、一本鎖抗体（scFv）をウイルス表面蛋白上に提示し、かつ元来のウイルス親和性を排除することによって、scFv が持っている特異性と親和性を介して特定の標的腫瘍細胞にのみ感染させる技術を世界で初めて開発した。

そこで本研究では、このテクノロジーを応用し、ウイルスに scFv を提示させた革新的ディスプレイライブラリー、“ウイルス(Virus) + 抗体ライブラリー(Antibody Library) = ビロボディライブラリー(Virobody Library)”を確立し、その技術を用いて新規抗体医薬の開発を目指した。scFv を提示した麻疹抗体ディスプレイライブラリーを、ヒト A549 肺癌、又は Panc1 膵臓癌細胞に MOI=0.01～1 で感染させ、1 時間のインキュベーション後、OPTI-MEM (Invitrogen 社) で 4 回感染細胞を洗浄した。培養 2～5 日後、ウイルス感染細胞を集め、凍結融解することによってウイルスを回収するバイオパニング工程を繰り返した。最終的にクローン化したウイルスのゲノム RNA を回収し、RT-PCR 法により scFv 遺伝子を増幅し、シーケンズ解析を行うことによって腫瘍特異的抗体の同定を試みた。しかしながら、同定されてきた scFv は癌細胞に対する抗体として機能するものではなかった。この原因としては、麻疹抗体ディスプレイライブラリーの多様性が不十分であると予想された。そこで従来のライゲーションではなく、 $\lambda$ ファージの部位特異的組換え反応を利用したプラスミドライブラリーの構築法によって、非常に効率よく安定してプラスミドライブラリーを獲得することが可能となった。一方、従来の麻疹蛋白発現ヘルパー細胞を用いたウイルス回収は非常に低い効率であったが、非増殖型 T7 ポリメラーゼ発現ワクシニアウイルスによる発現系を用いたレスキュー法によって、その効率は大幅に向上した。

研究成果の概要（英文）：

We have successfully developed a pseudoreceptor system which allows rescue and propagation of retargeted viruses displaying single chain antibody fragments (scFvs). Thus, receptor choice is not a significant limitation for targeting measles viruses and the use of single chain antibodies for targeting potentially allows us to redirect the virus against any chosen cellular receptor.

In this study, we try to develop measles virus-displayed scFv library (virobody library) using the technology for identification of tumor-specific scFv. Human A549 lung, or BxPC-3 pancreatic carcinoma cells were infected with virobody library at an MOI of 0.01 to 1, one hour later the cells were washed with Opti-MEM medium (Invitrogen) four times. 2 to 5 days after infection, propagated viruses were harvested by repeated freeze-thaw cycles from the GFP-positive infected cells. The biopanning was repeated several times, and finally the tumor-targeted measles virus was cloned from the GFP-positive infected cells. The cDNA encoding scFv from the viral RNA genome was amplified by RT-PCR for sequence analysis. However, the identified scFvs were not functional as a tumor-specific antibody. We have assumed that the diversity of measles virus-displayed scFv library is not sufficient enough to identify tumor-specific scFvs. To address this question, not traditional ligation method but Gateway® Technology-based cloning method (Invitrogen) was used

for generation of plasmid library. Various kind of scFvs were incorporated into the C terminus of a receptor-blind H gene in a full-length cDNA clone of Edmonston measles virus. Furthermore, infectious scFv-displaying measles viruses were rescued from the full-length cDNA clones using helper vaccinia virus expressing T7 RNA polymerase. These modifications dramatically increased the diversity of measles virus-displayed scFv library.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	420,000	3,220,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：実験外科学

