

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650629

研究課題名(和文) レンチ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 lentivirus-displayed antibody library

研究代表者

中村 貴史 (NAKAMURA, Takafumi)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70432911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究により、麻疹ウイルスのエンベロープであるH/F蛋白による膜融合能を、H蛋白の元来の細胞レセプターCD46及びSLAMへの吸着能を排除する変異(Haals)を加え、かつ一本鎖抗体(scFv)を付加することで制御した。そこでレンチウイルスのエンベロープをHaals-scFv/F蛋白で置換することによって、scFvを介して特定の標的細胞にのみ感染するシュードタイプレンチウイルスベクターを作出している。さらに、この技術を応用してレンチウイルスにscFvsを提示させた革新的ライブラリーを確立し、これより網羅的に悪性腫瘍特異的抗体を同定することによって新しい癌標的治療法の開発を目指している。

研究成果の概要(英文)：We previously showed that antibody-targeted cell fusion can be achieved by engineering a fusogenic viral membrane glycoprotein complex. Single-chain antibodies were displayed at the extracellular C terminus of the measles hemagglutinin (H) protein, and combinations of point mutations were introduced to ablate its ability to trigger fusion through the native viral receptors CD46 and SLAM. When coexpressed with the measles fusion (F) protein, the retargeted H proteins (Haals-scFvs) could mediate antibody-targeted cell fusion of receptor-negative or receptor-positive index cells with receptor-positive target cells. Now we have successfully pseudotyped lentiviral vectors with the glycoproteins Haals-scFv and F for targeted cell entry. Thus, the use of single chain antibodies for targeting potentially allows us to redirect the virus against any chosen cellular receptor. We also try to develop lentivirus-displayed scFvs library using the technology for identification of tumor-specific scFv.

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：癌 抗体 バイオテクノロジー ウイルス 生体機能利用

1. 研究開始当初の背景

手術や化学療法を中心とした癌に対する集学的治療の進歩により、その治療成績は徐々に向上してきている。しかしながら、難治性進行癌は現行の治療法に対して極めて高い抵抗性を示すため、早期診断法、及び効果的な治療法の確立が望まれている。その一つとして注目されているのが抗体医薬であり、欧米を中心とした臨床試験の結果では、その有効性が示されている。これは、分子生物学的手法を用いた抗体作製技術の確立による成果であり、今も新規抗体医薬の開発に焦点が当てられている。

これまでの研究により、麻疹ウイルスのエンペロープである H/F 蛋白による膜融合能を、H 蛋白の元来の細胞レセプター CD46 及び SLAM への吸着能を排除する変異 (Haals) を加え、かつ一本鎖抗体 (scFv) を付加することによって制御することに世界で初めて成功した (Nakamura T et al. *Nature Biotechnology*, 22: 331-336, 2004)。この戦略は、標的分子を認識する scFv ドメインを変えるだけで、様々な種類の腫瘍細胞へ特異的に感染する麻疹ウイルスの作成を可能にした (Nakamura T et al. *Nature Biotechnology*, 23: 209-214, 2005)。

2. 研究の目的

そこで本研究では、レンチウイルスのエンペロープを Haals-scFv/F 蛋白で置換することによって、scFv を介して特定の標的細胞にのみ感染するシュードタイプレンチウイルスベクターを作出する。さらに、この技術を応用してレンチウイルスに scFvs を提示させた革新的ライブラリー、“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。そして、この Virobody Library 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

多様性の異なる 3 種類の scFv [複数ドナーのリンパ球より、mRNA を単離し RT-PCR 反応により cDNA を合成後、その cDNA より VH (重鎖の可変領域) 遺伝子と VL (軽鎖の可変領域) 遺伝子を PCR 反応で増幅し、リンカーペプチドで結合した scFv 遺伝子ライブラリー、あらかじめファージ抗体ディスプレイライブラリーのヒト肺癌、又は膵臓癌細胞に対する 2 ~ 3 回のバイオパニングによって濃縮された scFv ライブラリー、又は CD9、CD20、CD38、CEA、EGFR、EGFR v III、HER2、TfR など同定済みの腫瘍特異的 scFv からなる

