

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462597

研究課題名(和文) 卵巣癌に対するナノポリマー修飾新規ウイルス療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of polymer-equipped oncolytic virotherapeutics against ovarian cancer.

研究代表者

那波 明宏 (NAWA, Akihiro)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：90242859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：進行卵巣癌の5年生存率は未だ30%程度で推移し、種々の抗癌剤や分子標的薬の併用により無増悪生存期間は延長されたものの劇的な改善を望むことは難しく、化学療法以外の新規治療法の導入が早急に必要である。本研究では、卵巣癌の90%で発現が上昇する葉酸レセプターを標的とした新しい腫瘍溶解性ウイルス療法の開発を行った。

葉酸レセプター高発現細胞特異的な腫瘍溶解性ウイルス感染を解析するため、葉酸レセプター発現ウイルス非感受性細胞を作製し、それを用いたin vitro評価系を構築した。

また、腫瘍溶解性ウイルスの宿主免疫応答を解析するため、同系マウス卵巣癌由来細胞を用いた卵巣癌腹膜播種モデルを構築した。

研究成果の概要(英文)：Ovarian cancer is the leading cause of death among women with gynecologic malignancies. Herpesvirus strain HF10 has promising oncolytic activity against a variety of tumor cells and xenografts. In this study, we established a novel virus delivery system targeting to folate receptor alpha molecules, highly expressed among 90% of ovarian cancer cells, and its in vitro evaluation system. The delivery system made it possible that oncolytic virus specifically killed ovarian cancer cells through viral lytic infection. We developed also an in vivo evaluation system using syngenic graft model of ovarian cancer, harboring immunocompetence, for various types of oncolytic virotherapeutics. It enabled to assess the host immune responses against the oncolytic virus infection.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：腫瘍溶解性ウイルス 卵巣癌腹膜播種 ナノポリマー修飾 HF10 葉酸レセプター FOLR1 腹膜播種モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

進行卵巣癌の5年生存率は未だ30%程度で推移し、Taxol、Carboplatin、Doxil、Topotecan や分子標的薬 Bevacizumab の併用により無増悪生存期間は延長されたものの、劇的な改善を望むことは難しく、化学療法以外の新規治療法の導入が早急に必要である。

腫瘍溶解性ウイルス療法は、現在までに、単純ヘルペスウイルス (Herpes simplex virus: HSV)、アデノウイルス、水泡性口内炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus: VSV)、レオウイルス、麻疹ウイルス等、様々なウイルスを用いて開発されてきた。近年、頭頸部癌、乳癌、悪性黒色腫等に対する治験が多数実施され、固形癌に対する局注接種では優れた治療成績を得られる場合も多い。しかしながら、進行卵巣癌のように腹膜播種した癌の場合、多数の癌の一つずつ腫瘍溶解性ウイルスを接種していくことは難しく、腫瘍溶解性ウイルス溶液の腹腔内投与が理想的ではあるが、腹腔内投与では、腫瘍溶解性ウイルスが腫瘍に到達する前に宿主免疫により中和不活化されてしまい、十分な抗腫瘍効果が得られない。腫瘍溶解性ウイルス療法を有効な卵巣癌治療法として実用化するためには、腹腔内あるいは全身性に投与可能で、宿主免疫による中和不活化を回避できる新しい腫瘍溶解性ウイルス粒子の開発が不可欠である。

我々は世界に先駆けて、卵巣癌を標的とした増殖型単純ヘルペスウイルスを用いたウイルス療法に着目し (Gynecol Oncol, 2003^{*1})、腹膜播種癌治療に有望な HSV1 型 HF10 株 (Arch Virol, 2003^{*2}) および US3 遺伝子欠損 HSV2 型 L1BR1 株 (Cancer Gene Ther, 2007^{*3}) を同定してきた。また、卵巣癌に対する新しい腫瘍溶解性ウイルス療法として、高分子ポリマー被覆したウイルスの宿主免疫回避能 (J Gene Medicine, 2012^{*4}) および大網中皮細胞を用いた carrier cell 法の有効性 (Cancer Gene Ther, 2011^{*5}) を報告してきた。