1. 研究開始当初の背景

癌は日本における死亡原因でもっとも多い病気であり、特に現行の治療法に対して極めて高い抵抗性を示す難治性悪性腫瘍の新規治療法の確立が望まれている。これまで本申請者は、弱毒化麻疹ウイルスのリバースジェネティクス法により、一本鎖抗体 (scFv) をウイルス表面蛋白上に提示し、かつ元来のウイルス親和性を排除することによって、scFv が持っている特異性と親和性を介して特定の標的腫瘍細胞にのみ感染させる技術を世界で初めて開発した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、この技術を応用し、ウイルスに scFv を提示させた革新的ディスプレイライブラリー、“ウイルス (Virus) + 抗体ライブラリー (Antibody Library) = ビロボディライブラリー (Virobody Library)” を確立することである。そして、この他に類のないビロボディライブラリーより、網羅的に悪性腫瘍特異的抗体を同定し、新しい癌標的治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

scFv を提示した麻疹抗体ディスプレイライブラリーを、ヒト A549 肺癌、又は PancI 膵臓癌細胞に MOI=0.01~1 で感染させ、1 時間のインキュベーション後、OPTI-MEM (Invitrogen 社) で 4 回感染細胞を洗浄した。培養 2~5 日後、ウイルス感染細胞を集め、凍結融解することによってウイルスを回収するバイオパニング工程を繰り返した。最終

的にクローン化したウイルスのゲノム RNA を回収し、RT-PCR 法により scFv 遺伝子を増幅し、シーケンス解析を行うことによって腫瘍特異的抗体の同定を試みた。

4. 研究成果

同定されてきた scFv を解析した結果、それらは癌細胞に対する抗体として機能するものではなかった。この原因としては、麻疹抗体ディスプレイライブラリーの多様性が不十分であると予想された。特異性と親和性が高い目的の抗体を得るためには、より多様性の大きいライブラリーを構築することが重要である。例えばファージ抗体ディスプレイライブラリーでは、10 の 11 乗種類の多様性を維持できる。

そこで、麻疹抗体ディスプレイライブラリーの多様性を高めることに焦点を当てた。従来のライゲーションではなく、 $\lambda$ ファージの部位特異的組換え反応を利用したプラスミドライブラリーの構築法によって、非常に効率よく安定してプラスミドライブラリーを獲得することが可能となった。一方、従来の麻疹蛋白発現ヘルパー細胞を用いたプラスミドライブラリーからのウイルス回収は、非常に低い効率であったが、非増殖型 T7 ポリメラーゼ発現ワクシニアウイルスによる発現系を用いたレスキュー法によって、その効率は大幅に向上した。今後は、これらの改良に従って再構築した麻疹抗体ディスプレイライブラリーを利用して、腫瘍特異的抗体の同定を試みる予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

1. Miyamoto S, Inoue H, **Nakamura T**, Yamada M, Sakamoto C, Urata Y, Okazaki T, Marumoto T, Takahashi A, Takayama K, Nakanishi Y, Shimizu H and Tani K. Coxsackievirus B3 is an oncolytic virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 72: 2609-2621, 2012.
2. Hikichi M, Minoru Kidokoro M, Haraguchi T, Iba H, Shida H, Tahara H and **Nakamura T**: MicroRNA regulation of glycoprotein B5R in oncolytic vaccinia virus reduces viral pathogenicity without impairing its antitumor efficacy. *Molecular Therapy* 19, 1107-1115, 2011.

[学会発表] (計4件)

1. **Takafumi Nakamura**. MicroRNA Targeting of Oncolytic Viruses for cancer therapy: 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011/10/4, Oral presentation.
2. Mina Hikichi, Minoru Kidokoro, Hisatoshi Shida, Hideaki Tahara and **Takafumi Nakamura**. MicroRNA Regulation of Glycoprotein B5R in Oncolytic Vaccinia Virus Reduces Viral Pathogenicity without Impairing its Antitumor Efficacy: The International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 札幌, 2011/9/12, Oral presentation.
3. **Takafumi Nakamura**, Mina Hikichi, Minoru Kidokoro, Hisatoshi Shida and Hideaki Tahara. Development of tumor-targeting vaccinia viruses as novel oncolytic agents: The 17th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 福岡, 2011/7/17, Oral presentation.
4. Mina Hikichi, Minoru Kidokoro, Hisatoshi Shida, Hideaki Tahara and **Takafumi Nakamura**. Enhancing therapeutic index of oncolytic vaccinia virus through combining microRNA regulation and thymidine kinase deletion: The 14th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy, Seattle, USA, 2011/5/20, Oral presentation.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 貴史 (Nakamura Takafumi)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号: 70432911

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし