

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

平成 24 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 25 (2013) 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 憲三朗	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 憲三朗	10
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	18
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	23

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤研究事業）

総括研究報告書

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に関する研究

研究代表者 谷 憲三郎 九州大学ゲノム病態学分野 教授

研究要旨

腫瘍溶解性ウイルス療法は難治性悪性腫瘍に対する新たな治療法として近年注目されている。しかし、現行の腫瘍溶解性ウイルス療法では接種後に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、新規技術の導入が求められている。我々が開発したMV-NPL株（以後、NPLと略）は、インターフェロン抵抗性獲得によ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）、新規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、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（CS-MV）療法を開発し、その第I相臨床研究実施を目指す。平成24年度は、NPL大量産生ならびに精製方法について詳細な条件検討実験を行い、液体クロマトグラフィーを用いた精製法により安定かつ高純度のNPL産生系を確立した。合わせて九州大学病院分子・細胞調整センター（KU-MCPC）内においてGMP（Good manufacturing practice）レベルでCS-MVを大量生産できる環境を整備した。さらに、*in vitro*ならびに*in vivo*マウス実験系において、CS-MVの高い抗腫瘍効果及び同麻疹ウイルス中和抗体回避能を明らかにした。また、CS-MVの製剤化を効率的に進めることを目的に、分担研究者の濱田らは並行して、陽性コントロールとして腫瘍溶解性アデノウイルスに対するポリエチレンイミンおよびコンドロイチン硫酸によるポリマー加工方法を抗アデノウイルス抗体存在下において検討した。この結果、室温条件下、ミキシング操作を追加することで、ウイルス凝集が抑制でき、感染性も高まることを明らかにした。

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（*OpenVirolJ*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I型インターフェロン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（以後、NPLと略）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）、新規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（ウイルスにPEI（ポリエチレンイミン：カチオンポ

リマー）及びCS（コンドロイチン硫酸：アニオンポリマー）を交互に付加し多重ポリマー層化する）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（CS-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

5ヶ年研究計画概要
平成23～25年度前半には、先ず非GMP（Good manufacturing practice）レベルでCS-MV製剤を作製し、*in vitro*での腫瘍溶解性および各種担癌マウスを用いた*in vivo*での抗腫瘍効果の検証実験を行う。次にCS-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）内においてGMP準拠CS-MV製剤の生産の準備を行う。平成25・26年度はCS-MV製剤をKU-MCPC内においてGMP準拠にて生産する。次に本GMP製剤を用いた前臨床試験として、マウスおよび適切な大型動物種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。平成26・27年度は上記結果をもとに、CS-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。

平成 24 年度 研究方法

(1) NPL 大量生産条件検討

まず NPL 増殖に最適な培養温度と回収時間を検討するため、37°C もしくは 32°C にて Vero 細胞感染による NPL 増殖実験を行い、経時的に細胞ならびに培養上清液を回収した。培養は無血清培養液を用いて行い、37°C では DMEM を、32°C では VP-SFM を使用した。回収した細胞ならびに培養上清中 NPL の定量は Vero 細胞を用いた TCID₅₀ 法にて行った。

次に無血清培養液/32°C 培養系において、適切な NPL 回収方法を検討するため、A 法（上清中に出現した NPL を回収）と B 法（細胞内で増殖した NPL を回収）との間で比較検討を行った。NPL 回収時期は上記①実験において、最も効率よく NPL を回収できる時期を採用した。上清中 NPL は、1 日 1 回培養液交換時に回収した。

(2) NPL 精製条件の検討

まず、単純ヘルペスウイルス、エンテロウイルス 71、アデノ随伴ウイルスなど他ウイルスの精製で用いられている液体クロマトグラフィー法を検討した。ゲル濾過カラム (HiPrep Sephacryl S-300 HR)、陰イオン交換カラム (Poros (R) HQ)、陽イオン交換カラム (HiTrap SP XL) を用いて、NPL を分離し、NPL 回収率 (%) 及び純度を比較検討した。NPL 量の定量は、上記と同様に Vero 細胞を用いて TCID₅₀ 法により行った。NPL 純度の評価は、SDS-PAGE 法を用いて行った。

