

201109005A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

癌に対する新たなコンドロイチン硫酸ポリマー修飾腫瘍溶解性麻疹ウイルス

療法開発のための前臨床研究に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 九州大学・生体防御医学研究所
ゲノム病態学分野
教授 谷 憲三朗

平成 24 (2012) 年 5 月

目次

I. 総括研究報告

癌に対する新たなコンドロイチン硫酸ポリマー修飾腫瘍溶解性麻疹ウイルス療法開発のための前臨床研究に関する研究

谷 憲三郎 1

II. 分担研究報告

1. コンドロイチン硫酸ポリマー修飾腫瘍溶解性麻疹ウイルス療法開発のための前臨床研究

谷 憲三郎 9

2. コンドロイチン硫酸ポリマー修飾腫瘍溶解性ウイルス療法開発研究

濱田 雄行 16

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 19

IV. 研究成果の刊行物・別刷 21

癌に対する新たなコンドロイチン硫酸ポリマー修飾腫瘍溶解性麻疹ウイルス療法開発
のための前臨床研究に関する研究

研究代表者 谷 憲三朗 九州大学ゲノム病態学分野 教授

研究要旨

遺伝子改変腫瘍溶解性麻疹ウイルス (MV-NPL) が様々な固形癌細胞株に低いウイルス感染力価で優れた殺細胞効果を有することを明らかにし、当面の治療対象癌を頭頸部癌に決定した。また、MV-NPL ウイルス株の TFF 限外濾過法による濃縮、及び PEI 及び CS の順次付加による電荷変移の安定した CSP-MV の作製に成功している。今後本製剤の in vivo での安全性および有効性を検討するために、抗麻疹ウイルス中和抗体を産生可能な野生型マウスを用いた担癌マウスモデル感染実験に必要となるヒト CD46 発現マウス肺癌細胞株を作製した。また、野生型マウスを用いた MV-NPL 投与実験において、抗麻疹中和抗体産生を確認したことで、今後の抗麻疹免疫応答回避のための in vivo 担癌マウスモデル実験が可能となった。一方、本研究を促進する為の基礎研究として腫瘍溶解性アデノウイルスの PEI、CS の 13 元加工を行い、抗体による感染抑制を解除することが可能となり、十分な抗腫瘍効果が得られた。本技術は MV-NPL にも応用可能であり、腫瘍溶解性麻疹ウイルスのポリマー加工によりさらに抗腫瘍効果が高まることが推察された。

分担研究者

谷憲三朗 九州大学生体防御医学研究所・教授
濱田雄行 愛媛大学医学部附属病院産婦人科・講師

A. 研究目的

悪性腫瘍は日本国民の死因の第一位であり、特に再発・進行がん患者に対する新たな治療法の開発は急務である。近年ウイルス自身が有する腫瘍溶解性を利用した療法が世界的に注目されてきており、日本においても単純ヘルペスウイルスを用いた臨床研究が脳腫瘍や乳癌を対象に実施・報告されている (Open Virol J 4:103-108, 2010)。しかし他癌種に対しても新規腫瘍溶解ウイルス療法の開発が望まれ、また現行のウイルス療法では接種後に抗体産生等によるウイルス排除免疫が誘導され、長期的な抗腫瘍効果は期待しにくく、全身投与も困難である。この点に関しては、解決策の開発が急務である。我々はこれまでに麻疹ウイルスを用いた研究を進めてきた。現在 Edmonston 株 (MV-Edm) については米国で臨床試験が実施されている。しかし MV-Edm はインターフェロン α によりその増殖が抑えられ、in vivo での抗腫瘍効果は得にくい。一方、我々が開発した MV-NPL 株は、その点を克服しており担癌免疫不全マウスに対する著明な抗腫瘍効果を認め (Mol Ther 18:544-551, 2010)、新たな腫瘍溶解ウイルス療法剤としての可能性が期待できる。一方、コンドロイチン硫酸ポリマー法は研究分担者の濱田らが開発した、アデノウイルスに対する中和抗体による感染抑制を解除する新規人工エンベロープ加工技術であり、抗アデノウイルス CTL 誘導により担卵巣癌マウスにおいて顕著な抗腫瘍効果を示した ((特許等) 特願 2009-315041、2009 年 1 月 30 日出願、Biomaterials 31: 2912-2918, 2010)。本研究ではこれら 2 新規技術を組み合わせ、長期的抗腫瘍効果がさらに期待でき、全身投与も可能なコンドロイチン硫酸ポリマー

修飾腫瘍溶解性麻疹ウイルス (CSP-MV) 療法を開発し、その第 I 相臨床研究実施を目指す。

B. 研究方法

(1) 各種癌および正常細胞株における CD46 発現の検討:

培養細胞: A549 (肺癌)、H460 (肺癌)、H1299 (肺癌)、HCC827 (肺癌)、N417 (小細胞肺癌)、SBC-3 (小細胞肺癌)、SBC-5 (小細胞肺癌)、H28 (悪性胸膜中皮腫)、H2452 (悪性胸膜中皮腫)、MSTO-211H (悪性胸膜中皮腫)、HT29 (大腸癌)、CaCO2 (大腸癌)、DLD-1 (大腸癌)、T.Tn (頭頸部癌)、TE6 (食道癌)、TE8 (食道癌) は RPMI/10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) で、MiaPaCa (膵癌)、Panc-1 (膵癌)、AsPC-1 (膵癌)、BxPC3 (膵癌)、SW620 (大腸癌)、FaDu (頭頸部癌)、HSC3 (頭頸部癌)、HSC4 (頭頸部癌)、LN444 (グリオーマ)、LN308 (グリオーマ)、BEAS-2B (正常気管上皮) は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) /10%FBS で、HeP2 (頭頸部癌)、MRC5 (正常肺線維芽細胞) は Minimum Essential Medium (MEM) /10%FBS にて培養を行った。培養後の各細胞を PE 標識抗ヒト CD46 モノクローナル抗体染色、FACS buffer 洗浄後、Flow Cytometry 法にて CD46 発現を比較定量した。

(2) In vitro 殺腫瘍細胞効果の比較検討:

癌細胞株に対するウイルスの殺細胞効果を、クリスタルバイオレット法にて判定した。各培養細胞株を、予め 5×10^4 cells/well ずつ 24 穴プレートに播種し、MOI=0.01、0.1 もしくは 1 でウイルス (MV-NPL) 感染を行い、3 日後にクリスタルバイオレット液にて染色した。

(3) ウイルスの増殖と精製:

MV-NPL は Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎臓上皮細胞)

胞)にて増殖させた。ウイルスを回収する時期を決定するため、6cmディッシュにVero細胞を播種し、MOI=0.01でウイルスを感染し、予め定めた時間(感染16, 24, 32, 40, 48, 56, 64時間)でウイルスを回収し、力価の確認を行った。力価の確認方法は、Vero細胞を用いた段階希釈法にて判定した。回収したウイルス液は4℃にて保存し、限外濾過法にて濃縮した。

(4) コンドロイチン硫酸ポリマー修飾腫瘍溶解性麻疹ウイルス(CSP-MV)の作製:

PEI及びCSの順次付加による電荷変移を、順次ゼータサイザー(Zetasizer)により確認した。

(5) In vitro 中和抗体存在下のウイルス活性確認モデルの確立:

抗麻疹ウイルス中和抗体として、化血研より譲渡された献血ベニコロン[®]を使用した。献血ベニコロン[®]液を段階希釈し、同量の標準液(麻疹ウイルスEdmonston株100 TCID₅₀)と混合し、Vero細胞に感染させることにより中和抗体価を判定した。抗麻疹中和抗体存在下では、麻疹ウイルスの殺細胞効果が抑制されることを確認するため、ウイルス液と同量の献血ベニコロン[®]10倍希釈液を混合し、1x10⁴ cells/well ずつ24穴プレートに予め播種したヒト肺癌細胞株A549に添加し、4日後にクリスタルバイオレット液にて染色した。

(6) 野生型マウスにおけるMV-NPL投与後の同ウイルス中和抗体産生確認実験:

野生型マウスC57BL/6Nに各量(10³ TCID₅₀、10⁴ TCID₅₀、10⁵ TCID₅₀、10⁶ TCID₅₀(うち2匹はアジュバントを追加))のMV-NPLをそれぞれ腹腔内投与した。1週間毎に血液を採取し、熱処理した血清を用いて、中和抗体価を測定した。中和抗体価の測定には、標準液(麻疹ウイルスEdmonston株(100 TCID₅₀))と血清の段階希釈液を混合させ、Vero細胞に感染させることを行った。

(7) ヒトCD46発現マウス肺癌細胞株の作製:

本製剤のin vivoでの安全性および有効性を検討するために、抗麻疹ウイルス中和抗体産生可能な野生型マウスを用いた担癌マウスモデル感染実験に必要な、ヒトCD46発現マウス肺癌細胞株を以下の方法で樹立した。まずヒトCD46 DNAをGatewayシステムのLR反応によりCSII-EF-RfAベクターに導入後、293T細胞へLipofectamine2000を用いて遺伝子導入しCD46遺伝子導入レンチウイルスを作製した。作製したレンチウイルスをマウス肺癌細胞株LL/2にMOI=約10にて感染後1ヶ月間、培養・継代を繰り返したCD46遺伝子導入LL/2細胞を用いて、ヒトCD46発現の確認ならびにMV-NPLによる殺細胞効果の獲得を確認した。ヒトCD46発現は、PE標識ヒトCD46モノクローナル抗体を用いて染色し、FACS Caliburにて解析した。MV-NPLによる殺細胞効果の確認は、クリスタルバイオレット法により判定した。ゼラチンコート48穴プレートに1x10⁴ cells/wellのLL/2細胞ならびにCD46導入LL/2細胞を播種し、MOI=0.01, 0.1もしくは1でMV-NPL感染を行い、3日

後にクリスタルバイオレット液にて染色し観察した。

(8) CSとヒアルロン酸(hyaluronic acid, HA)の腫瘍特異性の比較検討:

陰性荷電の腫瘍特異性ポリマーとしては、CS以外にHAがよく知られており、これら両者の腫瘍特異性を検討するために、卵巣癌細胞株に対するplasmid-GFP-PEI-CSおよびplasmid-GFP-HAのin vitro感染効率、さらにplasmid-mGM-CSF-PEI-CSおよびplasmid-mGM-CSF-PEI-HAのマウス卵巣癌細胞株OVHM皮下腫瘍および腹腔内播種性モデルにおける抗腫瘍効果をKaplan-Meier法における生存曲線において検討した。また、原材料として鶏冠由来HA(分子量73万)、サメ軟骨由来CS(分子量1.4万)、牛軟骨由来CS(分子量4万、1.5万、1.4万、1万)のものを使用して、原材料、分子量による腫瘍特異性について検討した。卵巣癌細胞株としてはOVHM以外には、人卵巣癌細胞株(PA-1、RMG-1、OVCAR3、OCC1、HEY)を用い、正常細胞としては人由来のF線維芽細胞株F27、羊膜細胞株ASPを用い、マウス由来の線維芽細胞株Lc1-1Dを用いた。

(9) In vitroにおけるポリマー加工アデノウイルスの抗腫瘍効果の検討:

腫瘍溶解性アデノウイルスは、野生型アデノウイルスのE1Aプロモーターを腫瘍特異性の高いmidkineプロモーターに置換したAdE3-midkineを用いた。抗アデノウイルス抗体としては6000倍の抗アデノウイルス抗体価を有するグロベニン-I(武田薬品)を用いた。in vitroの実験では、非小細胞性肺癌細胞株A549を用いた。腫瘍溶解性アデノウイルス単独(1元)からPEI(2元)さらにCS(3元)、以後順次EPI、CSの順に15元まで加工し、in vitroにおける抗腫瘍効果をcrystal violet法により検討した。同時に、ポリマー加工における腫瘍溶解性アデノウイルスの加工程度を検討するため、電子顕微鏡を用いて被覆加工の程度を比較した。PEIとしてはPEI MAX(分子量4万、Polyscience)を用いた。

