

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

肉腫および悪性中皮腫を標的破壊する腫瘍溶解性ウイルス
ベクターのシードストックおよび臨床ロットの製造と
その安全性・有効性評価に関する研究

(課題番号 H-18-遺伝子一般-003)

平成20年度 総括研究報告書
平成18年度～20年度 総合研究報告書

主任研究者 高橋 克仁

平成21(2009)年 4月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

肉腫および悪性中皮腫を標的破壊する腫瘍溶解性ウイルスベクターの
シードストックおよび臨床ロットの製造とその安全性・有効性評価
に関する研究

平成20年度 総括研究報告書
平成18年度～20年度 総合研究報告書

主任研究者 高橋 克仁

平成21（2009）年 4月

目 次

I. 平成20年度 総括研究報告 肉腫および悪性中皮腫を標的破壊する腫瘍溶解性ウイルスベクターのシードストック および臨床ロットの製造とその安全性・有効性評価に関する研究-----	1
主任研究者 高橋 克仁	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	3
III. 平成18年～20年度総合研究報告 肉腫および悪性中皮腫を標的破壊する腫瘍溶解性ウイルスベクターのシードストック および臨床ロットの製造とその安全性・有効性評価に関する研究-----	4
主任研究者 高橋 克仁	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	8
V. 研究成果の刊行物・別刷 ----- (平成20年度 総括研究報告分を含む)	10

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
 (総括・分担) 研究報告書

肉腫および悪性中皮腫を標的破壊する腫瘍溶解性ウイルスベクターの
 シードストックおよび臨床ロットの製造とその安全性・有効性評価に関する研究

主任研究者 高橋 克仁 大阪府立成人病センター部長

研究要旨 難治性肉腫と悪性中皮腫の治療法開発への国民の要請は極めて強い。申請者らは、遺伝子組換え技術を用いて肉腫と悪性中皮腫を標的破壊する腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルスベクターを開発した。本研究では、国内ワクチンメーカーの技術協力の下、わが国初の無菌環境下閉鎖系セル・ベクタープロセッシングシステムを用いて、上記ウイルスのGMP基準に準拠した製造・生物学的評価試験・効力試験を実施し、臨床試験に使用可能なウイルスシードストックを製造する。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

山村倫子・大阪府立成人病センター
 主任研究員

城野洋一郎・化学及び血清療法研究所
 次長

(倫理面への配慮)

検体の採取にあたっては本研究目的で新たに書面による同意が得られた試料のみを使用する。患者検体の解析にあたっては、個人情報保護に細心の注意を払い、試料、検体、標本は、施設可能な冷凍庫、キャビネットに保管する。匿名化システムを用いて連結可能匿名化する。検査や解析のため外部機関に提供する場合は暗号化する。試験期間終了後の保管・管理について被験者の同意が得られた検体は主任研究者の所属部門で保管管理する。将来本研究以外の目的に使用する場合は、改めて被験者から使用について同意を得るものとする。

A. 研究目的

平滑筋肉腫など難治性肉腫と悪性中皮腫に対する腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルスを用いた標的遺伝子療法の速やかかつ適切な実用化・臨床応用を目指し、1) 遺伝子治療剤 $\Delta 12$. CALP Δ RR と $\Delta 12$. ODD Δ RR のウイルスシードストックをGMP基準に準拠した施設で製造するための方法の確立、2) 生物学的評価試験、安性試験、効力試験を経て臨床試験に使用可能なバルク標品を製造するための基盤を確立すること、にある。

B. 研究方法

- 1) 単純ヘルペスウイルスの α 遺伝子群に属する転写因子であるICP4を恒常的に発現するVero細胞のデザイナーセルを用いて、 $\Delta 12$. CALP Δ RR と $\Delta 12$. ODD Δ RR を無血清培地で増殖させ、精製法を確立する(平成18年度)。
- 2) 悪性中皮腫に対するin vivoでの抗腫瘍効果のさらなる検討を行うため、効力試験の評価実験系を確立する(平成18年度)。
- 3) マスター、ワーキングウイルスシードストックをGMP基準に準拠した施設、設備のもとで構築するための方法を確立する(平成19年度)。
- 4) ウイルスシードストックの塩基配列決定、生物学的評価試験を行うための基礎データを得て、臨床試験に使用可能なバルク標品を製造するための基盤を確立する(平成20年度)。