ミニ scFv ライブラリー] を Haals の細胞外 C 末端に連結させ、その Haals-scFv をレンチウイルスベクターに挿入したプラスミドライブラリーを構築した。

次に、これらのプラスミドライブラリーからレンチウイルス抗体ディスプレイライブラリーを作製し、ヒト肺癌、又は膵臓癌細胞への感染による scFv のスクリーニングを試みた。

4. 研究成果

医科学研究において遺伝子導入のため広範に利用されているレンチウイルスベクターは、自身のエンペロープを水泡性口内炎ウイルスの糖タンパク質 (VSV-G) でシュードタイプすることによって宿主域を広げ、広範な動物種への遺伝子導入を可能にする。

そこで、VSV-G シュードタイプレンチウイルスを作出する場合と同様に、Haals-scFv/F 発現プラスミドを使った方法でシュードタイプ標的化レンチウイルスを作出した。CD9、CD20、CD38、CEA、EGFR、EGFR v III、HER2、TfR など同定済みの各腫瘍特異的 scFv を変異 Haals 蛋白に提示する Haals-scFv/F シュードタイプレンチウイルスは、各標的分子を介して、標的細胞特異的に感染した。VSV-G シュードタイプレンチウイルス、又は Haals-EGFR scFv/F シュードタイプレンチウイルスを、ヒト乳癌細胞 MDAMB231、ヒト膵臓癌細胞 Panc1、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO、又はヒト慢性骨髄性白血病細胞 K562 に感染させ、蛍光顕微鏡下で感染によって導入される GFP の発現を観察した。その結果、VSV-G シュードタイプレンチウイルスはすべての細胞に感染した (図 1)。

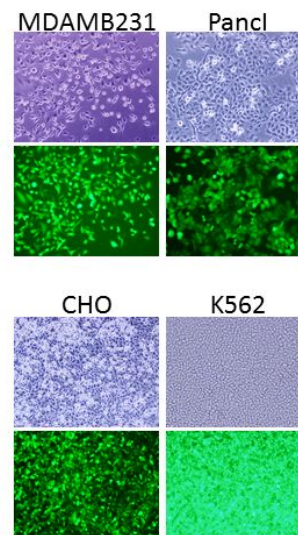


図1 VSV-Gシュードタイプレンチウイルス感染細胞：明視野観察(上)と蛍光観察(下)

それに対し Haals-EGFR scFv/F シュードタイプレンチウイルスはEGFR陽性のMDAMB231、Panc1において感染するが、EGFR陰性のCHO、K562においては感染せず、標的分子であるEGFRを介して、標的細胞特異的に感染することが実証された(図2)。

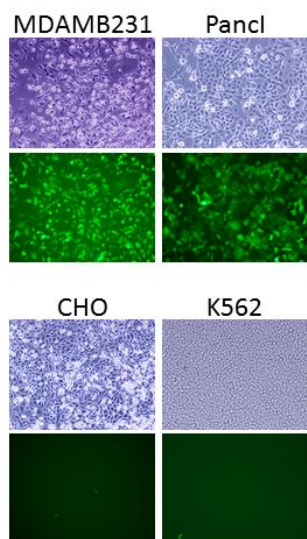


図2 Haals-EGFR scFv/F シュードタイプレンチウイルス感染細胞：明視野観察(上)と蛍光観察(下)

一方、レンチウイルス抗体ディスプレイライブラリーを作出する場合、Haals-scFvs 発現ユニットをウイルスゲノムへ挿入する必要がある。本研究で構築したプラスミドライブラリーからレンチウイルス抗体ディスプレイライブラリーを作出した。その結果、Haals-scFv/F 発現プラスミドを使ったシュードタイプレンチウイルスの作出に比べて、Haals-scFvs 発現ユニットをウイルスに挿入した抗体ライブラリーの作出では、ウイルスの産出量が激減し、十分なライブラリーサイズに達していないことが判明した。

以上よりレンチウイルス抗体ディスプレイライブラリーでは、Haals-scFvs 発現ユニットをウイルスゲノムへ挿入していることが、ウイルス産出量を低下させる原因であると考えられた。現在、ウイルス産出量を向上させるための改良に取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1. Lech PJ, Pappoe R, Nakamura T, Russell SJ. Antibody neutralization of retargeted measles viruses. *Virology* 454-455: 237-246, 2014. doi:

