

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290059

研究課題名(和文) がん特異性と腫瘍溶解能を増強した組換えヘルペスウイルスによるがん治療法の開発

研究課題名(英文) Augmentation of tumor specificity and killing activity of oncolytic herpes virus vectors

研究代表者

内田 宏昭 (Uchida, Hiroaki)

東京大学・医科学研究所・講師

研究者番号：20401250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは最近、単純ヘルペスウイルス(HSV)の外被糖蛋白質gDに単鎖抗体を挿入することにより、がん細胞表面抗原のみを介して細胞内に侵入する標的化HSVプラットフォームの構築に成功した。本研究では、膜融合能を増強する機能を有することが知られているsyncytial変異を本標的化HSVに導入することにより、がん細胞に広範な細胞融合を生じるとともに強力な殺細胞効果をもたらす新規標的化HSVの作製に成功した。さらに私たちは、独自のモノクローナル抗体リソースを活用して、epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) を標的とする新たながん標的化HSVの作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：We previously reported a retargeted herpes simplex virus (HSV) platform that incorporates single-chain antibodies (scFv) into gD to mediate entry solely via cancer antigens. In this study, we introduced syncytial mutations, known to confer hyperactivity in cell-cell fusion, into our retargeted HSVs, and found that the mutations enabled extensive formation of syncytia and enhanced killing activity on human tumor lines that express the target molecules. Furthermore, we took advantage of our collection of monoclonal antibodies selected for targeting activity as components of gene delivery vectors. We derived an scFv from a hybridoma clone that produces an anti-epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) antibody, and inserted it into our retargeted platform, and found that the virus showed EpCAM-dependent virus entry and spread. Our strategies may be useful to develop a widely applicable oncolytic HSV platform that confers powerful oncolytic activity and stringent tumor selectivity.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：遺伝子治療 腫瘍溶解性ウイルス療法 ヘルペスウイルス 抗体 がん

1. 研究開始当初の背景

難治性悪性腫瘍に対する新たな治療法としてウイルスベクターを用いた遺伝子治療・ウイルス療法が有望視されてきた。中でも腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス (HSV) 療法はすでに本邦を含め広く臨床研究が進行中であり、がんに対するバイオセラピーとして非常に大きな期待を集めている。腫瘍溶解性ウイルス療法は、変異あるいは改変ウイルスが正常細胞に比べがん細胞においてより効率よく増殖することを利用してがん組織を選択的に破壊することを図るものであるが、未だ標準的治療法としての地位を確立するには至っていない。その主な原因は、ウイルスベクターのデリバリーを制御することの困難さにあると考えられている。今日までの臨床研究で用いられてきた腫瘍溶解性ウイルスは正常細胞にも侵入 (エンタリー) してしまうため、安全性を確保するためにはウイルスの増殖能を弱めざるを得ず、これが腫瘍溶解能の低下にもつながりうるというジレンマが存在した。

私たちは最近、HSV の標的化改変に独自に成功した。ウイルス表面の糖蛋白質 gD を本来の受容体に結合不能とすると同時に、epidermal growth factor receptor (EGFR) あるいは carcinoembryonic antigen (CEA) などががん細胞表面分子に対する単鎖抗体を挿入した結果、それぞれ標的がん細胞のみに効率よくエンタリーできる標的化 HSV を作製することができた。動物実験ではマウス皮下および同所性脳腫瘍モデルにて標的化ウイルスの腫瘍内投与により強力な抗腫瘍効果を認め、標的化ウイルスを経静脈投与するとウイルスの腫瘍への強い集積 (正常臓器の 100-1000 倍) を認めた。さらにマウス脳内投与後の毒性評価では、標的化ウイルスは野生型ウイルスの致死量の 10 万倍の粒子数を投与してもマウスに異常を生じないという有望な成果を得た。

2. 研究の目的

私たちのがん標的化改変 HSV システムを実用化するために取り組むべき課題として、標的化エンタリー後のウイルスを腫瘍塊の中で効率よく伝播させ、正常組織を傷害することなくがん細胞を殺傷し尽くすこと、さらに異なるがん細胞表面分子を標的とした改変 HSV の作製により、様々なタイプのがんを個別標的化しうる治療システムの構築を目指すことが挙げられる。本研究では、これら課題の解決に向けた検討を行った。