次に、陰イオン交換カラムによる NPL の精製時における至適緩衝液条件を検討するため、各種緩衝液 (トリス、ピストリス、ピストリスプロパンおよびリン酸緩衝液)、pH (pH5.5-8.5)、塩濃度 (0-2.0 M) 下に NPL 分離を行い、回収率を比較検討した。NPL 定量は、TCID₅₀ 法にて行った。

さらに、液体クロマトグラフィー法によるウイルス精製前後で NPL 回収率及び純度の評価を行った。NPL 回収率は、各 NPL 液に含まれる NPL の定量 (TCID₅₀ 法) により評価した。純度の評価は、タンパク質定量 (BCA assay)、SDS-PAGE 法にて行った。

(3) NPL への PEI、CS 付加によるウイルスポリマー多元複合体の作成

多元複合体の作成は、陽イオンポリマーの PEI に引き続き、陰イオンポリマーの CS を順次付加することで行った。NPL 表面の各ポリマーによる修飾の確認は、Zetasizer を用いた NPL 表面電荷の変化を確認することにより行った。電子顕微鏡観察は酢酸ウラン溶液を用いた負染色後、九州大学生体防御医学研究所内の透過型顕微鏡 (TEM) を用いて行った。

多元複合体の *in vitro* 抗腫瘍効果の検討は、① 1-5 layer の各多元複合体を作成し、殺 A549 ヒト肺癌細胞効果の評価は、Crystal Violet 法にて行った。② 抗麻疹ウイルス中和抗体存在下での殺細胞効果の評価は、①で殺細胞効果の高い 1 layer (NPL)、2 layer (NPL-PEI)、3 layer (NPL/PEI/CS) を用いて行った。抗麻疹ウイルス中和抗体を含有するヒト免疫グロブリン製剤希釈液下に、各多元複合体による A549 細胞に対する殺細胞効果を Crystal Violet 法により比較

定量した。

(4) 多元複合体の担癌マウスモデルにおける *in vivo* 抗腫瘍効果の検討

麻疹ウイルス非免疫同系担癌マウスモデルでの抗腫瘍効果の検討は野生型 C57BL/6N マウスに昨年度樹立した LLC/CD46 細胞を皮下接種し、3-5 mm の腫瘍形成が認められた時点で、A. コントロール液、B. NPL 液 (1 layer)、C. 上記実験で決定した多元複合体液 (3 layer) を各群 5 匹ずつ腫瘍内単回投与し、週 3 回腫瘍径の経時的測定を行った。

次に多元複合体投与間隔の検討は、野生型 C57BL/6N マウスに LLC/CD46 細胞を皮下接種し、3-5 mm の腫瘍形成が認められた時点より、NPL 液 (1 layer)、多元複合体液 (3 layer) を各群 2 匹ずつ 1 日 2 回 3 日間もしくは 1 日 1 回 6 日間腫瘍内投与した。上記実験同様、週 3 回腫瘍径の測定を行った。

麻疹ウイルス既免疫同系担癌マウスモデルでの抗腫瘍効果の検討は、NPL 液 1×10^6 TCID₅₀ を野生型 C57BL/6N マウス腹腔内に投与し、麻疹ウイルス既免疫マウスモデルを確立した。NPL 液接種後 21 日目にマウス血清中に抗麻疹ウイルス中和抗体が十分に誘導されたことを確認後、LLC/CD46 細胞を皮下接種し、3-5 mm の腫瘍形成が認められた時点で、上記と同様に、A. NPL 液 (1 layer)、B. 多元複合体液 (3 layer) を各群 3 匹ずつに対して計 6 日間 1 日 1 回腫瘍内投与し、週 3 回腫瘍径を計測した。