(10) マウスin vivoにおけるポリマー加工アデノウイルスの抗腫瘍効果の検討:

in vivo実験には、マウス卵巣癌細胞株OVHMと同系のメス4週齢B6C3F1マウスを用い、1x10⁶個を皮下あるいは腹腔内に投与し皮下腫瘍モデルおよび腹腔内播種性モデルを作製した。治療開始3週間前にadenovirus-βgalを1x10¹⁰pfu皮下投与し事前免疫を行った。腹腔内播種性モデルは、卵巣癌のみならず膀胱癌、胃癌、大腸癌等の消化器癌においても同様な治療モデルとして用いることができ、静脈投与に次ぐ有力な治療ルートといえ、容易に腹腔内播種を来しやすい卵巣癌モデルとしては治療効果判定として腫瘍内投与を行う皮下腫瘍に比べ重点を置いて比較検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験、遺伝子組み換え実験は各関係指針ならびに法令に従って倫理的に実施した。

C. 研究結果

(1) 各種癌および正常細胞株における CD46 発現の検討：

ヒト頭頸部癌細胞をはじめ (図 1 上)、ほぼすべてのヒト癌細胞株において、ヒト CD46 の高発現が確認された (図 1 中)。特に頭頸部及び大腸癌細胞株において、ヒト CD46 の強い発現を認めた (図 1 下)。

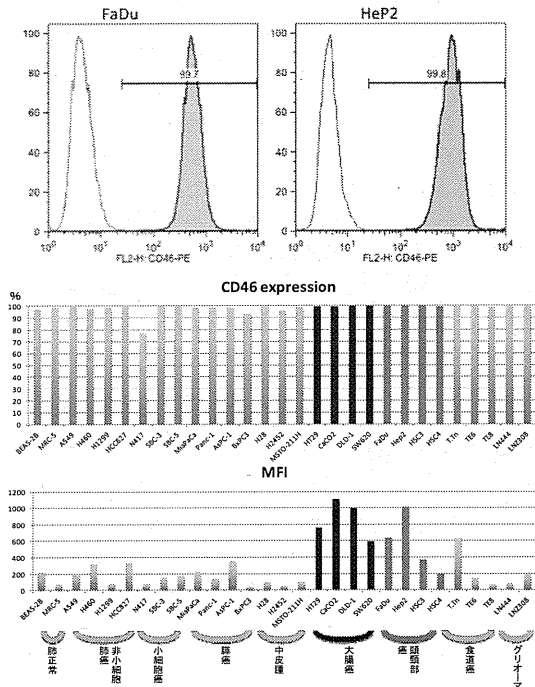


図 1 (上) 頭頸部癌細胞株 (Fadu, Hep2) の CD46 発現の評価 (ヒストグラム：フローサイトメトリー法)
(中) 各種細胞株の CD46 発現頻度 (%),
(下) 各種細胞株の CD46 発現強度 (MFI),

(2) In vitro 殺腫瘍細胞効果の比較検討：

クリスタルバイオレット法の結果、ほぼすべての癌細胞株において、低いウイルス感染力価で優れた殺細胞効果を有することを明らかにした。(1)の結果と併せ腫瘍内投与が容易である頭頸部癌を当面の治療対象癌として決定した (図 2)。

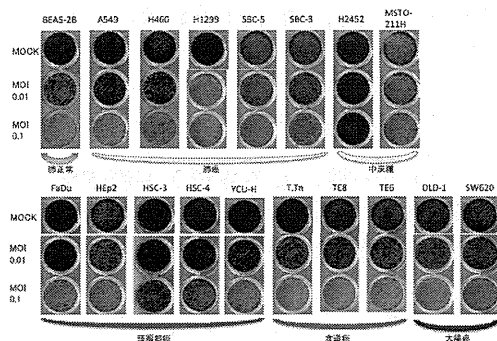


図 2 Crystal Violet 法による殺細胞効果の確認

(3) ウイルスの増殖と精製：

MV-NPL は Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎臓上皮細胞) にて増殖させた。ウイルスを回収する時期を決定するため、6cm ディッシュに Vero 細胞を播種し、MOI=0.01 でウイルスを感染し、あらかじめ定めた時間 (感染 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64 時間) でウイルスを回収し、力価測定を行った。力価測定は、Vero 細胞を用いた段階希釈法にて判定した。感染 24 時間後において、鏡検上、80%程度のシンシチアが観察され、32 時間後では、多くの Vero 細胞は死滅し上清中に浮遊していた。培養上清中に存在するウイルスの力価は感染 24 時間以降、ほぼ一定であった。ウイルスの精製に際しては、Progenitor 細胞の混入をなるべく避ける必要があるため、以後は 90%程度のシンシチアが確認された時点で回収することとした。

Vero 細胞を 15cm ディッシュに播種し、70-80%コンフルエントまで培養した後、培養上清を除去し、ウイルス液を添加した。1 時間の感染の後、ウイルス液を除去し、新鮮培養液で置換、翌日 90%シンシチアの形成が見られた時点で、培養上清を回収した。回収したウイルス液は 4℃にて保存し、限外濾過法にて濃縮した。容量計算で 17 倍濃縮したウイルス液は、力価計算でも 17 倍の濃縮が確認された。

(4) コンドロイチン硫酸ポリマー修飾腫瘍溶解性麻疹ウイルス (CSP-MV) の作製：

PEI 及び CS の順次付加による電荷変移を確認し、PEI もしくは CS の順次多元付加によりウイルス (MV-NPL) のポリマー修飾がなされたことを確認した (1 元から 15 元) (図 3)。

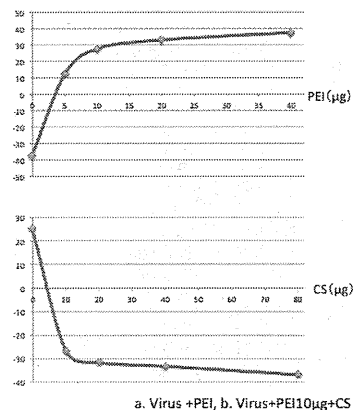


図 3. PEI、CS 添加によるウイルス表面電荷の推移 (上) .PEI 添加、(下) .CS 添加

(5) In vitro 中和抗体存在下のウイルス活性確認モデルの確立：

ウイルスの感染力を完全に抑制する最大希釈倍率の逆数を中和抗体価とすると 128 倍であった。献血ベニロン®液を PBS により 10 倍希釈した溶液の中和抗体価は、一般的な健康人がもつ中和抗体価と同程度である 16-32 倍であった。さらに抗麻疹ウイルス中和抗体存在下では、A549 細胞に対する MV-NPL の殺細胞効果が著明に抑制されることが確認できた。

(6)野生型マウスにおける MV-NPL 感染後の同ウイルス中和抗体産生確認実験：

MV-NPL を投与したマウスには体重減少等の副作用を認めず、MV-NPL 投与量依存性に同マウス由来血清に高い中和抗体価が誘導される (10^3 TCID₅₀ ; 4 倍未満、 10^6 TCID₅₀ ; 32 倍以上) ことが確認された。

(7)ヒト CD46 発現マウス肺癌細胞株の作製：

LL/2 細胞は、ヒト CD46 を全く発現しないのに対し、ヒト CD46 導入 LL/2 (CD46+LL/2) では、極めて高いヒト CD46 の発現が認められた (92.8 %) (図 4 上)。LL/2 細胞では MOI=1 にても殺細胞効果が見られないのに対し、ヒト CD46 導入 LL/2 (CD46+LL/2) では低力価の MV-NPL 感染により容量依存的殺細胞効果が確認された。尚、抗麻疹ウイルス存在下においては、ヒト CD46 導入 LL/2 (CD46+LL/2) に対する MV-NPL の殺細胞効果は相殺された (図 4 下)。

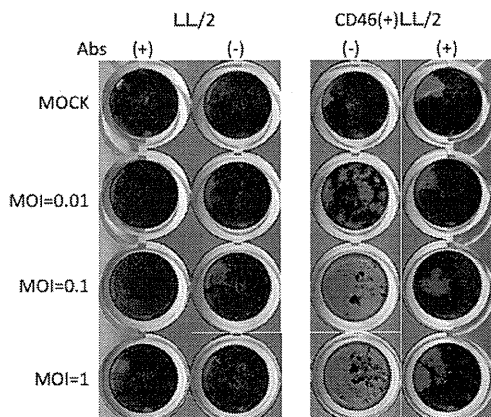
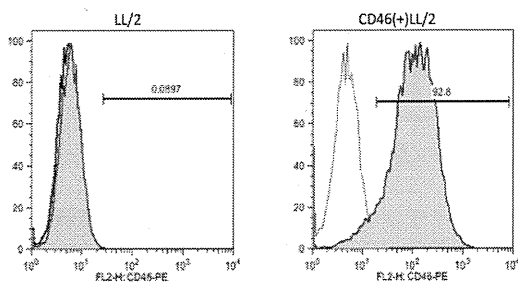


図 4 ヒト CD46 遺伝子導入マウス肺癌細胞の作製 CD46+LL/2 細胞のヒト CD46 発現確認 (上)、CD46+LL/2 細胞に対する MV-NPL の殺細胞効果の確認 (下)

(8) CS とヒアルロン酸 (hyaluronic acid、HA) の腫瘍特異性の比較検討：

plasmid GFP-PEI-CS、plasmid GFP-PEI-HA 3 元ポリマー加工で腫瘍細胞における遺伝子発現において原材料における差を OVHM で比較検討したところ、最も良好な遺伝子発現を示したのは、分子量 1 万のサメ軟骨由来の CS であった。このため、CS としては分子量 1 万のサメ軟骨由来のものを使用した。人卵巣癌細胞株においても plasmid GFP-PEI-CS は plasmid GFP-PEI-HA より良好な遺伝子発現を示し、正常細胞株に比べ約 10 倍の遺伝子発現を示した。OVHM 卵巣癌

皮下腫瘍モデルにおいて、3 回腫瘍内投与により plasmid-mGM-CSF-PEI-HA は 80%、plasmid -mGM-CSF-PEI-CS は 100% の生存率を示し、腹腔内播種性モデルでは、6 回腹腔内投与により plasmid-mGM-CSF-PEI-CS では完全治癒は認められないものの plasmid-mGM-CSF-PEI-HA に比べ有意な生存率の上昇を示した。このため、腫瘍特異的陰性荷電ポリマーとしては分子量 1 万のサメ軟骨由来のものが優れていることが示唆され、本系では腹腔内播種性モデルにおいては完全治癒が望め無いたことが明らかとなった。尚、腹腔内播種性モデルにおいて皮下腫瘍モデルにおいて使用する 100-500ul 容量投与では、腹腔内が巨大空間であるため抗腫瘍効果は認められず、5ml 以上の大容量においてのみ抗腫瘍効果が認められた。また、腹腔内播種性モデルにおいてほぼすべてのマウスで OVHM 細胞注射部位に再発が認められたため、腹腔内治療時に 2ml 程度注射部位に投与したところ、全マウスにおいて皮下腫瘍の再発が予防できた。

(9) in vitro におけるポリマー加工アデノウイルスの抗腫瘍効果の検討：

96 穴プレートを用いて抗体を 10 倍に薄めて 600 倍の力価の抗体存在下において抗腫瘍効果を検討した。1 元では全く効果は認められなかったが、9 元以降抗腫瘍効果が増加し、13 元以降において最大の抗腫瘍効果が得られたものの、それ以上の加工では有意な抗腫瘍効果の増大は認められなかった。電子顕微鏡的検討結果から、ポリマー多重加工により、PEI および CS により腫瘍溶解性アデノウイルスが重層され 13 元において完全に腫瘍溶解性アデノウイルスが被覆されていることが明らかとなった。

(10) in vivo におけるポリマー加工アデノウイルスの抗腫瘍効果の検討：

13 元ポリマー加工腫瘍溶解性アデノウイルスを用いて皮下腫瘍では 500ul、腹腔内腫瘍では 7ml の内 5ml を腹腔内投与、2ml を注射部位投与とした。皮下腫瘍では、1 回投与で 8 匹中 3 匹、2 回投与で 7 匹中 7 匹が完全治癒となり、腹腔内投与では 1 回投与で 11 匹中 5 匹、2 回投与で 11 匹中 5 匹、3 回投与で 8 匹中 6 匹が完全治癒となった。このため、皮下腫瘍では、2 回投与、腹腔内投与では 3 回以上の投与が必要と考えられた。

D. 考察

フローサイトメトリー法による各種ヒト癌細胞株のヒト CD46 発現の程度を確認したところ、ほぼすべての癌種において、麻疹ウイルス受容体ヒト CD46 の高発現が確認された。クリスタルバイオレット法による殺細胞効果の確認では遺伝子改変麻疹ウイルス (MV-NPL) がほぼすべての細胞株に対して優れた殺細胞効果を持つことが確認され、多くの癌種においても有望であることが示唆された。臨床試験での投与方法の簡易性及び安全性を考慮して、当面の投与方法は腫瘍内投与を選択し、対象癌種は頭頸部癌と