3. 研究の方法

がん標的化改変 HSV の細胞間伝播の増強
私たちは、がん標的化改変 HSV の細胞間

伝播の効率を増強するアプローチとして、HSV 感染における膜融合の活性を増強することが知られている syncytial (syn) 変異を活用することを考案した。野生型 HSV の感染によって生じるプラークは感染細胞の円形化を特徴とする一方、syn 変異を有する HSV 亜株では、感染細胞がこれに隣接する非感染細胞と融合することを繰り返すことにより多核巨細胞が形成される。過去に数多くの syn 変異が報告されているが、その大半はウイルスのエンベロープ糖蛋白質 gB および gK に同定されている。そこで、本研究では代表的な gB および gK の syn 変異を EGFR 標的化 HSV に遺伝子工学的に導入し、その細胞間伝播の効率および標的特異性に及ぼす影響を解析した。

新たながん標的化改変 HSV の作製

私たちの研究グループは、がんに対する抗体医薬の開発を目的として、抗体結合改変アデノウイルス (Adv-FZ33) の抗体依存的な感染効率を指標とする抗原・抗体スクリーニング系を考案した。この系を用いてがん抗原・抗体セットを系統的に探索した結果、多数の抗体を樹立することに成功し、その抗原には EGFR や CD20 など、すでに抗体医薬として悪性腫瘍の分子標的治療に用いられているものや、標的候補分子として注目されているものなどが高い比率で含まれていた。そこで、この申請者ら独自の抗体リソースを標的化改変 HSV に適用することが可能であるかどうかにつき、epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) に対する抗体を用いて検討した。抗 EpCAM 抗体を産生するハイブリドーマ細胞より RT-PCR にて抗体の変領域の遺伝子をクローニングし、単鎖抗体を構築した。これを標的化 HSV プラットフォームに組み込むことにより EpCAM 標的化 HSV を作製しその特性を解析した。

4. 研究成果

がん標的化改変 HSV の細胞間伝播の増強

syn 変異を導入した EGFR 標的化 HSV の各種がん細胞における感染特性を解析したところ、親株の EGFR 標的化ウイルスでは小さなプラークしか生じなかったがん細胞株においても、gB と gK の syn 変異を用いることにより、非常に大きな多核巨細胞からなる感染プラークを形成した。興味深いことに、gB 変異の方が有効な細胞株、逆に gK 変異の方が有効な細胞株が存在し、HSV による細胞融合の分子機序における gB と gK の作用点が異なることが示唆されたとともに、複数の syn 変異を併用することの有用性が明らかとなった。syn 変異を導入した EGFR 標的化ウイルスは親株よりも効率良く標的がん細胞を殺傷した。また、syn 変異の導入による標的化スプレッドの増強効果は EGFR 以外のがん抗原をターゲットとした標的化 HSV にも認

められ、このアプローチは様々ながん抗原に対して応用可能であることが示唆された。さらに、感染が成立した標的がん細胞がこれに隣接する非標的細胞と融合してしまうことは認められず、syn 変異の導入は標的化 HSV の高いがん特異性を維持しつつその腫瘍溶解活性を増強することが可能であるという有望な結果を得た。

新たながん標的化改変 HSV の作製

EpCAM 標的化 HSV を作製し、そのウイルス学的特性を解析した結果、本標的化ウイルスのエントリーおよびスプレッドはともに標的細胞の EpCAM の発現に厳密に依存することが明らかとなった。興味深いことに、EpCAM 標的化 HSV は、がん細胞株によっては野生型 HSV よりも大きなプラークを形成した上、より強力な殺細胞効果を示した。さらに、担がんヌードマウスを用いた治療実験では、EpCAM 標的化 HSV の腫瘍内投与により抗腫瘍効果が観察された。このように、私たちのがん標的化改変 HSV プラットフォームは、様々なタイプのターゲット分子に対して適用可能であることが示唆された。