(5) アデノウイルスへの PEI、CS 付加によるウイルスポリマー多元複合体の作成

ポリマー加工による腫瘍溶解性アデノウイルスの抗アデノウイルス中和抗体による感染抑制解除のため、PEI とコンドロイチン硫酸を用いて実験を行った。氷中と室温での加工について比較検討を行い、その際、加工時間も検討した。96 well plate を用い、抗アデノウイルス中和抗体を液量にして培養液の 10 分の 1 程度加えて、A549 細胞のアデノウイルス-LacZ を用いたアデノウイルスの感染性の判定を行った。さらに、走査型電子顕微鏡により、ポリマー加工の立体的な構造を観察した。アデノウイルスに対する PEI およびコンドロイチン硫酸加工後、感染性改善のため、ヘパリンナトリウムを加えて、その投与量、反応時間、静置とミキシングにおける加工条件について、抗アデノウイルス抗体存在下において、ウシ胎仔血清 (FCS) 非存在下と存在下において感染性を比較検討した。

(6) CD46-Tg/IFNR-KO マウス (麻疹ウイルス感染マウス) の作製

In vivo マウスモデルにおける多元複合体投与の安全性を評価するために、麻疹ウイルス感染可能マウスが必要である。麻疹ウイルス受容体ヒト CD46 を発現し、I 型インターフェロン (IFN) 受容体を欠失させることで麻疹ウイルス感受性を獲得した遺伝子二重改変マウスの作出を開始した。すなわち、ヒト CD46 トランスジェニック (CD46-Tg) マウスと I 型 IFN 受容体 (IFNR) ノックアウトマウスを交配し作製したヘテロマウス (CD46-Tg/IFNR^{+/+}) とさらに IFNR-KO マウスを交配することで CD46-Tg/IFNR-KO マウスを作出する予定である。

(7) 前臨床試験 (毒性評価を目的とした用量漸増試

験)の対象動物種の選定

イヌ腎臓尿管上皮細胞 (MDCK) に対して、NPL が感染性をもつことが確認されたことより、イヌにおける NPL 毒性試験の可能性を検討するため、腫瘍溶解性アデノウイルス皮下投与における体内分布試験を行った。

C. 研究結果

平成 23 年度研究結果

(1) ヒト固形癌細胞全 28 株が、遺伝子改変麻疹ウイルス (NPL) 受容体 CD46 を高発現し、NPL 感染にて高い殺腫瘍細胞効果を呈することを確認した。投与安全性を鑑み、臨床試験対象癌種は先ず頭頸部癌とした。

(2) ウイルス精製法は限外濾過法を採用した。

(3) コンドロイチン硫酸 (CS)、ポリエチレンイミン (PEI) と NPL の各表面電荷の違い (各陰性、陽性、陰性) による多元複合体の作製は、順次付加により結合させ、電荷の推移は Zetasizer にて確認した。

(4) レンチウイルスを用いた遺伝子導入法によりヒト CD46 発現マウス肺癌細胞株を樹立し、そのヒト CD46 高発現、および NPL 感染による腫瘍溶解性獲得を確認した。

(5) 野生型マウスにおいて腹腔内投与による NPL 感染実験を行い、抗麻疹ウイルス中和抗体産生誘導を確認し、麻疹ウイルス免疫回避のための in vivo マウス実験系への利用可能性が判明した。

平成 24 年度 研究結果

(1) NPL 大量生産条件検討

感染時に使用した NPL 量に対し最大 NPL 回収量は、32°C 培養系で 37 倍 (細胞内 NPL) と 1.4 倍 (上清中 NPL)、37°C 培養系で 1.9 倍 (細胞内 NPL) と 0.34 倍 (上清中 NPL) であった。以上より、無血清培養液を使用した NPL 産生系において、32°C を至適温度として決定した。次に 32°C 培養における A 法 (上清中 NPL 回収) と B 法 (細胞内 NPL 回収) の比較において、回収した NPL 総量は、2 回の実験において A 法で B 法の 5.8 倍、6.5 倍であった。無血清培養液使用、培養温度 32°C、培養上清中からのウイルス回収の各条件を NPL 大量生産のための至適条件と決定した。