した。

MV-NPLの精製においては、先行する参考文献（米国における麻疹腫瘍溶解性ウイルスを用いた臨床試験）に準じて、上清中のウイルスを回収し、TFF限外濾過法等により約17倍の濃縮に成功したが、麻疹ウイルスのポリマー加工技術確立のためには、純度の高い麻疹ウイルスを得ることが重要でありこのため、早期に麻疹ウイルスの精製技術を確立する予定である。抗ウイルス免疫応答回避のためのウイルスの多重コーティング検討に関しては、PEI及びCSの順次付加により、付加量依存的なウイルス表面電荷の変化（推移）が確認され、ウイルス表面の修飾が得られていることが確認された。ガンマグロブリン製剤を用いたin vitroにおける抗麻疹ウイルス中和抗体による感染抑制の解除を確認する系を確立することに成功し、現在コンドロイチン硫酸ポリマーによる麻疹ウイルス修飾の最適化を検討中である。また、野生型マウス（正常免疫系）がMV-NPL投与により同ウイルスに対する中和抗体を産生することを証明し、同マウスを用いた担癌マウスモデル作成の際に必要なヒトCD46発現マウス肺癌細胞株の作製に成功した。これらの研究成果を基に、同担癌マウスモデルにおいて、抗麻疹ウイルス免疫応答回避確認を目的としたCSP-MVのマウスin vivo抗腫瘍効果の比較検討が可能となった。

一方、CD44を受容体とする腫瘍特異的陰性ポリマーとしては、従来よりHAとCSが報告され、その腫瘍特異性は同様とされていたが、今回の検討によりHAよりCSがすぐれ、特にサメ由来の分子量1万のCSが優れていることが明らかとなった。ポリマー多重加工は、8元以上特に13元において安定的な抗腫瘍効果が得られ、腫瘍内投与、そして腹腔内投与において完全腫瘍退縮が得られることが明らかとなった。また、今回腫瘍溶解性アデノウイルスにおいて行ったPEI、CSによる多重加工技術を腫瘍溶解性麻疹ウイルスに用いることにより同様な抗体による感染抑制を解除することが可能となり、十分な抗腫瘍効果が得られることが推察された。

E. 結論

遺伝子改変腫瘍溶解性麻疹ウイルス（MV-NPL）を用いた治療は頭頸部癌のみならず、他の多くの癌細胞株に対し強力な殺細胞効果を呈した。PEI及びCSの順次付加によるMV-NPLのポリマー加工（CSP-MV）に成功した。本年度以降、CSP-MVのin vitroにおける最適化条件決定後に検証が必要となるCSP-MVを用いたin vivo免疫回避マウスモデルの確立及びヒトCD46発現マウス癌細胞の作製に成功した。

分担研究者（濱田ら）の研究結果から、腫瘍溶解性アデノウイルスのPEI、CSによる13元加工により、抗体による感染抑制を解除できることが示されており、MV-NPLにおいても応用可能なこの技術を用いて、ウイルスのポリマー加工により抗腫瘍効果が高まることが期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

- 1 Inoue T, Sugiyama D, Kurita R, Oikawa T, Kulkeaw K, Kawano H, Miura Y, Okada M, Suehiro Y, Takahashi A, Marumoto T, Inoue H, Komatsu N, Tani K, APOA-1 is a novel marker of erythroid cell maturation from hematopoietic stem cells in mice and humans. *Stem Cell Rev* 7(1):43-52, 2011
- 2 Zhang T., Hamada K., Hyodo M., Itoh H., Tani, K., Goda H., Nakashiro K., Hamakawa, H., Gene therapy for oral squamous cell carcinoma with IAI.3B promoter-driven oncolytic adenovirus-infected carrier cells. *Oncol Rep* 25:795-802, 2011
- 3 Tian Y, Kobayashi S, Ohno N, Isobe M, Tsuda M, Zaike Y, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimaru K. Leukemic T cells are specifically enriched in a unique CD3(dim) CD7(low) subpopulation of CD4(+) T cells in acute-type adult T-cell leukemia. *Cancer Sci.* 102: 569-577, 2011
- 4 Inoue T., Kulkeaw, K., Okayama, S., Tani, K., Sugiyama, D. Variation in mesodermal and hematopoietic potential of adult skin-derived induced pluripotent stem cell lines in mice. *Stem Cell Rev* 7:958-968, 2011
- 5 Maeda, T., Kurita, R., Yokoo, T., Tani, K., Makino, N. Telomerase inhibition promotes an initial step of cell differentiation of primate embryonic stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 407:491-494, 2011
- 6 Takahashi, A., Tokita, H, Takahashi, K., Takeoka, T., Murayama, K., Tomotsune, D., Ohira, M., Iwamatsu, A., Ohara, K., Yazaki, K., Koda, T., Nakagawara, A., Tani, K. A novel potent tumour promoter aberrantly overexpressed in most human cancers. *Sci Rep* 1:15, 2011
- 7 Dong, Y., Kobayashi, S., Tian, Y., Ozawa, M., Hiramoto, T., Izawa, K., Bai, Y., Soda, Y., Sasaki, E., Itoh, T., Maru, Y., Oyaizu, N., Tojo, A., Kai, C., Tani, K., Leukemogenic fusion gene (p190 BCR-ABL) transduction into hematopoietic stem/progenitor cells in the common marmoset. *Open J Blood Dis.* 2012 (in press)
- 8 Somada, S., Muta, H., Nakamura, K., Sun, X., Honda, K., Ihara, E., Akiho, H., Takayanagi, R., Yoshikai, Y., Podack, E.R., Tani, K. CD30 Ligand/CD30 Interaction is involved in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2012 (in press)
- 9 Hamada, K., Yoshihara, C., Ito, T., Tani, K., Tagawa, M., Sakuragawa, N., Ito, H., Koyama, Y. Antitumor effect of chondroitin sulfate-coated ternary granulocyte macrophage colony-stimulating factor plasmid complex for ovarian cancer. *J Gene Med.* 14:5120-127, 2012.
- 10 Miyamoto, S., Inoue, H., Nakamura, T., Yamada, M., Sakamoto, C., Urata, Y., Okazaki, T., Marumoto, T., Takahashi, A., Takayama, K., Nakanishi, Y., Shimizu, H., Tani, K. Cocksackievirus B3 Is an oncolytic virus with immunostimulatory

properties that is active against lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2609-21, 2012

- 11 Mizuochi, C., Hirio, Y., Blasch, K., Kikushige, Y., Tani, K., Akashi, K., Tavian, M., Sugiyama, D. Intra-aortic clusters undergo endothelial to hematopoietic phenotypic changes in early embryogenesis. *PLoS ONE* 2012 (in press)
- 12 Saito, A., Morishita, N., Mitsuoka, C., Kitajima, S., Hamada, K., Lee, K.M., Kawabata, M., Fujisawa, M. and Shirakawa, T. Intravenous injection of irradiated tumor cell vaccine carrying oncolytic adenovirus suppressed the growth of multiple lung tumors in a mouse squamous cell carcinoma model. *Journal of Gene Medicine* 13:353-361. 2011
- 13 Zhang, T., Hamada, K., Hyodo, M., Itoh, H., Tani, K., Goda, H., Nakashiro, K. and Hamakawa, H. Gene therapy for oral squamous cell carcinoma with IAI.3B promoter-driven oncolytic adenovirus infected carrier cells. *Oncology Reports* 25:795-802. 2011
- 14 Yoshihara, C., Hamada, K., Kuroda, M. and Koyama, Y. Oncolytic plasmid: A novel strategy for tumor immuno-gene therapy. *Oncology Letters* 3:387-390. 2012
- 15 Yoshihara, C., Hamada, K., Kuroda, M. and Koyama, Y. Oncolytic plasmid: A novel strategy for tumor immuno-gene therapy. *Oncology Letters* 3:387-390. 2012
- 16 Hamada, K., Yoshihara, C., Ito, T., Tani, K., Tagawa, M., Sakuragawa, N., Itoh, H. and Koyama, Y. Antitumor effect of chondroitin sulfate-coated ternary GM-CSF plasmid complex for ovarian cancer. *Journal of Gene Medicine*, 14: 120-127. 2012

2. 学会発表

1. Saori Yamaguchi, Tomotoshi Marumoto, Takenobu Nii, Hirotaka Kawano, Jiyuan Liao, Yoko Nagai, Michiyo Okada, Atsushi Takahashi, Hiroyuki Inoue, Erika Sasaki, Shinji Okano, Yoshie Miura, Kenzaburo Tani. Oncogenic risk of induced pluripotent stem cells established from somatic cells with chromosome instability. American Society of Gene and Cell Therapy, 14th Annual Meeting, Seattle, 2011
2. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Yoshihiro Tanaka, Yosuke Yokota, Chika Sakamoto, Shohei Miyamoto, Tomoko Inoue, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. Comparative microarray analysis implicates the pivotal participation of Type I Interferon related signaling pathway in antitumor effect provoked by in vivo GM-CSF gene transduced lung cancer cells. American Society of Gene and Cell Therapy, 14th Annual Meeting, Seattle, 2011
3. Chika Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Yusuke Murakami, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Ayumi Watanabe, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. GM-CSF gene-transduced murine cancer stem cells eliminate tumorigenicity in vivo. American Society of Gene and Cell Therapy, 14th Annual Meeting, Seattle, 2011
4. Hirotaka Kawano, Tomotoshi Marumoto, Michiyo Okada, Tomoko Inoue, Takenobu Nii, Jiyuan Liao, Saori Yamaguchi, Yoko Nagai, Hiroyuki Inoue, Atsushi Takahashi, Erika Sasaki, Yoshie Miura, Kenzaburo Tani. LYL1, a Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, Promotes Hematopoietic Differentiation of Common Marmoset Embryonic Stem Cells. American Society of Gene and Cell Therapy, 14th Annual Meeting, Seattle, 2011
5. Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Toshihiko Okazaki, Tomotoshi Marumoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu, Kenzaburo Tani. Large-Scale Screening Identifies Coxsackievirus B3 (CVB3) as a Promising Oncolytic Virotherapy Agent against Non-Small Cell Lung Cancer. European Society for Gene and Cell Therapy, Brighton, 2011
6. Yosuke Yokota, Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Takehiko Yokomizo, Kenzaburo Tani. Absence of LTB4/BLT1 axis promotes generation of long-lasting antitumor memory responses induced by administration of GM-CSF gene-transduced tumor cells, in a CD4+ T cell-dependent manner. 53th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Diego, 2011
7. Jiyuan Liao, Tomotoshi Marumoto, Shinji Okano, Saori Yamaguchi, Takenobu Nii, Hirotaka Kawano, Yoko Nagai, Chika Sakamoto, Michiyo Okada, Yoshie Miura, Hiroyuki Inoue, Masato Tanaka, Kaori Nagatoshi, Kohichi Kawahara, Akira Suzuki, Kenzaburo Tani. Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells. 53th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Diego, 2011
8. Takenobu Nii, Tomotoshi Marumoto, Hirotaka Kawano, Saori Yamaguchi, Yoko Nagai, Yoshie Miura, Jiyuan Liao, Michiyo Okada, Kenzaburo Tani. Efficient Differentiation of Common Marmoset Embryonic Stem Cells Into Hemangioblast-Like Cells by the Inhibition of PI3K-AKT Pathway. 53th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Diego, 2011
9. Mutsunori Iga-Murahashi, Ysuki Hijikata, Yoko Suhiro, Hiroyuki Inoue, Yoshihiro Tanaka, Shinya Shimoda, Tomotoshi Marumoto, Toshihiko Okazaki, Atsushi Takahashi, Kenzaburo Tani. New strategy of antitumor immunotherapy targeting both tumor antigen and immune tolerance (Phase I Clinical trial). 第9回日本臨床腫瘍学会学術集会, 横浜, 2011
10. Mutsunori Murahashi, Yasuki Hijikata, Junji Kishimoto, Masakazu Hirakawa, Shinji Okano, Yoshihiro Tanaka, Yoko Suehiro, Masaharu