2. 研究の目的

卵巣癌を標的とした従来の腫瘍溶解性ウイルス療法では、ウイルス表面抗原が露出している生ウイルスを用いるため、宿主免疫によるウイルスの中和不活化を回避することは難しい。腹膜播種卵巣癌に対する腫瘍溶解性ウイルス療法を確立するためには、宿主免疫を回避可能で、卵巣癌に対する指向性を有する新しい腫瘍溶解性ウイルスの開発が非常に重要である。本研究では、従来の腫瘍溶解性ウイルス療法では治療の難しい腹膜播種卵巣癌に対する新しい治療法の確立のため、(1)新規ナノコーティングウイルス粒子の開発、(2)新規ウイルス粒子投与における腹腔内宿主免疫応答および腫瘍免疫応答の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 新規ナノコーティングウイルス粒子の開発

本研究では単純ヘルペスウイルス1型の腫瘍溶解性ウイルスである HF10 株を用いた。

ウイルス粒子のナノコーティング

宿主免疫を回避するためにはウイルス表面抗原を被覆する必要がある。ウイルス表面を被覆するナノコーティングの基材に用いる高分子として、コンドロイチン硫酸、ポリエチレンイミン、リポソーム、デキストラン、DEAE デキストラン、ヒアルロン酸を用い、それぞれのウイルス感染性を Vero 細胞を用いた plaque 法により測定した。また、宿主免疫回避能をヒト血清由来 グロブリンを用いた中和不活化法にて測定した。

高分子コーティングウイルス粒子表面の葉酸分子修飾

卵巣癌の 90-95% で葉酸レセプター (folate receptor : FR) の発現が上昇していることが知られている。FITC 修飾した葉酸分子が血行性に卵巣癌に到達し、卵巣癌細胞特異的に取り込まれる (G.M. van Dam *et al.* 2011, Nature Med) ことから、FR 発現の卵巣癌特異性は非常に高いと考えられる。また、FR を標的とした抗体治療薬である farletuzumab の卵巣癌に対する第 Ⅲ 相治験が実施されており (I. Vergote *et al.* 2016, J Clin Oncol) 卵巣癌治療標的分子としての適性も高い。本研究では、FR を標的分子とし、腫瘍溶解性ウイルスを卵巣癌特異的に送達する手法の開発を行った。

高分子コーティングしたウイルス粒子表面に葉酸分子を修飾するため、単純混合およびクロスリンカー (EDC, NHS) を用いた。

また、抗 glycoprotein B (gB) 抗体、抗 glycoprotein E (gE) 抗体または抗 glycoprotein G (gG) 抗体を介して、卵巣癌細胞にウイルス粒子を感染させる手法の検討も行った。具体的には、抗 gB 抗体、抗 gE 抗体または抗 gG 抗体をクロスリンカー試薬 (EDC, NHS) を用いて葉酸分子と結合させ、ウイルス粒子と混合した。葉酸分子が細胞側の FR と、抗 gB、gE、gG 抗体がウイルス粒子の gB、gE、gG とそれぞれ結合し、卵巣癌細胞に対するウイルス粒子の感染性の解析を行った。

葉酸レセプター発現系を用いた葉酸修飾型腫瘍溶解性ウイルス評価系の作製

腫瘍溶解性ウイルスが FR を高発現した卵巣癌細胞特異的に送達されているか否かを評価するため、FR 発現腫瘍溶解性ウイルス非感受性細胞を作製した。

ヒト卵巣癌由来細胞株である SKOV3 細胞から FR をコードする *FOLR1* 遺伝子を発現プラスミドにクローニングした。チャイニーズハムスター卵巣由来 CHO-K1 細胞株は、ヘルペスウイルスが細胞侵入に利用するレセプタータンパク質を発現していないため、ヘルペスウイルスが感染することができない。単

純ヘルペスウイルス非感受性である CHO-K1 細胞に *FOLR1* 遺伝子発現プラスミドを導入し、細胞表面に FR を発現させた。表面を葉酸修飾したウイルス粒子を感染させる。ウイルス粒子表面の葉酸分子と細胞表面の FR が結合し、ウイルスのレセプタータンパク質として機能し、ウイルス感染性を獲得するかを解析した。

(2) 新規腫瘍溶解性ウイルス粒子投与における腹腔内宿主免疫応答および腫瘍免疫応答の解析

従来の *in vivo* 研究では、担癌動物としてヌードマウスを用いているため、外来ウイルスに対する免疫が機能していない。このようなマウスモデルの場合、腫瘍溶解性ウイルスを接種しても宿主免疫応答が起こらず、実際の *in vivo* 動態を反映した評価系とは言い難い。そのため、本研究では、作製した高分子コーティングしたウイルス粒子について、宿主免疫応答を示す評価系で解析を行うため、同系マウス卵巣癌由来細胞を用いた腹膜播種卵巣癌担癌マウスを作製した。