(2) NPL 精製条件検討

ゲル濾過カラムにおける NPL 分離実験では、NPL 回収率は 14% であったが、SDS-PAGE 法による評価にて、NPL 純度の上昇は得られなかった。そこで、陰イオン交換カラムによる NPL 分離実験を施行し (図 1)、緩衝液塩濃度、pH の詳細な条件検討の結果、27.1%、33.3% の回収率が得られ (図 2)、SDS-PAGE 法による評価においても、検知バンド数減少による明らかな NPL 純度の上昇が確認された。一方、陽イオン交換カラムにおける NPL 分離では、NPL 回収率は検出限界以下であった。以上の結果より、NPL 精製の液体クロマトグラフィー法に使用する至適カラムとして陰イオン交換カラムを選択した。陰イオン交換カラムを用いた分離により得られた精製 NPL は、BCA assay により測定したタンパク質量により精製前後で 99.8% 以上の夾雑タンパク質が取り除かれたことを確認した。同様に SDS-PAGE 法においても、夾雑タンパク質が取り除かれたことを確認できた。

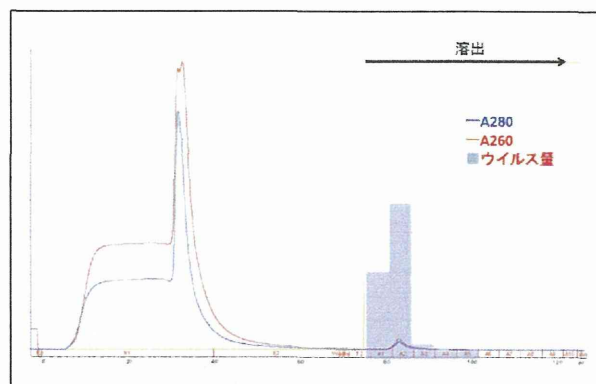


図1 陰イオン交換カラム法を用いたNPL分離結果

	液量 (mL)	ウイルスカ価 (TCID50/mL)	ウイルス量 (TCID50)	回収率 (%)
精製前①	20	3.54×10^5	7.08×10^6	100
精製後①	40	4.73×10^4	1.92×10^6	27.1
	47	6.3×10^7		
精製前②	450	2.66×10^5	1.12×10^8	100
精製後②	15	2.66×10^6	3.99×10^7	33.3

図2

陰イオン交換カラムを用いたNPL精製結果と回収率

(3) NPL への PEI、CS 付加によるウイルス・ポリマー多元複合体の作成

表面電荷が陰性である NPL に陽イオンポリマーである PEI を付加することで、NPL/PEI 複合体 (2 layer) を作成した。付加する PEI 量が漸増するのに伴い、複合体の表面電荷の上昇を認めた。続いて、陰イオンポリマーである CS を付加することで、NPL/PEI/CS 複合体 (3 layer) を作成した。付加する CS 量が増加するに従い、複合体の表面電荷は再度低下した (図 3)。引き続き、PEI の付加にて NPL/PEI/CS/PEI 複合体 (4 layer)、さらに CS を付加することで NPL/PEI/CS/PEI/CS 複合体 (5 layer) を作成した。

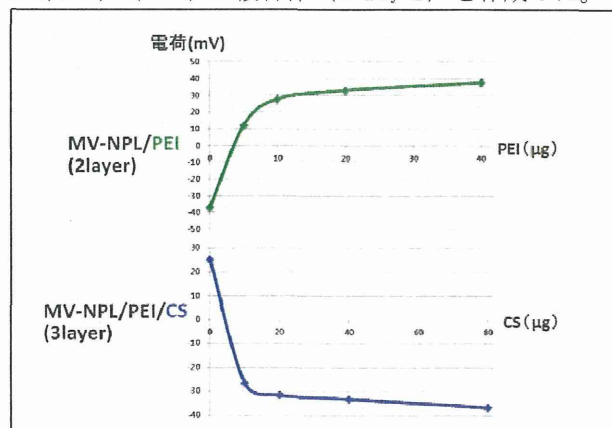


図3 ポリマー付加による表面電荷変化の検討

NPL (1 layer) 及び NPL/PEI/CS (3 layer) の粒子径サイズ分布を比較した結果、粒子径ピークが 100 nm

程度 (1 layer) から150 nm程度 (3 layer) に軽度の増加を認めた (図4)。負染色法後のTEM観察にて、3 layerにおいて、1 layerでは見られないNPL粒子周囲のリング状不染領域が認められ、ポリマー付加によるNPL表面の修飾が確認された (図5)