- Nakayama, Hiroyuki Inoue, Tomotoshi Marumoto, Atsushi Takahashi, Toshihiko Okazaki, Yoichi Nakanishi, Koji Yoshida, Takuya Tsunoda, Yusuke Nakamura, Kenzaburo Tani. Phase I clinical trial of chemotherapy-combined cancer vaccine targeting both tumor antigen and immune tolerance against advanced solid tumors. American Society of Clinical Oncology. 2012
11. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Yoshihiro Tanaka, Yosuke Yokota, Chika Sakamoto, Shohei Miyamoto, Tomoko Inoue, Kenzaburo Tani. Comparable transcriptional profile of murine mature dendritic cells in draining lymph node during tumor rejection by non-transmissible Sendai virus encoding GM-CSF infection 第 33 回日本分子生物学学会,神戸, 2011
 12. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Yoshihiro Tanaka, Yosuke Yokota, Chika Sakamoto, Shohei Miyamoto, Tomoko Inoue, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. Diverse subtypes of DCs expressing Ly49D residing are dominantly induced in tumor draining lymph nodes during the regression of in vivo administration of GM-CSF gene transduced lung cancer cells. 第 17 回日本遺伝子治療学会, 福岡, 2011
 13. Saori Yamaguchi, Tomotoshi Marumoto, Takenobu Nii, Hirotaka Kawano, Jiyuan Liao, Yoko Nagai, Michiyo Okada, Atsushi Takahashi, Hiroyuki Inoue, Erika Sasaki, Shinji Okano, Yoshie Miura, Kenzaburo Tani. Characterization of embryonal carcinoma cells emerged in the process of iPSC generation from common marmoset fibroblasts. 第 17 回日本遺伝子治療学会, 福岡, 2011
 14. Chika Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Yosuke Yokota, Shohei Miyamoto, Ayumi Watanabe, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. GM-CSF gene-transduced murine cancer stem cells are susceptible to antitumor CD8+ T cell immunity. 第 17 回日本遺伝子治療学会, 福岡, 2011
 15. Yosuke Yokota, Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Takehiko Yokomizo and Kenzaburo Tani. Absence of LTB4/BLT1 axis enhances memory antitumor immunity responses induced by GM-CSF gene-transduced tumor cells, mainly in a CD4+ T cell dependent manner. 第 17 回日本遺伝子治療学会, 福岡, 2011
 16. Hirotaka Kawano, Tomotoshi Marumoto, Michiyo Okada, Tomoko Inoue, Takenobu Nii, Jiyuan Liao, Saori Yamaguchi, Yoko Nagai, Hiroyuki Inoue, Erika Sasaki, Yoshie Miura, Kenzaburo Tani. A basic helix-loop-helix transcription factor Lyl1 regulates hematopoietic differentiation of common marmoset ES cells. 第 17 回日本遺伝子治療学会, 福岡, 2011
 17. Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Meiko Yamada, Takafumi Nakamura, Beibei Wang, Kaname Nosaki, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu, Kenzaburo Tani. Characterization of replication competent coxsackievirus B3 with oncolytic capacity against non small lung cancer cells. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011
 18. Chika Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Ayumi Watanabe, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011
 19. Saori Yamaguchi, Tomotoshi Marumoto, Takenobu Nii, Hirotaka Kawano, Jiyuan Liao, Yoko Nagai, Michiyo Okada, Atsushi Takahashi, Hiroyuki Inoue, Erika Sasaki, Shinji Okano, Yoshie Miura, Kenzaburo Tani. Characterization of embryonal carcinoma cells emerged in the process of iPSC cell generation from common marmoset fibroblasts. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011
 20. Yasuki Hijikata, Mutsunori Murahashi-Iga, Shinji Okano, Yoshihiro Tanaka, Kosuke Odaira, Atsushi Takahashi, Tomotoshi Marumoto, Hiroyuki Inoue, Toshihiko Okazaki, Kenzaburo Tani. Development of Experimental Immune Therapies for Solid Tumors: Our Clinical Trial Experiences in Phase. 第 73 回日本血液学会学術集会. 名古屋, 2011
 21. 土方 康基、岡崎 利彦、村橋(伊賀) 睦了、田中 芳浩、大平 公亮、岡野 慎士、高橋 淳、丸本 朋稔、井上 博之、谷 憲三朗. RNF43 ペプチドパルス樹状細胞ならびに RNF43 ペプチド特異的活性化リンパ球を用いた進行固形腫瘍患者に対する強化養子免疫療法第 I 相臨床試験. 第 3 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会, 別府, 2011
 22. Takenobu Nii, Tomotoshi Marumoto, Hirotaka Kawano, Saori Yamaguchi, Yoko Nagai, Yoshie Miura, Jiyuan Liao, Michiyo Okada, Kenzaburo Tani. A new technology to induce hemangioblasts from common marmoset ESCs by inhibiting PI3K-AKT pathway. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011
 23. Hirotaka Kawano, Tomotoshi Marumoto, Michiyo Okada, Tomoko Inoue, Takenobu Nii, Jiyuan Liao, Saori Yamaguchi, Yoko Nagai, Hiroyuki Inoue, Erika Sasaki, Yoshie Miura, Kenzaburo Tani. LYL1 Promotes Hematopoietic Differentiation of Common Marmoset Embryonic Stem Cells. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011
 24. 山口沙織、丸本朋稔、二井偉暢、河野紘隆、廖紀元、永井陽子、岡田美智代、高橋淳、井上博之、佐々木えりか、岡野慎士、三浦由恵、谷憲三朗. iPSC 細胞作製過程において生じたコモンマモセット線維芽細胞由来胚性ガン細胞の生物学的特徴. 第 70 回日本癌学会総会, 2011
 25. Hamada, K., Zhang, T., Nakashiro, K., Hamakawa, H. (2011) Carrier cells infected with IAI.3B

promoter-driven oncolytic adenovirus overcome immunogenicity and induce complete tumor reduction in oral squamous carcinoma cells The ASGCT 14th Annual Meeting, May 19-21, 2011 in Seattle, WA, USA.

26. Hamada, K., Zhang, T., Shirakawa, T., Huang, W. (2011) Efficacy and biosafety test of carrier cell infected with oncolytic adenovirus 4 2-6 2011 102th AACR, Orland Florida
27. Yoshihara, C., Hamada, K., Koyama, Y. (2011) Novel adenovirus complexes having artificial envelope for tumor gene therapy. 第17回日本遺伝子治療学会、福岡、7月15-17日
28. 濱田雄行. (2011) 頭頸部癌における IAI.3B プロモーター導入腫瘍溶解性アデノウイルス感染キャリアー細胞の抗腫瘍効果 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋、10月3-5日.
29. 小山義之、芳原智恵子、黒田美奈子、濱田雄行. ウィルス抗原遺伝子を用いたガン免疫治療の新しい考えかた. 第21回バイオ・高分子シンポジウム. 吹田市 7月25日～7月26日
30. 濱田雄行 (2011) 頭頸部癌における IAI.3B プロモーター導入腫瘍溶解性アデノウイルス感染キャリアー細胞の抗腫瘍効果. 第70回日本癌学会総会、名古屋、10月3-5日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤研究事業）

分担研究報告書

癌に対する新たなコンドロイチン硫酸ポリマー修飾腫瘍溶解性麻疹ウイルス療法開発
のための前臨床研究

分担研究者 谷 憲三郎 九州大学ゲノム病態学分野 教授

研究要旨

遺伝子改変腫瘍溶解性麻疹ウイルス（MV-NPL）が様々な固形癌細胞株に低いウイルス感染力価で優れた殺細胞効果を有することを明らかにし、当面の治療対象癌を頭頸部癌に決定した。また、MV-NPL ウイルス株の TFF 限外濾過法による濃縮、及び PEI 及び CS の順次付加による電荷変移の安定した CSP-MV の作製に成功している。今後本製剤の in vivo での安全性および有効性を検討するために、抗麻疹ウイルス中和抗体を産生可能な野生型マウスを用いた担癌マウスモデル感染実験に必要となるヒト CD46 発現マウス肺癌細胞株を作製した。また、野生型マウスにおける MV-NPL 投与実験を施行し、抗麻疹中和抗体産生を確認したことで、今後の抗麻疹免疫応答回避のための in vivo 担癌マウスモデル実験が可能となった。

分担研究者

谷憲三郎 九州大学生体防御医学研究所・教授
濱田雄行 愛媛大学医学部附属病院産婦人科・講師

A. 研究目的

悪性腫瘍は日本国民の死因の第一位であり、特に再発・進行がん患者に対する新たな治療法の開発は急務である。近年ウイルス自身が有する腫瘍溶解性を利用した療法が世界的に注目されてきており、日本においても単純ヘルペスウイルスを用いた臨床研究が脳腫瘍や乳癌を対象に実施・報告されている（Open Virol J 4:103-108, 2010）。しかし他癌種に対しても新規腫瘍溶解ウイルス療法の開発が望まれ、また現行のウイルス療法では接種後に抗体産生等によるウイルス排除免疫が誘導され、長期的な抗腫瘍効果は期待しにくく、全身投与も困難である。この点に関しては、解決策の開発が急務である。我々はこれまでに麻疹ウイルスを用いた研究を進めてきた。現在 Edmonston 株（MV-Edm）については米国で臨床試験が実施されている。しかし MV-Edm はインターフェロン α によりその増殖が抑えられ、in vivo での抗腫瘍効果は得にくい。一方、我々が開発した MV-NPL 株は、その点を克服しており担腎癌免疫不全マウスに対する著明な抗腫瘍効果を認め（Mol Ther 18:544-551, 2010）、新たな腫瘍溶解ウイルス療法剤としての可能性が期待できる。一方、コンドロイチン硫酸ポリマー法は研究分担者の濱田らが開発した、アデノウイルスに対する中和抗体による感染抑制を解除する新規人工エンベロープ加工技術であり、抗アデノウイルス CTL 誘導により担卵巣癌マウスにお

いて顕著な抗腫瘍効果を示した（（特許等）特願 2009-315041、2009 年 1 月 30 日出願、Biomaterials 31: 2912-2918, 2010）。本研究ではこれら 2 新規技術を組み合わせ、長期的抗腫瘍効果がさらに期待でき、全身投与も可能なコンドロイチン硫酸ポリマー修飾腫瘍溶解性麻疹ウイルス（CSP-MV）療法を開発し、その第 I 相臨床研究実施を目指す。

B. 研究方法

①—③ 5ヶ年研究計画概要

- ① 平成 23 年度には、先ず非 GMP（good manufacturing practice）レベルで CSP-MV 製剤を作製し、in vitro での腫瘍溶解性および担がんマウスを用いた in vivo での抗腫瘍効果の検証実験を行う。次に CSP-MV 製剤を用いた遺伝子治療第 I 相臨床研究実施を念頭に、九州大学病院分子・細胞調整センター（KU-MCPC）内で GMP 準拠 CSP-MV 製剤の生産の準備を行う。
- ② 平成 24・25 年度は CSP-MV 製剤を KU-MCPC 内において GMP 準拠にて生産する。次に本 GMP 準拠製剤を用いた前臨床試験として、マウスおよびカンクイザルにおいて用量漸増試験を行い、ヒトにおける安全投与量を決定する。
- ③ 平成 26・27 年度は上記結果をもとに、CSP-MV 療法第 I 相臨床研究実施に向けた遺伝子治療研究実施計画書を作成し、九州大学病院遺伝子治療臨床研究倫理審査委員会での審査後、厚生科学審議会での審査を受け、可能であれば臨床研究を開始する。この間本臨床研究実施に必要な各種検査体制を確立する。

H23年度 実験方法

(1) 各種癌および正常細胞株におけるCD46発現の検討:

培養細胞: A549 (肺癌)、H460 (肺癌)、H1299 (肺癌)、HCC827 (肺癌)、N417 (小細胞肺癌)、SBC-3 (小細胞肺癌)、SBC-5 (小細胞肺癌)、H28 (悪性胸膜中皮腫)、H2452 (悪性胸膜中皮腫)、MST0-211H (悪性胸膜中皮腫)、HT29 (大腸癌)、CaCO2 (大腸癌)、DLD-1 (大腸癌)、T. Tn (頭頸部癌)、TE6 (食道癌)、TE8 (食道癌) はRPMI/10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) で、MiaPaCa (膵癌)、Panc-1 (膵癌)、AsPC-1 (膵癌)、BxPC3 (膵癌)、SW620 (大腸癌)、FaDu (頭頸部癌)、HSC3 (頭頸部癌)、HSC4 (頭頸部癌)、LN444 (グリオーマ)、LN308 (グリオーマ)、BEAS-2B (正常気管上皮) はDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) /10%FBSで、HeP2 (頭頸部癌)、MRC5 (正常肺線維芽細胞) はMinimum Essential Medium (MEM) /10%FBSにて培養を行った。培養後の各細胞をPE標識抗ヒトCD46モノクローナル抗体染色、FACS buffer洗浄後、Flow Cytometry法にてCD46発現を比較定量した。