4. 研究成果

(1) 新規ナノコーティングウイルス粒子の開発

コーティングに用いる高分子基材として、コンドロイチン硫酸、ポリエチレンイミン、リポソーム、デキストラン、DEAE デキストラン、ヒアルロン酸をそれぞれ用いて腫瘍溶解性ウイルス粒子をコーティングし、ウイルス感染性の解析を行った。その結果、感染性に於いては、リポソーム > ポリエチレンイミン > DEAE デキストランとなった。その他のコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、デキストランでコーティングを行ったウイルス粒子では感染はみられなかった。細胞毒性に於いては、リポソーム < ヒアルロン酸 < デキストラン < DEAE デキストラン < コンドロイチン硫酸 < ポリエチレンイミンの順となった。以上の結果から、ウイルス粒子をコーティングする際に用いる高分子基材は、リポソーム、DEAE デキストラン、ポリエチレンイミンが利用可能であることが明らかとなった。

さらに、リポソーム、DEAE デキストラン、ポリエチレンイミンでコーティングしたウイルス粒子に、ヒト血清由来 グロブリンを添加し、中和不活化回避能の解析を行った結果、いずれの高分子でコーティングしたウイルス粒子も、感染価がやや減少するのみで（グロブリンタンパク質によるウイルス粒子の非特異的な吸着による減少と考えられる）コーティングしていないウイルス粒子の場合に比較して、およそ 100 倍の感染価を示した。

これらの結果から、リポソーム、DEAE デキストラン、ポリエチレンイミンを用いてウイルス粒子をコーティングすることにより、腹膜播種卵巣癌にウイルス粒子を送達可能であることが示された。しかしながら、腹腔内

に存在する多量のタンパク質の非特異的な吸着により、接種したウイルス粒子の一部がトラップされてしまう可能性も考えられた。上記で得られた結果から、コーティング基材として適していると考えられるリポソーム、DEAE デキストラン、ポリエチレンイミンを用いてコーティングしたウイルス粒子表面に、単純混合またはクロスリンカー試薬を用いて葉酸分子を修飾し、FR 発現 CHO-K1 細胞（図 1）に接種した。その結果、クロスリンカー試薬を用いて葉酸分子修飾したウイルス粒子を接種した CHO-K1 細胞で、ごく一部の細胞にウイルス感染がみられた。一方、単純混合したのみのウイルス粒子では、一部の葉酸分子はコーティング層に取り込まれていると考えられたが、ウイルス感染はみられなかった。

また、抗 gB 抗体、抗 gE 抗体、抗 gG 抗体と葉酸分子を結合させた葉酸 - 抗体複合体を介して、卵巣癌細胞に腫瘍溶解性ウイルス粒子を感染させる方法の検討も行ったが、CHO-K1 細胞においてウイルス感染はみられなかった。

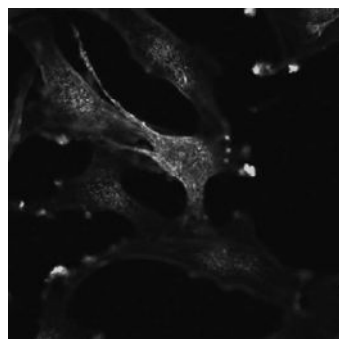


図 1 FR 発現 CHO-K1 細胞

(2) マウス卵巣癌由来細胞を同系マウスの腹腔内に移植した結果、腹膜播種癌が形成された。形成された癌組織を *in vitro* で数代継代し、得られた腹膜播種卵巣癌由来細胞を再び同系マウスの腹腔内に移植した。その結果、非常に増殖性の高い腹膜播種卵巣癌が形成された（図 2）。