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 11 件)

- Shibata T, Uchida H*, Shiroyama T, Okubo Y, Suzuki T, Ikeda H, Yamaguchi M, Miyagawa Y, Fukuhara T, Cohen JB, Glorioso JC, Watabe T, Hamada H, Tahara H. Development of an oncolytic HSV vector fully retargeted specifically to cellular EpCAM for virus entry and cell-to-cell spread. *Gene Therapy*. In press. *Corresponding author.
- Nishii Y, Yamaguchi M, Kimura Y, Hasegawa T, Aburatani H, Uchida H, Hirata K, Sakuma Y. (2015) A newly developed anti-Mucin 13 monoclonal antibody targets pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *International Journal of Oncology*. 46:1781-1787.
- Miyagawa Y, Marino P, Verlengia G, Uchida H, Goins WF, Yokota S, Geller DA, Yoshida O, Mester J, Cohen JB, Glorioso JC. (2015) Herpes simplex viral-vector design for efficient transduction of nonneuronal cells without cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112:E1632-1641.
- Mazzacurati L, Marzulli M, Reinhart B, Miyagawa Y, Uchida H, Goins WF, Li A, Kaur B, Caligiuri M, Cripe T, Chiocca N, Amankulor N, Cohen JB, Glorioso JC, Grandi P. (2015) Use of miRNA response sequences to block off-target replication and increase the safety of an unattenuated, glioblastoma-targeted oncolytic HSV. *Molecular Therapy*. 23:99-107.
- Tanaka K, Miyata H, Sugimura K, Kanemura T, Mizote Y, Hamada-Uematsu M, Yamasaki M, Wada H, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y, Tahara H. Negative influence of programmed death-1-ligands on the survival of esophageal cancer patients treated with chemotherapy. *Cancer Science*. In press.
- Ma Z, Li W, Yoshiya S, Xu Y, Hata M, Eldaravish Y, Markova T, Yamanishi K, Yamanishi H, Tahara H, Tanaka Y, Okamura H. Augmentation of immune checkpoint blockade therapy with IL-18. *Clinical Cancer Research*. In press.
- 内田宏昭, 田原秀晃 (2015) 大腸癌の遺伝子治療・ウイルス療法 *日本臨床* 1077:569-573.
- Yamaguchi M, Nishii Y, Nakamura K, Aoki H, Hirai S, Uchida H, Sakuma Y, Hamada H. (2014) Development of a sensitive screening method for selecting monoclonal antibodies to be internalized by cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 454:600-603.
- Yamamoto Y, Hiraoka N, Goto N, Rin Y, Miura K, Narumi K, Uchida H, Tagawa M, Aoki K. (2014) A targeting ligand enhances infectivity and cytotoxicity of an oncolytic adenovirus in human pancreatic cancer tissues. *Journal of Control Release*. 192:284-293.
- Yamamoto Y, Goto N, Miura K, Narumi K, Ohnami S, Uchida H, Miura Y, Yamamoto M, Aoki K. (2014) Development of a novel efficient method to construct an adenovirus library displaying random peptides on the fiber knob. *Molecular Pharmaceutics*. 11:1069-1074.
- Wang PY, Currier MA, Hansford L, Kaplan D, Chiocca EA, Uchida H, Goins WF, Cohen JB, Glorioso JC, Kuppevelt TH, Mo X, Cripe TP. (2013) Expression of HSV-1 receptors in EBV-associated lymphoproliferative disease determines susceptibility to oncolytic HSV. *Gene Therapy*. 20:761-769.