(2) In vitro 殺腫瘍細胞効果の比較検討:

癌細胞株に対するウイルスの殺細胞効果を、クリスタルバイオレット法にて判定した。各培養細胞株を、予め 5×10^4 cells/wellずつ24穴プレートに播種し、MOI=0.01、0.1もしくは1でウイルス(MV-NPL)感染を行い、3日後にクリスタルバイオレット液にて染色した。

(3) ウイルスの増殖と精製:

MV-NPLはVero細胞(アフリカミドリザル腎臓上皮細胞)にて増殖させた。ウイルスを回収する時期を決定するため、6cmディッシュにVero細胞を播種し、MOI=0.01でウイルスを感染し、予め定めた時間(感染16, 24, 32, 40, 48, 56, 64時間)でウイルスを回収し、力価の確認を行った。力価の確認方法は、Vero細胞を用いた段階希釈法にて判定した。回収したウイルス液は4℃にて保存し、限外濾過法(TFF: Tangential Flow Filtration)にて濃縮した。

(4) コンドロイチン硫酸ポリマー修飾腫瘍溶解性麻疹ウイルス(CSP-MV)の作製:

PEI及びCSの順次付加による電荷変移を、順次ゼータサイザー(Zetasizer)により確認した。

(5) In vitro 中和抗体存在下のウイルス活性確認モデルの確立:

抗麻疹ウイルス中和抗体として、化血研より譲渡された献血ベニコロン[®]を使用した。献血ベニコロン[®]液を段階希釈し、同量の標準液(麻疹ウイルスEdmonston株 100 TCID₅₀)と混合し、Vero細胞に感染させることにより中和抗体価を判定した。抗麻疹中和抗体存在下では、麻疹ウイルスの殺細胞効果が抑制されることを確認するため、ウイルス液と同量の献血ベニコロン[®]10倍希釈液を混合し、 1×10^4 cells/wellずつ24穴プレートに予め播種し

た肺癌細胞株A549に添加し、4日後にクリスタルバイオレット液にて染色した。

(6) 野生型マウスにおけるMV-NPL投与後の同ウイルス中和抗体産生確認実験:

野生型マウスC57BL/6Nに各量(10^3 TCID₅₀、 10^4 TCID₅₀、 10^5 TCID₅₀、 10^6 TCID₅₀(うち2匹はアジュバントを追加))のMV-NPLをそれぞれ腹腔内投与した。1週間毎に血液を採取し、熱処理した血清を用いて、中和抗体価を測定した。中和抗体価の測定には、標準液(麻疹ウイルスEdmonston株 100TCID₅₀)と血清の段階希釈液を混合させ、Vero細胞に感染させることで行った。

(7) ヒトCD46発現マウス肺癌細胞株の作製:

本製剤のin vivoでの安全性および有効性を検討するために、抗麻疹ウイルス中和抗体産生可能な野生型マウスを用いた担癌マウスモデル感染実験に必要となる、ヒトCD46発現マウス肺癌細胞株を以下の方法で樹立した。まずヒトCD46 DNAをGatewayシステムのLR反応によりCS II-EF-RfAベクターに導入後、293T細胞へLipofectamine2000を用いて遺伝子導入しCD46遺伝子導入レンチウイルスを作製した。作製したレンチウイルスをマウス肺癌細胞株LL/2にMOI=約10にて感染後1ヶ月間、培養・継代を繰り返したCD46遺伝子導入LL/2細胞を用いて、ヒトCD46発現の確認ならびにMV-NPLによる殺細胞効果の獲得を確認した。ヒトCD46発現は、PE標識ヒトCD46モノクローナル抗体を用いて染色し、FACS Caliburにて解析した。MV-NPLによる殺細胞効果の確認は、クリスタルバイオレット法により判定した。ゼラチンコート48穴プレートに 1×10^4 cells/wellのLL/2細胞ならびにCD46導入LL/2細胞を播種し、MOI=0.01、0.1もしくは1でMV-NPL感染を行い、3日後にクリスタルバイオレット液にて染色し観察した。

(倫理面への配慮)

動物実験、遺伝子組み換え実験、ならびに遺伝子治療臨床研究計画書作成は各関係指針ならびに法令に従って倫理的に実施する。

C. 研究結果

(1) 各種癌および正常細胞株におけるCD46発現の検討:

ヒト頭頸部癌細胞をはじめ(図1上)、ほぼすべてのヒト癌細胞株において、ヒトCD46の高発現が確認された(図1中)。特に頭頸部及び大腸癌細胞株において、ヒトCD46の強い発現を認めた(図1下)。

(2) In vitro 殺腫瘍細胞効果の比較検討:

クリスタルバイオレット法の結果、ほぼすべての癌細胞株において、低いウイルス感染力価で優れた殺細胞効果を有することを明らかにした。(1)の結果と併せ腫瘍内投与が容易である頭頸部癌を当面の治療対象癌として決定した(図2)。

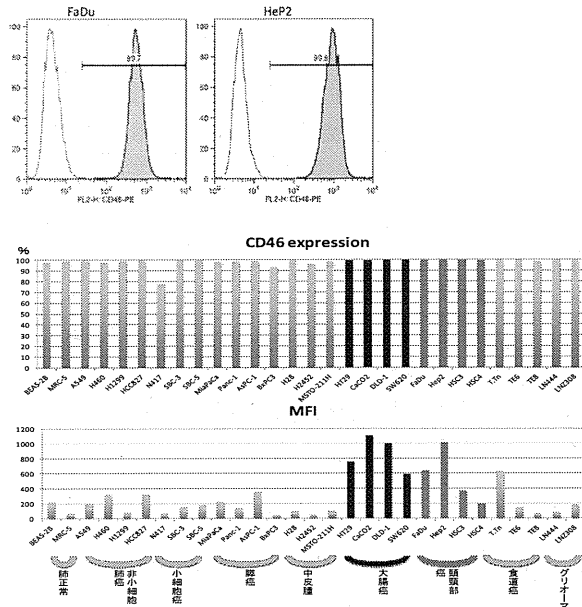


図1 (上) 頭頸部癌細胞株 (Fadu, Hep2) の CD46 発現の評価 (ヒストグラム: フローサイトメトリー法)
 (中) 各種細胞株の CD46 発現頻度 (%)
 (下) 各種細胞株の CD46 発現強度 (MFI)

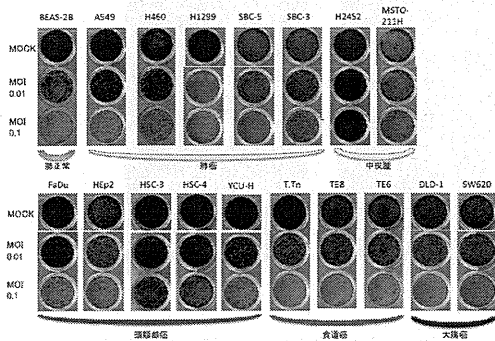
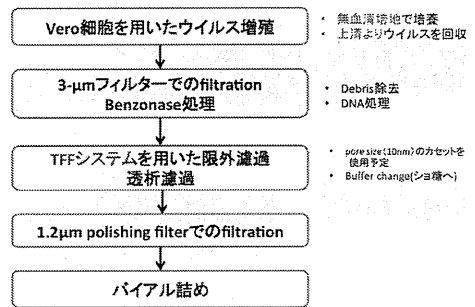


図2 Crystal Violet 法による殺細胞効果の確認

(3) ウイルスの増殖と精製:

MV-NPL は Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎臓上皮細胞) にて増殖させた。ウイルスを回収する時期を決定するため、6cm ディッシュに Vero 細胞を播種し、MOI=0.01 でウイルスを感染し、あらかじめ定めた時間 (感染 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64 時間) でウイルスを回収し、力価測定を行った。力価測定は、Vero 細胞を用いた段階希釈法にて判定した。感染 24 時間後において、鏡検上、80%程度のシンシチアが観察され、32 時間後では、多くの Vero 細胞は死滅し上清中に浮遊していた。培養上清中に存在するウイルスの力価は感染 24 時間以降、ほぼ一定であった。ウイルスの精製に際しては、Progenitor 細胞の混入をなるべく避ける必要があるため、以後は 90%程度のシンシチアが確認された時点で回収することとした。Vero 細胞を 15cm ディッシュに播種し、70-80%コンフ

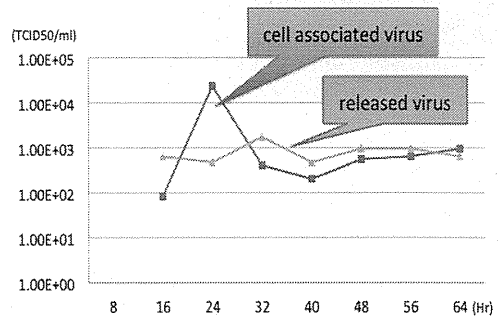
ルエントまで培養した後、培養上清を除去し、ウイルス液を添加した。1 時間の感染の後、ウイルス液を除去し、新鮮培養液で置換、翌日 90%シンシチアの形成が見られた時点で、培養上清を回収した。回収したウイルス液は 4°C にて保存し、限外濾過法にて濃縮した (図 3)。容量計算で 17 倍濃縮したウイルス液は、力価計算でも 17 倍の濃縮が確認された (図 4)。



Longfield KK, Walker HJ, Gregory LC, Federspiel MJ. Methods Mol Biol. 2011;737:345-66.

図3 ウイルス精製 Overview

図4 MV-NPL 増殖曲線 (TCID₅₀/ml)



(4) コンドロイチン硫酸ポリマー修飾腫瘍溶解性麻疹ウイルス (CSP-MV) の作製:
 PEI 及び CS の順次付加による電荷変移を確認し、PEI もしくは CS の順次多元付加によりウイルス (MV-NPL) のポリマー修飾がなされたことを確認した (1 元から 15 元) (図 5)。

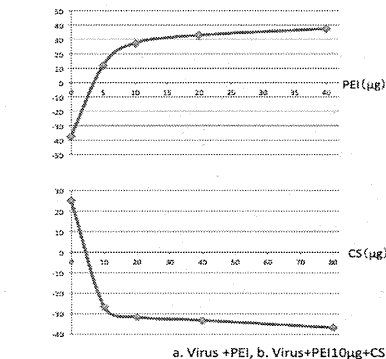


図5 PEI、CS 添加によるウイルス表面電荷の推移
 (上) PEI 添加、
 (下) CS 添加

(5) In vitro 中和抗体存在下のウイルス活性確認モデルの確立:
 ウイルスの感染力を完全に抑制する最大希釈倍率の逆数を中和抗体価とすると 128 倍であった。献血ベニロン®液を PBS により 10 倍希釈した溶液の中和抗

体価は、一般的な健常人がもつ中和抗体価と同程度である16-32倍であった(図6)。さらに抗麻疹ウイルス中和抗体存在下では、A549細胞に対するMV-NPLの殺細胞効果が著明に抑制されることが確認された(図7)。

今後、このモデルを用いて、上記作製したCSP-MVのうち、最も殺細胞効果が得られる修飾回数(2元から15元)を選択する予定である。

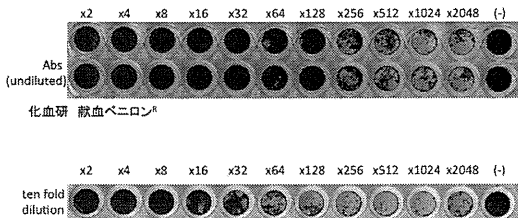
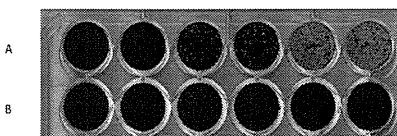


図6 抗麻疹ウイルス中和抗体価及び感染阻害効果の確認

(上) 化血研 献血ベニロン®原液
(下) 10倍希釈液

MOCK MOI=0.01 MOI=0.1



A: Abs(-) B: Neutralizing Abs(+)