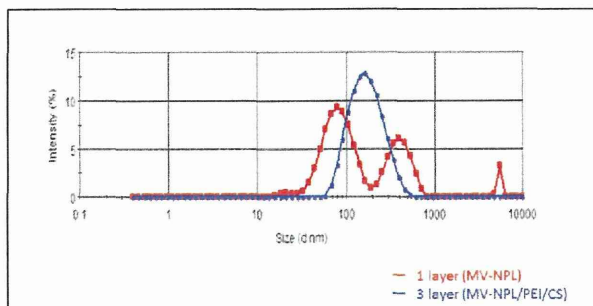


図4 多元複合体 (1 layer、3 layer) のサイズ変化

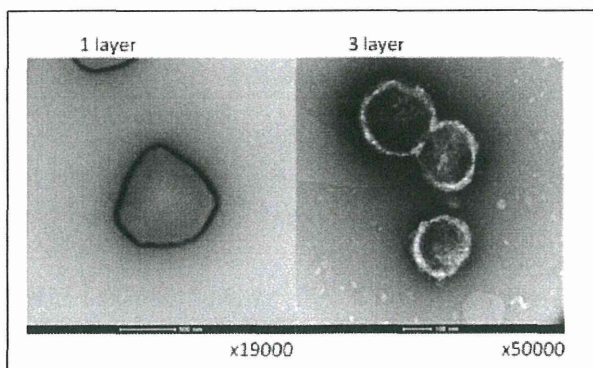
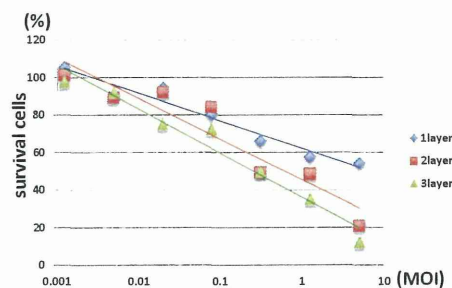
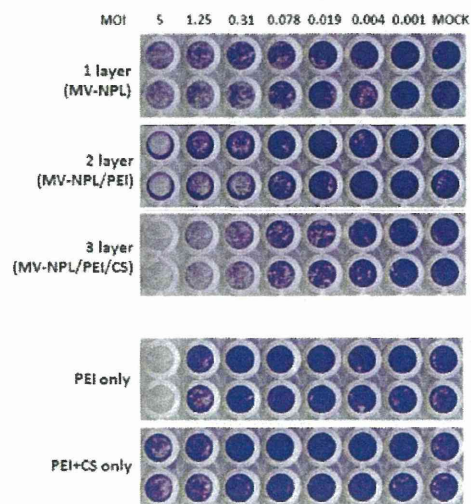


図5 多元複合体 (1 layer、3 layer) の電顕像

多元複合体の in vitro 抗腫瘍効果の検討は、①作成した多元複合体の in vitro における A549 細胞に対する殺細胞効果は、1-3 layer までは同程度であったが、4 layer 以降で、急激に低下することを確認した。②①で殺細胞効果が保たれていた各 1、2、3 layer を用いて以下の実験を施行した。抗麻疹ウイルス中和抗体なし、もしくは存在下の条件で行った A549 細胞に対する殺細胞効果を比較検討した結果、中和抗体の有無に関わらず、3 layer で最も高い殺細胞効果が確認された。また、多元複合体作成時に使用するポリマーのみによる A549 細胞への細胞傷害性を確認したところ、3 layer 作成時に使用する PEI/CS のみでは、細胞傷害性は軽微であったことから、3 layer の殺細胞効果増強はポリマーによる直接的効果ではなく、抗麻疹ウイルス中和抗体からの回避による効果と類推された (図6、図7)。以上の結果より、以後の in vivo マウス実験では、十分な抗腫瘍効果を保持し抗麻疹ウイルス中和回避可能な多元複合体として 3 layer を使用することとした。