[学会発表](計 23 件)

- 内田宏昭 がん表面抗原のみを介して

- 侵入する標的化改変ヘルペスウイルスベクターの開発 第2回 IMSUT-CGCT シンポジウム 2016年2月 東京
2. **Uchida H.** Exploration of cancer-targeting antibodies using an HSV-based screening system for development of novel HSV vectors fully retargeted to cancer cells. *The 21th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy*. July 2015. Osaka, Japan. 【シンポジウム指定登壇】
 3. 城山智貴, 内田宏昭, 大久保優, 柴田智子, 福原武志, 山口美樹, Justus B. Cohen, Joseph C. Glorioso, 渡部徹郎, 濱田洋文, 田原秀晃 腫瘍細胞表面抗原を介して侵入する標的化単純ヘルペスウイルスベクターの開発 第7回血液疾患免疫療法研究会 2015年9月 東京
 4. Shibata T, **Uchida H.**, Shiroyama T, Suzuki T, Okubo Y, Fukuhara T, Yamaguchi M, Miyagawa Y, Cohen JB, Glorioso JC, Watabe T, Hamada H, Tahara H. Generation of an EpCAM-retargeted HSV vector by application of in-house monoclonal antibody resources. *The 42st IMSUT Founding Commemorative Symposium*. June 2015. Tokyo, Japan.
 5. Okubo Y, **Uchida H.**, Ikeda H, Fukuhara T, Kojima M, Yamaguchi M, Miyagawa Y, Cohen JB, Glorioso JC, Watabe T, Hamada H, Tahara H. Exploration of cancer-targeting antibodies using an HSV-based screening system. *The 42st IMSUT Founding Commemorative Symposium*. June 2015. Tokyo, Japan.
 6. 内田宏昭 がん細胞表面抗原を介して細胞内侵入する標的化改変単純ヘルペスウイルスベクターの開発 第56回日本臨床ウイルス学会 2015年6月 岡山 【招待講演】
 7. 福原武志, 佐藤萌希, 岡本勇人, 内田宏昭, 濱田洋文, 渡部徹郎 メラノーマ新規バイオマーカーとして同定したIL13R α 2の機能解析 第87回日本生化学会大会 2014年10月 京都
 8. **Uchida H.**, Okubo Y, Shibata T, Suzuki T, Ikeda H, Shiroyama T, Fukuhara T, Kojima M, Yamaguchi M, Miyagawa Y, Cohen JB, Glorioso JC, Hamada H. Development of a new generation of herpes simplex virus vectors fully retargeted to a variety of tumor-associated antigens. *The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy*. Aug 2014. Tokyo, Japan.
 9. Okubo Y, Ikeda H, Fukuhara T, Kojima M, Cohen JB, Glorioso JC, Hamada H, Watabe T, **Uchida H.** Exploration of cancer-targeting antibodies using an HSV-based screening system. *The 39th International Herpesvirus Workshop*. July 2014. Kobe, Japan.
 10. Shibata T, Shiroyama T, Suzuki T, Okubo Y, Fukuhara T, Yamaguchi M, Miyagawa Y, Cohen JB, Glorioso JC, Hamada H, Watabe T, **Uchida H.** Generation of an EpCAM-retargeted HSV vector by application of in-house monoclonal antibody resources. *The 39th International Herpesvirus Workshop*. July 2014. Kobe, Japan.
 11. Wakata A, Okubo Y, Fukuhara T, Cohen JB, Glorioso JC, Nakano K, Kumagai I, Kuroki M, Hamada H, Watabe T, **Uchida H.** Augmentation of oncolytic potential of a fully retargeted HSV vector by introduction of syncytial mutations. *The 39th International Herpesvirus Workshop*. July 2014. Kobe, Japan.
 12. 駒井麻央, 鈴木拓真, 柴田智子, 大久保優, 福原武志, 宮川世志幸, Justus Cohen, Joseph Glorioso, 中野賢二, 熊谷泉, 黒木政秀, 濱田洋文, 内田宏昭 新たな腫瘍溶解ウイルス療法の開発 がん標的化単鎖抗体を挿入した単純ヘルペスウイルスによる精密なターゲティング 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月 神戸
 13. 松浦優太, 福原武志, 山口美樹, 西井ゆかり, 佐藤萌希, 池田瞳, 駒井麻央, 濱田洋文, 内田宏昭 がんの分子標的治療に最適ながん抗原・抗体セットを系統的・網羅的に探索するための新たな抗体スクリーニング法 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月 神戸
 14. 柴田智子, 鈴木拓真, 大久保優, 駒井麻央, 福原武志, 山口美樹, 平井幸恵, 宮川世志幸, Justus Cohen, Joseph Glorioso, 濱田洋文, 内田宏昭 単純ヘルペスウイルスの標的化改変プラットフォームへのがん標的化抗体インハウスリソースの適用 第61回日本ウイルス学会学術集会 2013年11月 神戸
 15. 鈴木拓真, 柴田智子, 大久保優, 福原武志, 宮川世志幸, Justus Cohen, Joseph Glorioso, 中野賢二, 熊谷泉, 黒木政秀, 山口美樹, 平井幸恵, 濱田洋文, 内田宏昭 エンベロープ糖蛋白 gD にがん標的化単鎖抗体を挿入した単純ヘルペスウイルスを用いた腫瘍溶解ウイルス療法の開発 第61回日本ウイルス学会学術集会 2013年11月 神戸
 16. 若田愛加, 大久保優, 福原武志, Justus Cohen, Joseph Glorioso, 中野賢二, 熊谷泉, 黒木政秀, 濱田洋文, 内田宏昭 がん特異的エントリーと高効率スプレッドを両立した腫瘍溶解ヘルペスウイル