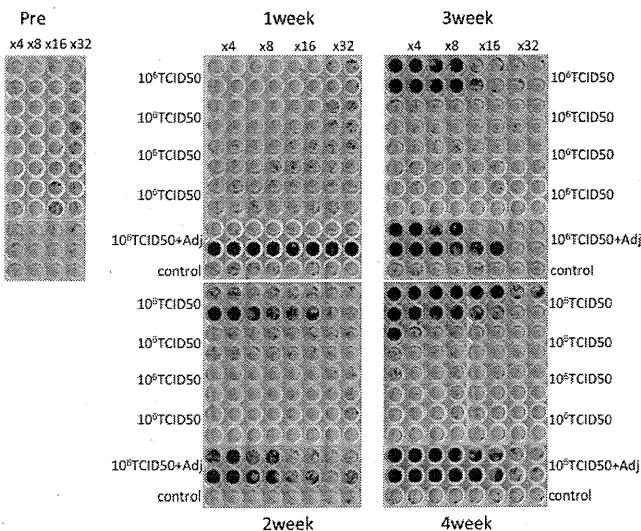
*献血ベニロン®の10倍希釈液(中和抗体価16-32倍程度)

図7 抗麻疹ウイルス中和抗体によるウイルス感染力阻害効果

(6)野生型マウスにおけるMV-NPL感染後の同ウイルス中和抗体産生確認実験:

MV-NPLを投与したマウスには体重減少等の副作用を認めず、MV-NPL投与量依存性に同マウス由来血清に高い中和抗体価が誘導される(10^3 TCID₅₀; 4倍未満、 10^6 TCID₅₀; 32倍以上)が確認された(図8)。

図8. 野生型マウスでの抗MV-NPL中和抗体産生



(7)ヒトCD46発現マウス肺癌細胞株の作製:

今後本薬剤のin vivoでの安全性および有効性を検討するために、抗麻疹ウイルス中和抗体を産生可能な野生型マウスを用いた担癌マウスモデル感染実験に必要なヒトCD46発現マウス肺癌細胞株を作製した。LL/2細胞は、ヒトCD46を全く発現しないのに対し、ヒトCD46導入LL/2(CD46+LL/2細胞)では、極めて高いヒトCD46の発現が認められた(92.8%)(図9上)。LL/2細胞ではMOI=1にても殺細胞効果が見られないのに対し、CD46+LL/2細胞では低力価のMV-NPL感染により容量依存的殺細胞効果が確認された。尚、抗麻疹ウイルス存在下においては、CD46+LL/2細胞に対するMV-NPLの殺細胞効果は相殺された(図9下)。

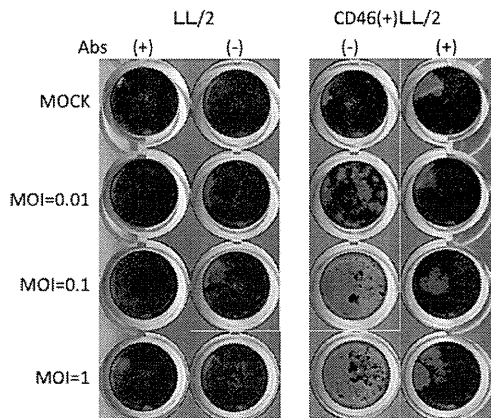
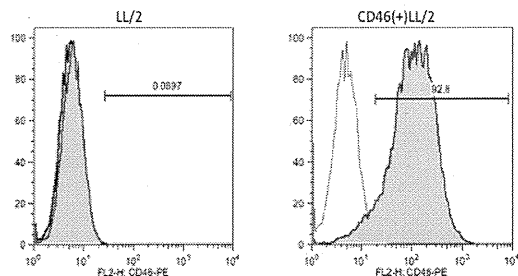


図9 ヒトCD46遺伝子導入マウス肺癌細胞の作製

(上) CD46+LL/2細胞のヒトCD46発現確認

(下) CD46+LL/2細胞に対するMV-NPLの殺細胞効果の確認

D. 考察

フローサイトメトリー法による各種ヒト癌細胞株のヒトCD46発現の程度を確認したところ、ほぼすべての癌種において、麻疹ウイルス受容体ヒトCD46の高発現が確認された。クリスタルバイオレット法による殺細胞効果の確認では遺伝子改変麻疹ウイルス(MV-NPL)がほぼすべての細胞株に対して優れた殺細胞効果を持つことが確認され、多くの癌種においても有望であることが示唆された。臨床試験での投与方法の簡易性及び安全性を考慮して、当面の投与方法は腫瘍内投与を選択し、対象癌種は頭頸部癌とした。

MV-NPL の精製においては、先行する参考文献（米国における麻疹腫瘍溶解性ウイルスを用いた臨床試験）に準じて、上清中のウイルスを回収し、TFF 限外濾過法等により約 17 倍の濃縮に成功したが、麻疹ウイルスのポリマー加工技術確立のためには、純度の高い麻疹ウイルスを得ることが重要でありこのため、早期に麻疹ウイルスの精製技術を確立する予定である。抗ウイルス免疫応答回避のためのウイルスの多重コーティング検討に関しては、PEI 及び CS の順次付加により、付加量依存的なウイルス表面電荷の変化（推移）が確認され、ウイルス表面の修飾が得られていることが確認された。ガンマグロブリン製剤を用いた *in vitro* における抗麻疹ウイルス中和抗体による感染抑制の解除を確認する系を確立することに成功し、現在コンドロイチン硫酸ポリマーによる麻疹ウイルス修飾の最適化を検討中である。また、野生型マウス（正常免疫系）が MV-NPL 投与により同ウイルスに対する中和抗体を産生することを証明し、同マウスを用いた担癌マウスモデル作成の際に必要なヒト CD46 発現マウス肺癌細胞株の作製に成功した。これらの研究成果を基に、同担癌マウスモデルにおいて、抗麻疹ウイルス免疫応答回避確認を目的とした CSP-MV のマウス *in vivo* 抗腫瘍効果の比較検討が可能となった。

E. 結論

遺伝子改変腫瘍溶解性麻疹ウイルス（MV-NPL）を用いた治療は頭頸部癌のみならず、他の多くの癌細胞株に対しヒト CD46 受容体依存性に強力な殺細胞効果を呈した。さらに PEI 及び CS の順次付加による MV-NPL のポリマー加工（CSP-MV）に成功した。本年度以降、CSP-MV の *in vitro* における最適化条件決定後に検証が必要となる CSP-MV を用いた *in vivo* 免疫回避マウスモデルの確認及びヒト CD46 発現マウス癌細胞の作成に成功した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

- Inoue T, Sugiyama D, Kurita R, Oikawa T, Kulkeaw K, Kawano H, Miura Y, Okada M, Suehiro Y, Takahashi A, Marumoto T, Inoue H, Komatsu N, Tani K, APOA-1 is a novel marker of erythroid cell maturation from hematopoietic stem cells in mice and humans. *Stem Cell Rev* 7(1):43-52, 2011
- Zhang T., Hamada K., Hyodo M., Itoh H., Tani, K., Goda H., Nakashiro K., Hamakawa, H., Gene therapy for oral squamous cell carcinoma with IAI.3B promoter-driven oncolytic adenovirus-infected carrier cells. *Oncol Rep* 25:795-802, 2011

- Tian Y, Kobayashi S, Ohno N, Isobe M, Tsuda M, Zaike Y, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimaru K. Leukemic T cells are specifically enriched in a unique CD3(dim) CD7(low) subpopulation of CD4(+) T cells in acute-type adult T-cell leukemia. *Cancer Sci*. 102: 569-577, 2011
- Inoue T., Kulkeaw, K., Okayama, S., Tani, K., Sugiyama, D. Variation in mesodermal and hematopoietic potential of adult skin-derived induced pluripotent stem cell lines in mice. *Stem Cell Rev* 7:958-968, 2011
- Maeda, T., Kurita, R., Yokoo, T., Tani, K., Makino, N. Telomerase inhibition promotes an initial step of cell differentiation of primate embryonic stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 407:491-494, 2011
- Takahashi, A., Tokita, H, Takahashi, K., Takeoka, T., Murayama, K., Tomotsune, D., Ohira, M., Iwamatsu, A., Ohara, K., Yazaki, K., Koda, T., Nakagawara, A., Tani, K. A novel potent tumour promoter aberrantly overexpressed in most human cancers. *Sci Rep* 1:15, 2011
- Dong, Y., Kobayashi, S., Tian, Y., Ozawa, M., Hiramoto, T., Izawa, K., Bai, Y., Soda, Y., Sasaki, E., Itoh, T., Maru, Y., Oyaizu, N., Tojo, A., Kai, C., Tani, K., Leukemogenic fusion gene (p190 BCR-ABL) transduction into hematopoietic stem/progenitor cells in the common marmoset. *Open J Blood Dis*. 2012 (in press)
- Somada, S., Muta, H., Nakamura, K., Sun, X., Honda, K., Ihara, E., Akiho, H., Takayanagi, R., Yoshikai, Y., Podack, E.R., Tani, K. CD30 Ligand/CD30 Interaction is involved in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2012 (in press)
- Hamada, K., Yoshihara, C., Ito, T., Tani, K., Tagawa, M., Sakuragawa, N., Ito, H., Koyama, Y. Antitumor effect of chondroitin sulfate-coated ternary granulocyte macrophage colony-stimulating factor plasmid complex for ovarian cancer. *J Gene Med*. 14:5120-127, 2012.
- Miyamoto, S., Inoue, H., Nakamura, T., Yamada, M., Sakamoto, C., Urata, Y., Okazaki, T., Marumoto, T., Takahashi, A., Takayama, K., Nakanishi, Y., Shimizu, H., Tani, K. Cocksackievirus B3 Is an oncolytic virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2609-21, 2012
- Mizuochi, C., Hirio, Y., Blasch, K., Kikushige, Y., Tani, K., Akashi, K., Tavian, M., Sugiyama, D. Intra-aortic clusters undergo endothelial to hematopoietic phenotypic changes in early

2. 学会発表

- Saori Yamaguchi, Tomotoshi Marumoto, Takenobu Nii, Hirota Kawano, Jiyuan Liao, Yoko Nagai, Michiyo Okada, Atsushi Takahashi, Hiroyuki Inoue, Erika Sasaki, Shinji Okano, Yoshie Miura, Kenzaburo Tani. Oncogenic risk of induced pluripotent stem cells established from somatic cells with chromosome instability. American Society of