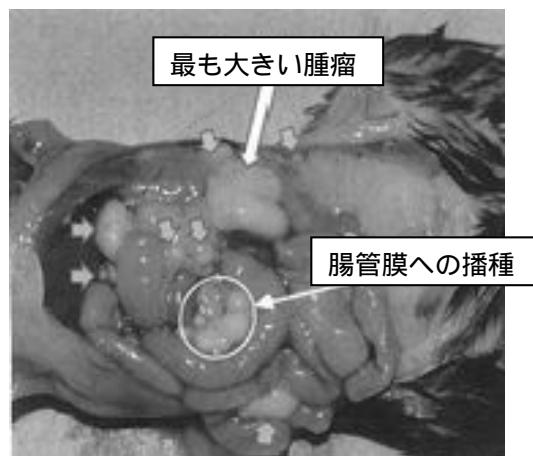


図 2 同系マウス卵巣癌由来細胞を用いた腹膜播種卵巣癌モデル

(研究総括) 本助成期間中、研究代表者が病床に臥し、さらに、研究機関の異動も重なり、集約的な研究体制を維持するのが非常に困難であった。そのため、当初予定していた研究計画を全て実施するには至らなかった。しかしながら、本研究の根幹である葉酸修飾高分子コーティング腫瘍溶解性ウイルス粒子の作製が可能となった事実は非常に重要である。本研究で得られた腫瘍溶解性ウイルス粒子の感染価は非常に低く実用に耐えないが、将来的には、高い感染性を付与できるようなコーティング技術の改善が必要である。特に、腹膜播種卵巣癌が散在する腹腔内には多量の腹水や、タンパク質が存在し、高感染価のウイルス粒子を接種しなければ、卵巣癌組織に十分な量のウイルス粒子を送達する事はできない。この点において、本研究で開発したコーティングウイルス粒子は高純度の精製が可能であるため、高感染価を達成できる余地を残している。高純度精製した高感染価のウイルス粒子を大量に、安定的に作製する方法の開発が今後の課題である。

(参考文献)

- * 1 A.Nawa *et al.*, Oncolytic viral therapy for human ovarian cancer using a novel replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant in a mouse model. *Gynecologic Oncology*, 91:81-88 (2003)
- * 2 T.Takakuwa *et al.*, Oncolytic viral therapy for peritoneally disseminated tumor using a spontaneously generated herpes simplex virus type 1 variant in immunocompetent mice. *Arch Virol.*, 148:813-825 (2003)
- * 3 H.Kasuya *et al.*, Suitability of a US3-inactivated HSV mutant (L1BR1) as an oncolytic virus for pancreatic cancer therapy. *Cancer Gene Ther.*, 14(6):533-42 (2007)
- * 4 K.Hamada *et al.*, Antitumor effect of chondroitin sulfate-coated ternary granulocyte macrophage-colony-stimulating factor plasmid complex for ovarian cancer. *J Gene Medicine*, 14(2):120-127 (2012)
- * 5 S.Fujiwara *et al.*, Carrier cell-based delivery of replication-competent HSV-1 mutants enhances antitumor effect for ovarian cancer. *Cancer Gene Ther.*, 18:77-86 (2011)

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 4 件)

K. Matsubara, T. Higaki, Y. Matsubara, A. Nawa. Nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. *Int J Mol Sci*. 査読あり 16(3), 2015, 4600-16

M. Koizumi, K. Oyama, Y. Yamakami, T. Kida, R. Satoh, S. Kato, S. Hidema, T. Oe, T. Goto, H. Clevers, A. Nawa, K. Nishimori. Lgr4 controls specialization of female gonads in mice. *Biol Reprod*. 査読あり 93(4), 2015, 90

T. Yasuoka, H. Hashimoto, K. Hamada, T. Fujioka, A. Nawa. Atypical carcinoid of the uterine cervix with aggressive clinical behavior: A case report. *Gynecol Oncol Case Rep*. 査読あり 7, 2013, 4-6

T. Fujioka, T. Yasuoka, M. Koizumi, H. Tanaka, H. Hashimoto, M. Nabeta, K. Koizumi, Y. Matsubara, K. Hamada, K. Matsubara, T. Katayama, A. Nawa. Concurrent chemoradiotherapy with nedaplatin in patients with stage IIA to IVA cervical carcinoma. *Mol Clin Oncol*. 査読あり 1(1), 2013, 165-170

[学会発表] (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

那波 明宏 (NAWA, Akihiro)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任教授
研究者番号 : 90242859

(2) 研究分担者

安川 正貴 (YASUKAWA, Masaki)
愛媛大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号 : 60127917

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

武藤 義文 (MUTO, Yoshifumi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・客員研究員
小屋 美博 (KOYA, Yoshihiro)
名古屋大学・大学院医学系研究科・客員研究員