C. 結果

生物学的評価試験に必要な抗HSV-1ウイルス抗体を作成した。さらに、BACmidクローニングベクターとウイルスゲノム全長DNAを精製した。 $\Delta 12$. CALP Δ RR と $\Delta 12$. ODD Δ RR のゲノム全長DNAをBACmidベクターと混合し、Veroデザイナーセルに感染させた。ウイルスブランクを10%FBS/DMEM存在下で標識遺伝子の蛍光を指標にして、単一ブランクにまで精製した。安定して蛍光を発するクローンを無血清培地VP-SFMで増殖させ、BACmidにクローニングした含むウイルスDNAを精製した。ウイルスDNAをエレクトロポレーション法で大腸菌にトランスフォームしBACmidにクローニングした均一なウイルスDNAを大量に精製した。塩基配列をショットガン法とダイレクトPCR法を用いて決定した。

D. 考察

平成20年度の研究により、BACmidベクターへのクローニングに成功したことから、均一なウイルスゲノムDNAを大量に精製することが可能になった。また、この精製DNAを用いて国内ではじめて均一なゲノムDNAから全塩基配列を決定することが可能になった。これは今後の腫瘍溶解性ウイルスを用いた臨床研究において、ウイルス試験薬の規格を統一する方法を提

供するものであり、試験薬の安全性の向上に寄与するものと思われる。

今後、Flp-FRTシステムを用いて *d12. CALP ΔRR* と *d12. ODD ΔRR* のウイルスゲノムからBACmid配列を除去し、Veroデザイナーセルバンクに遺伝子導入する。ゲノムの配列既知のウイルスからウイルス粒子を回収し、それを用いて英国で *d12. CALP ΔRR* と *d12. ODD ΔRR* のウイルス臨床ロットの大容量精製を開始するための準備が整った。

E. 結論

平成20年度は生物学的評価試験の一環として、*d12. CALP ΔRR* と *d12. ODD ΔRR* のゲノム全長DNAのBACmidベクターへのクローニングを完了し、均一なウイルスゲノムDNAを精製した。続いて、ショットガン法を用いて *d12. CALP ΔRR* と *d12. ODD ΔRR* のウイルスゲノムDNAの一次構造（塩基配列）を均一なウイルスゲノムDNAとしては国内ではじめて決定した。

F. 健康危険情報 (該当しない)

G. 研究発表

1. 論文発表

K. Makizumi, K. Kimachi, K. Fukada
T. Nishimura, Y. Kudoa, S. Gotoa,
T. Odagiri, M. Tashiro, Y. Kino
Timely production of A/Fujian-like
influenza vaccine matching the 2003-
2004 epidemic strain may have been
possible using Madin-Darby canine
kidney cells. Vaccine 26, 6852-6858,
2008.

2. 学会発表

山村倫子、高橋克仁

GIST stem cells

第66回日本癌学会学術総会（於横浜）

10月29日、2008年

山村倫子、玉越智樹、村井 淳、高橋克仁、

カルボニン標的化腫瘍溶解性

単純ヘルペスウイルスによる悪性上皮腫に対する

新治療法の開発 第129回日本薬学会総会

（於京都）3月27日、2009年

K. Takahashi, H. Yamamura

Insights into physiological role of calponin
in smooth muscle regulation: A lesson from
gene knockout.

Experimental Biology 2008, April 9, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

「BACmidへのウイルスゲノム挿入法」

高橋克仁、山村倫子（出願予定）

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
K. Makizumi K. Kimachi K. Fukada T. Nishimura Y. Kudoa S. Gotoa T. Odagiri M. Tashiro Y. Kino	Timely production of A/Fujian-like influenza vaccine matching the 2003- 2004 epidemic strain may have been possible using MadinDarby canine kidney cells	Vaccine	26	6852-6858	2008