- Gene and Cell Therapy, 14th Annual Meeting, Seattle, 2011
2. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Yoshihiro Tanaka, Yosuke Yokota, Chika Sakamoto, Shohei Miyamoto, Tomoko Inoue, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. Comparative microarray analysis implicates the pivotal participation of Type I Interferon related signaling pathway in antitumor effect provoked by in vivo GM-CSF gene transduced lung cancer cells. American Society of Gene and Cell Therapy, 14th Annual Meeting, Seattle, 2011
 3. Chika Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Yusuke Murakami, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Ayumi Watanabe, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. GM-CSF gene-transduced murine cancer stem cells eliminate tumorigenicity in vivo. American Society of Gene and Cell Therapy, 14th Annual Meeting, Seattle, 2011
 4. Hirotaka Kawano, Tomotoshi Marumoto, Michiyo Okada, Tomoko Inoue, Takenobu Nii, Jiyuan Liao, Saori Yamaguchi, Yoko Nagai, Hiroyuki Inoue, Atsushi Takahashi, Erika Sasaki, Yoshie Miura, Kenzaburo Tani. LYL1, a Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, Promotes Hematopoietic Differentiation of Common Marmoset Embryonic Stem Cells. American Society of Gene and Cell Therapy, 14th Annual Meeting, Seattle, 2011
 5. Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Toshihiko Okazaki, Tomotoshi Marumoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu, Kenzaburo Tani. Large-Scale Screening Identifies Coxsackievirus B3 (CVB3) as a Promising Oncolytic Virotherapy Agent against Non-Small Cell Lung Cancer. European Society for Gene and Cell Therapy, Brighton, 2011
 6. Yosuke Yokota, Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Takehiko Yokomizo, Kenzaburo Tani. Absence of LTB4/BLT1 axis promotes generation of long-lasting antitumor memory responses induced by administration of GM-CSF gene-transduced tumor cells, in a CD4+ T cell-dependent manner. 53th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Diego, 2011
 7. Jiyuan Liao, Tomotoshi Marumoto, Shinji Okano, Saori Yamaguchi, Takenobu Nii, Hirotaka Kawano, Yoko Nagai, Chika Sakamoto, Michiyo Okada, Yoshie Miura, Hiroyuki Inoue, Masato Tanaka, Kaori Nagatoshi, Kohichi Kawahara, Akira Suzuki, Kenzaburo Tani. Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells. 53th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Diego, 2011
 8. Takenobu Nii, Tomotoshi Marumoto, Hirotaka Kawano, Saori Yamaguchi, Yoko Nagai, Yoshie Miura, Jiyuan Liao, Michiyo Okada, Kenzaburo Tani. Efficient Differentiation of Common Marmoset Embryonic Stem Cells Into Hemangioblast-Like Cells by the Inhibition of PI3K-AKT Pathway. 53th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Diego, 2011
 9. Mutsunori Iga-Murahashi, Ysuki Hijikata, Yoko Suhiro, Hiroyuki Inoue, Yoshihiro Tanaka, Shinya Shimoda, Tomotoshi Marumoto, Toshihiko Okazaki, Atsusi Takahashi, Kenzaburo Tani. New strategy of antitumor immunotherapy targeting both tumor antigen and immune tolerance (Phase I Clinical trial). 第9回日本臨床腫瘍学会学術集会, 横浜, 2011
 10. Mutsunori Murahashi, Yasuki Hijikata, Junji Kishimoto, Masakazu Hirakawa, Shinji Okano, Yoshihiro Tanaka, Yoko Suehiro, Masaharu Nakayama, Hiroyuki Inoue, Tomotoshi Marumoto, Atsushi Takahashi, Toshihiko Okazaki, Yoichi Nakanishi, Koji Yoshida, Takuya Tsunoda, Yusuke Nakamura, Kenzaburo Tani. Phase I clinical trial of chemotherapy-combined cancer vaccine targeting both tumor antigen and immune tolerance against advanced solid tumors. American Society of Clinical Oncology. 2012
 12. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Yoshihiro Tanaka, Yosuke Yokota, Chika Sakamoto, Shohei Miyamoto, Tomoko Inoue, Kenzaburo Tani. Comparable transcriptional profile of murine mature dendritic cells in draining lymph node during tumor rejection by non-transmissible Sendai virus encoding GM-CSF infection 第33回日本分子生物学会, 神戸, 2011
 13. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Yoshihiro Tanaka, Yosuke Yokota, Chika Sakamoto, Shohei Miyamoto, Tomoko Inoue, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. Diverse subtypes of DCs expressing Ly49D residing are dominantly induced in tumor draining lymph nodes during the regression of in vivo administration of GM-CSF gene transduced lung cancer cells. 第17回日本遺伝子治療学会, 福岡, 2011
 14. Saori Yamaguchi, Tomotoshi Marumoto, Takenobu Nii, Hirotaka Kawano, Jiyuan Liao, Yoko Nagai, Michiyo Okada, Atsushi Takahashi, Hiroyuki Inoue, Erika Sasaki, Shinji Okano, Yoshie Miura, Kenzaburo Tani. Characterization of embryonal carcinoma cells emerged in the process of iPSC generation from common marmoset fibroblasts. 第17回日本遺伝子治療学会, 福岡, 2011
 15. Chika Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Yosuke Yokota, Shohei Miyamoto, Ayumi Watanabe, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. GM-CSF gene-transduced murine cancer stem cells are

- susceptible to antitumor CD8+ T cell immunity. 第 17 回日本遺伝子治療学会, 福岡, 2011
16. Yosuke Yokota, Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Takehiko Yokomizo and Kenzaburo Tani. Absence of LTB4/BLT1 axis enhances memory antitumor immunity responses induced by GM-CSF gene-transduced tumor cells, mainly in a CD4+ T cell dependent manner. 第 17 回日本遺伝子治療学会, 福岡, 2011
 17. Hirotaka Kawano, Tomotoshi Marumoto, Michiyo Okada, Tomoko Inoue, Takenobu Nii, Jiyuan Liao, Saori Yamaguchi, Yoko Nagai, Hiroyuki Inoue, Erika Sasaki, Yoshie Miura, Kenzaburo Tani. A basic helix-loop-helix transcription factor Lyl1 regulates hematopoietic differentiation of common marmoset ES cells. 第 17 回日本遺伝子治療学会, 福岡, 2011
 18. Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Meiko Yamada, Takafumi Nakamura, Beibei Wang, Kaname Nosaki, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu, Kenzaburo Tani. Characterization of replication competent coxsackievirus B3 with oncolytic capacity against non small lung cancer cells. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011
 19. Chika Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Ayumi Watanabe, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011
 20. Saori Yamaguchi, Tomotoshi Marumoto, Takenobu Nii, Hirotaka Kawano, Jiyuan Liao, Yoko Nagai, Michiyo Okada, Atsushi Takahashi, Hiroyuki Inoue, Erika Sasaki, Shinji Okano, Yoshie Miura, Kenzaburo Tani. Characterization of embryonal carcinoma cells emerged in the process of iPS cell generation from common marmoset fibroblasts. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011
 21. Yasuki Hijikata, Mutsunori Murahashi-Iga, Shinji Okano, Yoshihiro Tanaka, Kosuke Odaira, Atsushi Takahashi, Tomotoshi Marumoto, Hirouki Inoue, Toshihiko Okazaki, Kenzaburo Tani. Development of Experimental Immune Therapies for Solid Tumors: Our Clinical Trial Experiences in Phase. 第 73 回日本血液学会学術集会. 名古屋, 2011
 22. 土方 康基、岡崎 利彦、村橋(伊賀) 睦了、田

- 中 芳浩、大平 公亮、岡野 慎士、高橋 淳、丸本 朋稔、井上 博之、谷 憲三朗. RNF43 ペプチドパルス樹状細胞ならびに RNF43 ペプチド特異的活性化リンパ球を用いた進行固形腫瘍患者に対する強化養子免疫療法第 I 相臨床試験. 第 3 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会, 別府, 2011
23. Takenobu Nii, Tomotoshi Marumoto, Hirotaka Kawano, Saori Yamaguchi, Yoko Nagai, Yoshie Miura, Jiyuan Liao, Michiyo Okada, Kenzaburo Tani. A new technology to induce hemangioblasts from common marmoset ESCs by inhibiting PI3K-AKT pathway. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011
 24. Hirotaka Kawano, Tomotoshi Marumoto, Michiyo Okada, Tomoko Inoue, Takenobu Nii, Jiyuan Liao, Saori Yamaguchi, Yoko Nagai, Hiroyuki Inoue, Erika Sasaki, Yoshie Miura, Kenzaburo Tani. LYL1 Promotes Hematopoietic Differentiation of Common Marmoset Embryonic Stem Cells. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011
 31. 山口沙織、丸本朋稔、二井偉暢、河野紘隆、廖紀元、永井陽子、岡田美智代、高橋淳、井上博之、佐々木えりか、岡野慎士、三浦由恵、谷憲三朗. iPS 細胞作製過程において生じたコモナーモセット線維芽細胞由来胚性ガン細胞の生物学的特徴. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

癌に対する新たなコンドロイチン硫酸ポリマー修飾腫瘍溶解性ウイルス療法開発

分担研究者 濱田 雄行 愛媛大学生殖病態外科学分野 講師

研究要旨：

陰性荷電の腫瘍溶解性ウイルスに対する陽性荷電のポリエチレンジイミン(polyethyleneimine、PEI)と陰性荷電でその受容体が腫瘍組織に多量に発現するCD44のコンドロイチン硫酸(chondroitin sulfate、CS)のポリマー多重加工技術確立のため、エンベロープを有し抽出技術が確立していない麻疹ウイルスに比べ、精製技術の確立している腫瘍溶解性アデノウイルスについてポリマー多重加工を行い、抗体による感染抑制解除による抗腫瘍効果について検討を行った。腫瘍溶解性アデノウイルス(1元)、PEI(2元)、CS(3元)さらにPEI、CSの順に15元まで処理を行ったところ、8元以上で抗体存在下でin vitroにおける抗腫瘍効果が増大し、13元以下はほぼ同様であった。このため13元ポリマー加工腫瘍溶解性アデノウイルスをアデノウイルスで事前免疫したsyngeneic mouse modelにおいてマウス卵巣癌の皮下腫瘍モデルおよび腹腔内播種性モデルにおいて投与したところ、完全腫瘍退縮が得られた。今回認められたアデノウイルスポリマー加工技術を基に、MSVの精製技術を確立した後に、同様にMSVにおけるポリマー加工技術を確立することにより、腫瘍溶解性麻疹ウイルスの臨床試験開始が可能になるものと思われた。

A. 研究目的

悪性腫瘍は日本国民の死因の第一位であり、その粗死亡率は年々増加しており、種々の治療法の改善さらには分子標的療法、免疫療法等の新治療法の開発にもかかわらず、治療成績の改善は見られていない。ウイルスを用いた遺伝子治療は、新たな癌治療法として注目されたが抗体による感染抑制のため感染が成立しないということが大きな障害となっていた。我々は、腫瘍溶解性アデノウイルスを感染したキャリアー細胞を用いることにより容易に抗体による感染抑制を解除できること、アデノウイルスの事前免疫により抗アデノウイルス細胞性免疫が誘導され抗アデノウイルスCTLにより著明な抗腫瘍効果が誘導されることを明らかにしてきた(Hamada et al, Molecular therapy, 2007)。キャリアー細胞は作製、保存、安全性に問題があるため、陽性荷電のポリエチレンジイミン(polyethyleneimine、PEI)と陰性荷電のコンドロイチン硫酸(chondroitin sulfate、CS)の腫瘍溶解性アデノウイルスのポリマー加工により、キャリアー細胞と同様に抗体による感染抑制を解除し、抗アデノウイルスCTLにより抗腫瘍効果が得られることを報告した(Yoshihara et al, Oncology reports, 2010)。その後の詳細な検討により、陰性荷電の腫瘍溶解性アデノウイルス(1元)に陽性荷電のPEI(2元)さらには腫瘍組織に大量に発現して腫瘍特異性のあるCD44がその受容体の陰性荷電のCS(3元)を加工し、さらにPEI、CSの順に7元のCSまで加工すると、in vitroでは抗体存在下でも1~2%の細胞に感染が成立し、マウス卵巣癌細胞株OVHMを同系のB6C3F1マウス腹腔内に移植し腹腔内播種性モデルを

作製し、アデノウイルスで事前免疫したマウスに腹腔内投与を行うと約20%のマウスが完全治癒となることが明らかとなり、7元処理では抗体による感染抑制を解除し十分な抗腫瘍効果を得ることは不十分であることが明らかとなった。今回の研究において、腫瘍溶解性アデノウイルスのポリマー加工技術の改良により感染抑制の解除さらに抗腫瘍効果を改善し、腫瘍溶解性麻疹ウイルスのポリマー加工技術確立により第一相臨床試験に結びつくよう以下の実験を行った。

B. 研究方法

1) CSとヒアルロン酸(hyaluronic acid、HA)の腫瘍特異性の比較検討

陰性荷電の腫瘍特異性ポリマーとしては、CS以外にHAがよく知られており、これら両者の腫瘍特異性を検討するために、卵巣癌細胞株に対してplasmid-GFP-PEI-CSおよびplasmid-GFP-HAに対する感染効率、さらにplasmid-mGM-CSF-PEI-CSおよびplasmid-mGM-CSF-PEI-HAのマウス卵巣癌細胞株OVHMの皮下腫瘍および腹腔内播種性モデルにおける抗腫瘍効果をKaplan-Meier法における生存曲線において検討した。また、原材料として鶏冠由来HA(分子量73万)、サメ軟骨由来CS(分子量1.4万)、牛軟骨由来CS(分子量4万、1.5万、1.4万、1万)のものを使用して、原材料、分子量による腫瘍特異性について検討した。卵巣癌細胞株としてはOVHM以外には、人卵巣癌細胞株(PA-1、RMG-1、OVCAR3、OCC1、HEY)を用い、正常細胞としては人由来の線維芽細胞株F27、羊膜細胞株ASPを用い、マウス由来の線維芽細胞株

Lc1-1D を用いた。

2) in vitro におけるポリマー加工アデノウイルスの抗腫瘍効果の検討

腫瘍溶解性アデノウイルスは、野生型アデノウイルスの E1A プロモーターを腫瘍特異性の高い midkine プロモーターに置換した AdE3-midkine を用いた。抗アデノウイルス抗体としては 6000 倍の抗アデノウイルス抗体価を有するグロベニン-I(武田薬品)を用いた。in vitro の実験では、非小細胞性肺癌細胞株 A549 を用いた。腫瘍溶解性アデノウイルス単独 (1 元) から PEI (2 元) さらに CS (3 元)、以後順次 EPI、CS の順に 15 元まで加工し、in vitro における抗腫瘍効果を crystal violet 法により検討した。同時に、ポリマー加工における腫瘍溶解性アデノウイルスの加工程度を検討するため、電子顕微鏡を用いて被覆加工の程度を比較した。PEI としては PEI MAX (分子量 4 万、Polyscience) を用いた。