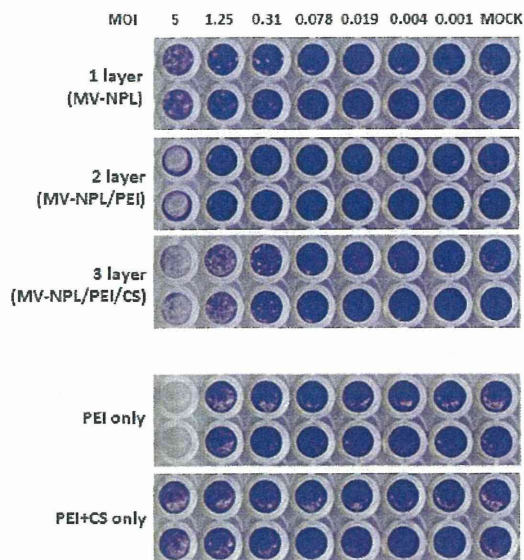
中和抗体なし

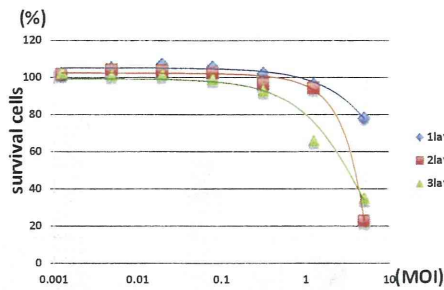


IC50 (MOI)		
1 layer	2 layer	3 layer
6.66	0.62	0.25

図6 多元複合体 (1 layer、3 layer) の肺癌細胞株に対する殺細胞効果の比較検討 (中和抗体非存在下)

中和抗体存在下





IC50 (MOI)		
1 layer	2 layer	3 layer
12.38	4.02	3.18

図7 多元複合体 (1 layer、3 layer) の肺癌細胞株に対する殺細胞効果の比較検討 (中和抗体存在下)

(4) 多元複合体の担癌マウスモデルにおける in vivo 抗腫瘍効果の検討

麻疹ウイルス非免疫同系担癌マウスモデルでの抗腫瘍効果の検討として、A (コントロール)、B (NPL液: 1 layer 2.5×10^5 TCID₅₀)、C (多元複合体液: 3 layer 2.5×10^5 TCID₅₀) を単回腫瘍内投与した後 (day1)、各マウスグループにおける腫瘍容積 (mm³) を比較測定した結果、C 投与群において、最も高い腫瘍形成抑制効果が確認された (図8)。上記と同様の条件で A 投与群と C 投与群を比較した別実験において生存期間を検討した結果、A 投与群と比較し C 投与群において有意な生存率の改善が認められた (p<0.05) (図9)。

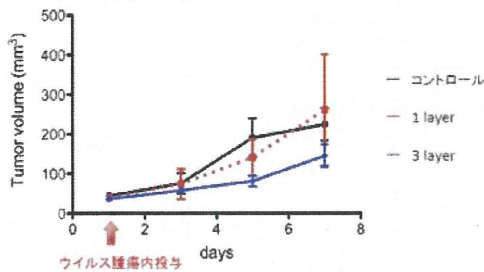


図8 in vivoモデルにおける多元複合体 (1 layer, 3 layer) の腫瘍増大抑制効果の比較 (中和抗体非存在下)

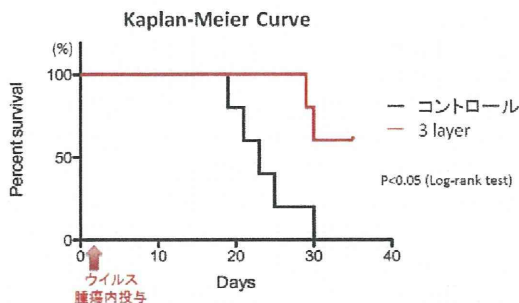


図9 in vivoモデルにおける多元複合体 (3 layer) の生存期間延長効果の比較 (中和抗体非存在下)
上記実験 (単回投与) では、その後腫瘍の再増大が確認されたため、治療効果を高める目的で合計6回ま