- 10.1016/j.virol.2014.01.027. 査読有
2. Ohashi T, Nakamura T, Kidokoro M, Zhang X, and Shida H. Combined Cytolytic Effects of a Vaccinia Virus Encoding a Single Chain Trimer of MHC-I with a Tax-Epitope and Tax-Specific CTLs on HTLV-I-Infected Cells in a Rat Model. *Biomed Research International*. Volume 2014: Article ID 902478, 2014. doi: 10.1155/2014/902478. 査読有
3. 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.* 15: 2609-2621, 2012. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3185. 査読有

[学会発表](計8件)

1. Takafumi Nakamura. Safety profile, tumor selectivity and oncolytic effects after systemic administration of oncolytic vaccinia virus MDV: 第72回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013/10/5, Oral presentation.
2. Naoyoshi Nitta, Nao Okada, Ikumi Goto, Masato Yamane, Motomu Nakatake, Hajime Kurosaki, Takafumi Nakamura. SYSTEMIC CANCER VIROTHERAPY WITH MDVV, A COMBINED miRNA-REGULATED AND THYMIDINE KINASE-DELETED ONCOLYTIC VACCINIA VIRUS: The 19th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 岡山, 2013/7/4, Oral presentation.
3. Naoyoshi Nitta, Nao Okada, Ikumi Goto, Motomu Nakatake, Masato Yamane, Hajime Kurosaki, Takafumi Nakamura. Systemic cancer virotherapy with MDVV, a combined miRNA-regulated and thymidine kinase-deleted oncolytic vaccinia virus: The Seventh International Meeting On Replicating Oncolytic Virus Therapeutics, Quebec City, Canada, 2013/6/16, Poster presentation.
4. Takafumi Nakamura. MicroRNA regulation of viral replication for oncolytic virotherapy: The 2nd Meeting on RNA and Biofunctions-ASIA Study "RNA Biofunctions and Viruses, 福岡, 2013/1/9, Oral presentation.
5. Takafumi Nakamura. Systemic cancer therapy with MDVV, a combined miRNA-regulated and thymidine

- kinase-deleted oncolytic vaccinia virus:
第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌,
2012/9/19, Oral presentation.
6. **中村貴史**. マイクロ RNA によって制御されるウイルスベクターの開発: 第 14 回日本 RNA 学会年会, 仙台, 2012/7/18, Oral presentation.
 7. Mina Hikichi, Minoru Kidokoro, Hisatoshi Shida, Hideaki Tahara, **Takafumi Nakamura**. SYSTEMIC ONCOLYTIC VIROTHERAPY WITH TUMOR-SPECIFIC REPLICATING VACINIA VIRUSES: The 18th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 熊本, 2012/6/29, Oral presentation.
 8. Mina Hikichi, **Takafumi Nakamura**. Systemic cancer virotherapy with MDVV, a combined miRNA-regulated and thymidine kinase-deleted oncolytic vaccinia virus: The 15th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy, Philadelphia, USA, 2012/5/17, Poster presentation.

〔図書〕(計 1 件)

1. **中村貴史**. miRNA 制御ウイルスによるがん細胞特異的治療法の開発. 遺伝子医学 MOOK23 号: 176-181, 2012 (落谷 孝広 監修、株式会社メディカルドゥ)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

1. 名称: 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ依存性組換えワクシニアウイルス (MD-RVV) 及びその使用
発明者: **中村貴史**
権利者: 国立大学法人鳥取大学、
一般財団法人化学及血清療法研究所
種類: 特許
番号: 2013-241299
出願年月日: 2013 年 11 月 22 日
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

1. 研究内容紹介
<http://www.med.tottori-u.ac.jp/integbio/522/1198.html>
2. ウイルスで新しいがん療法の開発をめざす
<http://ganshien.umin.jp/public/research/main/nakamura/>
3. がんナビ
http://medical.nikkeibp.co.jp/leaf/all/cancernavi/report/201301/528660_3.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 貴史 (NAKAMURA Takafumi)

鳥取大学・医学系研究科・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