3) in vivo におけるポリマー加工アデノウイルスの抗腫瘍効果の検討

in vivo の実験には、マウス卵巣癌細胞株 OVHM と同系のメス 4 週齢 B6C3F1 マウスを用い、 1×10^6 個を皮下あるいは腹腔内に投与し皮下腫瘍モデルおよび腹腔内播種性モデルを作製した。治療開始 3 週間前に adenovirus- β gal を 1×10^{10} pfu 皮下投与し事前免疫を行った。腹腔内播種性モデルは、卵巣癌のみならず膵癌、胃癌、大腸癌等の消化器癌においても同様な治療モデルとして用いることができ、静脈投与に次ぐ有力な治療ルートといえ、容易に腹腔内播種を来しやすい卵巣癌モデルとしては治療効果判定として腫瘍内投与を行う皮下腫瘍に比べ重点を置いて比較検討した。

C. 研究結果

1) CS とヒアルロン酸 (hyaluronic acid, HA) の腫瘍特異性の比較検討

plasmid GFP-PEI-CS、plasmid GFP-PEI-HA 三元ポリマー加工で腫瘍細胞における遺伝子発現において原材料における差を OVHM で比較検討したところ、最も良好な遺伝子発現を示したのは、分子量 1 万のサメ軟骨由来の CS であった。このため、CS としては分子量 1 万のサメ軟骨由来のものを使用した。人卵巣癌細胞株においても plasmid GFP-PEI-CS は plasmid GFP-PEI-HA より良好な遺伝子発現を示し、正常細胞株に比べ約 10 倍の遺伝子発現を示した。OVHM 卵巣癌皮下腫瘍モデルにおいて、3 回腫瘍内投与により plasmid-mGM-CSF-PEI-HA では 80%、plasmid-mGM-CSF-PEI-CS では 100% の生存率を示した (図 1)、腹腔内播種性モデルでは、6 回腹腔内投与により plasmid-mGM-CSF-PEI-CS では完全治癒は認められないものの plasmid-mGM-CSF-PEI-HA に比べ有意な生存率の上昇を示した (図 2)。このため、腫瘍特異的陰性荷電ポリマーとしては分子量 1 万のサメ軟骨由来のものが優れていることが示唆され、plasmid では腹腔内播種性モデルにおいては完全治癒が望め無いたことが明らかとなった。尚、腹腔内播種性モデルにおいて皮下腫瘍モデルにおいて使用する 100-500ul

の容量の投与では、腹腔内が巨大空間であるため抗腫瘍効果は認められず、5ml 以上の大容量においてのみ抗腫瘍効果が認められた。また、腹腔内播種性モデルにおいてほぼすべてのマウスで OVHM 細胞注射部位に再発が認められたため、腹腔内治療時に 2ml 程度注射部位に投与したところ、全マウス皮下腫瘍の再発が予防できた。

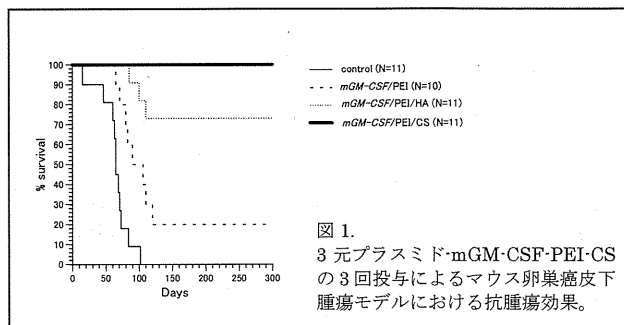


図 1.
3 元プラスミド mGM-CSF-PEI-CS の 3 回投与によるマウス卵巣癌皮下腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果。

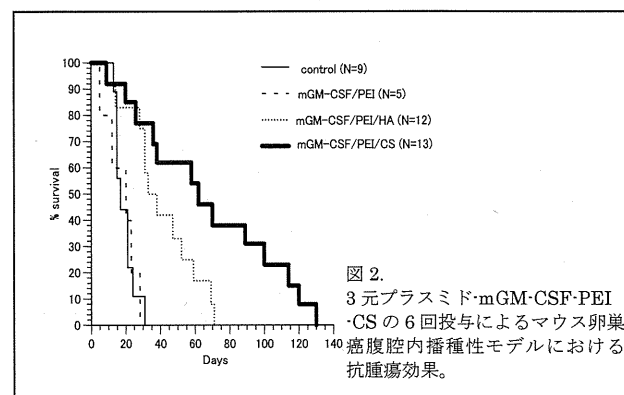


図 2.
3 元プラスミド mGM-CSF-PEI-CS の 6 回投与によるマウス卵巣癌腹腔内播種性モデルにおける抗腫瘍効果。

2) in vitro におけるポリマー加工アデノウイルスの抗腫瘍効果の検討

96 well plate を用いて抗体を 10 倍に薄めて 600 倍の力価の抗体存在下において抗腫瘍効果を検討した。1 元では全く効果は認められず、9 元以降抗腫瘍効果は増大し、13 元以降において最も強力な抗腫瘍効果が得られ、以後の加工においても有意な抗腫瘍効果の増大は認められなかった。電子顕微鏡的検討により、ポリマー多重加工により、PEI および CS により腫瘍溶解性アデノウイルスが重層され 13 元において完全に腫瘍溶解性アデノウイルスが被覆されていることが明らかとなった。

3) in vivo におけるポリマー加工アデノウイルスの抗腫瘍効果の検討

13 元ポリマー加工腫瘍溶解性アデノウイルスを用いて皮下腫瘍では 500ul、腹腔内腫瘍では 7ml の内 5ml を腹腔内投与、2ml を注射部位投与とした。皮下腫瘍では、1 回投与で 6 匹中 4 匹、2 回投与で 8 匹中 8 匹が完全治癒となり (図 3)、腹腔内投与では 1 回投与で 11 匹中 5 匹、2 回投与で 11 匹中 4 匹、3 回投与で 11 匹中 8 匹が完全治癒となった (図 4)。このため、皮下腫瘍では、2 回投与、腹腔内投与では 3 回以上の投与が必要と思われた。

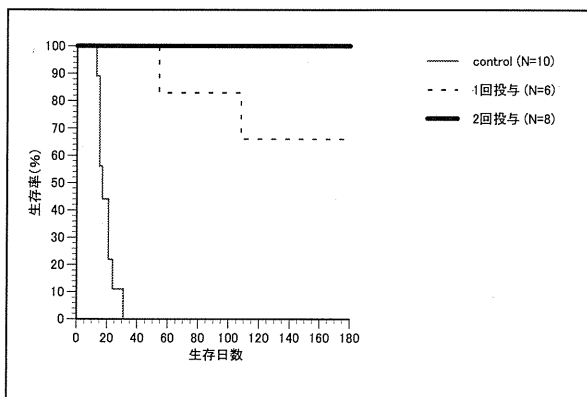


図3.腫瘍溶解性アデノウイルス AdE3-midkine の PEI、CS による 13 元多重ポリマー加工処理後の 1 回及び 2 回投与によるマウス卵巣癌皮下腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果

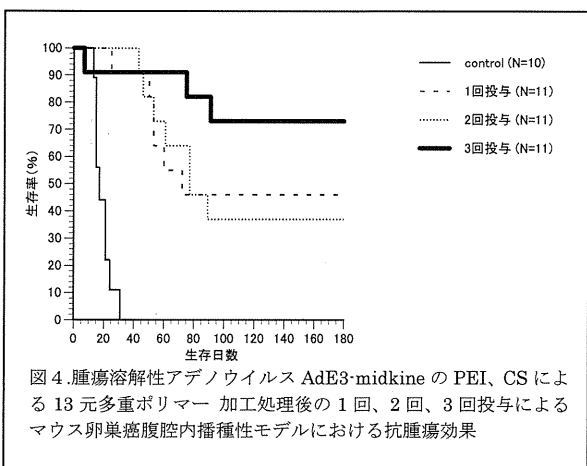


図4.腫瘍溶解性アデノウイルス AdE3-midkine の PEI、CS による 13 元多重ポリマー加工処理後の 1 回、2 回、3 回投与によるマウス卵巣癌腹腔内播種性モデルにおける抗腫瘍効果

D. 考察

CD44 を受容体とする腫瘍特異的陰性ポリマーとしては、従来より HA と CS が報告され、その腫瘍特異性は同様とされていたが、今回の検討により HA より CS がすぐれ、特にサメ由来の分子量 1 万の CS が優れていることが明らかとなった。ポリマー多重加工は、8 元以上特に 13 元において安定的な抗腫瘍効果が得られ、腫瘍内投与、そして腹腔内投与において完全腫瘍退縮が得られることが明らかとなった。また、今回腫瘍溶解性アデノウイルスにおいて行った PEI、CS による多重加工技術を腫瘍溶解性麻疹ウイルスに用いることにより同様な抗体による感染抑制を解除することが可能となり、十分な抗腫瘍効果が得られることが推察された。

E. 結論

腫瘍溶解性アデノウイルスの PEI、CS の 13 元加工により、抗体による感染抑制を解除することが可能となり、十分な抗腫瘍効果が得られ、この技術は腫瘍溶解性麻疹ウイルスにも応用可能であり、腫瘍溶解性麻疹ウイルスのポリマー加工により十分な抗腫瘍効果が得られることが推察された。

F. 特許等の取得状況

特になし。

G. 学会発表リスト並びに論文リスト 論文発表

1. Saito, A., Morishita, N., Mitsuoka, C., Kitajima, S., Hamada, K., Lee, K.M., Kawabata, M., Fujisawa, M. and Shirakawa, T. Intravenous injection of irradiated tumor cell vaccine carrying oncolytic adenovirus suppressed the growth of multiple lung tumors in a mouse squamous cell carcinoma model. *Journal of Gene Medicine* 13:353-361. 2011
2. Zhang, T., Hamada, K., Hyodo, M., Itoh, H., Tani, K., Goda, H., Nakashiro, K. and Hamakawa, H. Gene therapy for oral squamous cell carcinoma with IAI.3B promoter-driven oncolytic adenovirus-infected carrier cells. *Oncology Reports* 25:795-802. 2011
3. Yoshihara, C., Hamada, K., Kuroda, M. and Koyama, Y. Oncolytic plasmid: A novel strategy for tumor immuno-gene therapy. *Oncology Letters* 3:387-390. 2012
4. Hamada, K., Yoshihara, C., Ito, T., Tani, K., Tagawa, M., Sakuragawa, N., Itoh, H. and Koyama, Y. Antitumor effect of chondroitin sulfate-coated ternary GM-CSF plasmid complex for ovarian cancer. *Journal of Gene Medicine*, 14: 120-127. 2012

学会報告

1. Hamada, K., Zhang, T., Nakashiro, K., Hamakawa, H. (2011) Carrier cells infected with IAI.3B promoter-driven oncolytic adenovirus overcome immunogenicity and induce complete tumor reduction in oral squamous carcinoma cells The ASGCT 14th Annual Meeting, May 19-21, 2011 in Seattle, WA, USA.
2. Hamada, K., Zhang, T., Shirakawa, T., Huang, W. (2011) Efficacy and biosafety test of carrier cell infected with oncolytic adenovirus 4 2-6 2011 102th AACR, Orland Florida
3. Yoshihara, C., Hamada, K., Koyama, Y. (2011) Novel adenovirus complexes having artificial envelope for tumor gene therapy. 第 17 回日本遺伝子治療学会、福岡、7 月 15-17 日
4. 濱田雄行.(2011) 頭頸部癌における IAI.3B プロモーター導入腫瘍溶解性アデノウイルス感染キャリアー細胞の抗腫瘍効果 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、10 月 3-5 日.
5. 小山義之、芳原智恵子、黒田美奈子、濱田雄行. ウィルス抗原遺伝子を用いたガン免疫治療の新しい考えかた. 第 21 回バイオ・高分子シンポジウム. 吹田市 7 月 25 日～ 7 月 26 日
6. 濱田雄行、(2011) 頭頸部癌における IAI.3B プロモーター導入腫瘍溶解性アデノウイルス感染キャリアー細胞の抗腫瘍効果. 第 70 回日本癌学会総会、名古屋、10 月 3-5 日