でNPL液 (1 layer) あるいは多元複合体液 (3 layer) の反復腫瘍内投与を行った。投与間隔を1日1回投与と1日2回投与と比較するとNPL液では投与間隔による腫瘍形成抑制効果の差は見られなかったが、多元複合体液の投与マウス群間では1日1回投与でより高い腫瘍形成抑制効果が確認された (図10)。

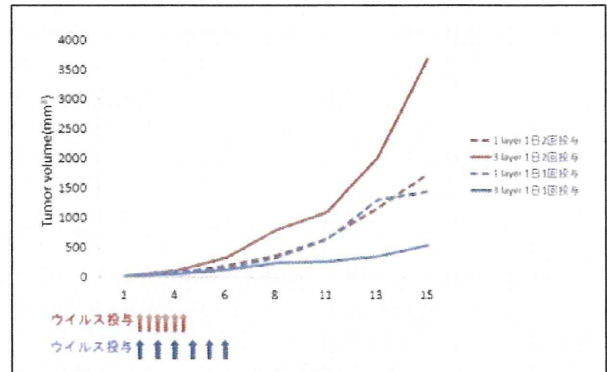


図10 in vivoモデルにおける多元複合体 (1 layer, 3 layer) 最適投与間隔の検討 (中和抗体非存在下)

麻疹ウイルス既免疫 (抗麻疹ウイルス中和抗体存在) 状態での in vivo 抗腫瘍効果を検討するため、NPL液の前投与により抗麻疹ウイルス中和抗体を誘導した野生型マウスに対して、NPL液 (1 layer) あるいは多元複合体液 (3 layer) を計6回反復腫瘍内投与した。3 layer にてより高い腫瘍形成抑制効果が確認された (図11)。

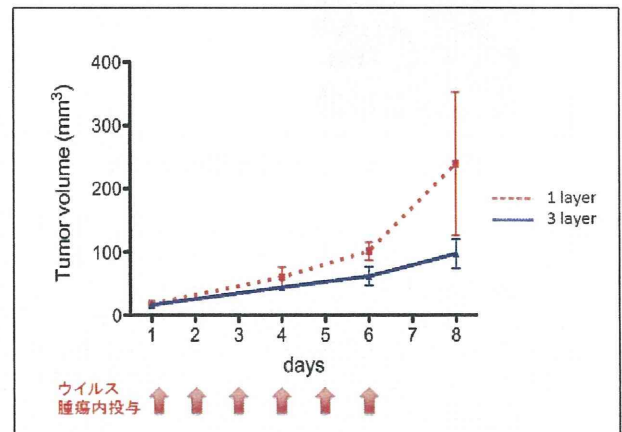


図11 in vivoモデルにおける多元複合体 (1 layer, 3 layer) の腫瘍増大抑制効果 (中和抗体存在下)

(5) アデノウイルスへのPEI、CS付加によるウイルスポリマー多元複合体の作成

FCS非存在下、抗体存在下で3時間感染後、FCSを10%加えて、3日間の培養を行い、感染性を検討した。アデノウイルス単独では100%感染するものの、抗体存在下では、全く感染は認められなかった。アデノウイルスにPEI、コンドロイチン硫酸を加えることによりポリマー加工を行った。氷中における加工に比

室温での加工は、30%感染性が改善した。静置時間を検討したところ、30分が最も良好な感染結果が得られた。また、多重加工をアデノウイルス(1元)、PEI(2元)、コンドロイチン硫酸(3元)、以降PEIとコンドロイチン硫酸を順次加えていき、7元まで検討したところ、8元以降においてアデノウイルス-LacZの感染性が増加し、腫瘍溶解性アデノウイルスの高い抗腫瘍効果が得られた。走査型電子顕微鏡により、立体的構造を観察した。溶媒について比較検討したところ、PBS、HEPES、Tris等の電解質を使用すると、固定後に多量の結晶が認められたため、5%グルコース液を用いることとした。静置による加工では、1元では単一分子であるものの、2元以降のウイルスのほとんどが凝集していた。このため、凝集を抑制するため、ローテーターおよびミキサーによる検討を行ったところ、前者では凝集の改善は全く認められず、後者のslow、fastの2段階攪拌においてfastのうち5段階中3段階目の速度で10分間ミキシングすると、最も良好な抗体存在下における感染性と、走査型電子顕微鏡観察下での凝集が抑制できることが明らかとなった(図12)。