- スの開発 第51回日本癌治療学会総会
2013年10月 京都
17. 大久保優, 鈴木拓真, 柴田智子, 駒井麻央, 福原武志, 山口美樹, 平井幸恵, 宮川世志幸, Justus Cohen, Joseph Glorioso, 濱田洋文, 内田宏昭 単純ヘルペスウイルス標的化プラットフォームへのがん標的化抗体リソースの適用 第51回日本癌治療学会総会 2013年10月 京都
 18. Wakata A, Okubo Y, Fukuhara T, Cohen JB, Glorioso JC, Nakano K, Kumagai I, Kuroki M, Hamada H, Uchida H. Manipulation of multiple herpes simplex virus glycoproteins for fully retargeted entry and efficient cell-to-cell spread 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月 横浜
 19. Okubo Y, Suzuki T, Shibata T, Komai M, Fukuhara T, Yamaguchi M, Hirai S, Miyagawa Y, Cohen JB, Glorioso JC, Hamada H, Uchida H. Application of in-house monoclonal antibody resources to a fully retargeted oncolytic herpes simplex virus platform 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月 横浜
 20. 福原武志, 濱田洋文, 内田宏昭 独自の標的化抗体探索技術から見出したメラノーマの分子標的 IL13Ra2 第86回日本生化学会大会 2013年9月 横浜
 21. 柴田智子, 鈴木拓真, 大久保優, 福原武志, 宮川世志幸, Justus Cohen, Joseph Glorioso, 中野賢二, 熊谷泉, 黒木政秀, 山口美樹, 濱田洋文, 内田宏昭 がん標的化単鎖抗体を組み込んだ単純ヘルペスウイルスによる腫瘍溶解ウイルス療法 第86回日本生化学会大会 2013年9月 横浜
 22. 佐藤萌希, 山口美樹, 西井ゆかり, 池田瞳, 松浦優太, 駒井麻央, 福原武志, 濱田洋文, 内田宏昭 新たな抗体スクリーニング法 がんの分子標的治療に好適ながん抗原・抗体セットの系統的・網羅的探索 第86回日本生化学会大会 2013年9月 横浜 【鈴木紘一メモリアル賞受賞】
 23. Wakata A, Okubo Y, Fukuhara T, Cohen JB, Joseph C. Glorioso JC, Nakano K, Kumagai I, Kuroki M, Hamada H, Uchida H. Syncytial mutations augment the oncolytic potential of a fully retargeted herpes simplex virus vector. *The 19th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy*. July 2013. Okayama, Japan. 【プレナリーセッション採択】

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/sur+trans/sur+be/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 宏昭 (UCHIDA HIROAKI)

東京大学・医科学研究所・講師

研究者番号： 20401250

(2) 研究分担者

山口 美樹 (YAMAGUCHI MIKI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号： 10530454

福原 武志 (FUKUHARA TAKESHI)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号： 20359673

田原 秀晃 (TAHARA HIDEAKI)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号： 70322071

(3) 連携研究者

該当なし。