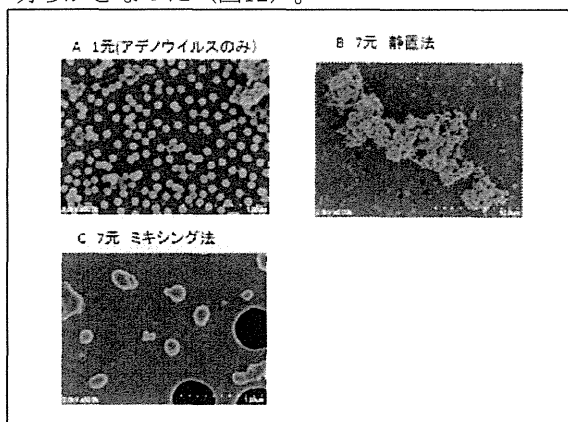


図12 アデノウイルス多元複合体の電顕像

ポリマー加工アデノウイルスの標的細胞への感染効率をさらに改善するため、コンドロイチン硫酸よりさらに強力な陰性荷電を有するヘパリンを用いてPEIの陽性荷電を中和し血清蛋白との結合を防ぎ標的癌細胞への感染効率を増加させるためのPEIの陽性荷電を中和し血清蛋白との結合を防ぎ標的癌細胞への感染効率を増加させるためのPEIの陽性荷電を中和し血清蛋白との結合を防ぐ次の実験を行った。13元処理後にヘパリン処理を行ったところ、抗体存在下においてFCS非存在下で3時間反応後、FCSを加えると、13元処理に比べ3倍ほどの感染が認められた。しかしながら、最初からFCSおよび抗体を加えるとその感染性は30%程度減少した。これは、ヘパリンの本来有しているFCS中の血液凝固因子とその他の蛋白質との結合によるものと思われた。このため、腫瘍特異性を有するEGFをさらに加えるとFCS存在下、非存在下において感染性と抗腫瘍効果の増大が認められた(図13)。

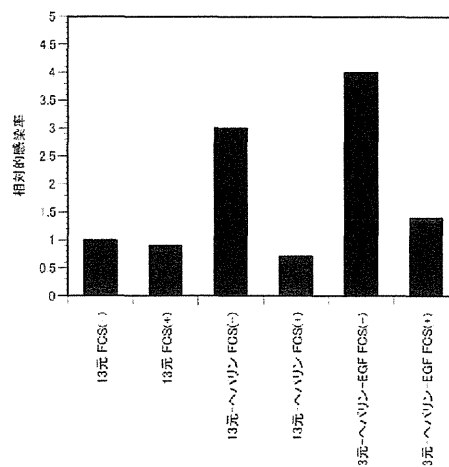


図13 アデノウイルス多元複合体の感染性(中和抗体存在下)

(6) CD46-Tg/IFNR-KO マウスの作製

本来ヒト(サル)でしか感染しない麻疹ウイルスに感染する性質を付与するため、ヒトCD46トランスジェニック(Tg)IFNRノックアウト(KO)ダブル改変マウスの作製を進めた。CD46-Tgマウスを北海道大学大学院医学研究科免疫学分野・瀬谷司教授より供与いただいた。また、IFNR-KOマウスを米国ジャクソンラボラトリーより購入し、九州大学発生病学室にて体外受精を行い、IFNR^{-/-}マウスを得た。現在IFNR^{-/-}マウス同士を交配し、KOマウスの作製を進めている。今後CD46-TgマウスとIFNR-KOマウスを交配し、目的のCD46-Tg/IFNR-KOマウスを作出し、本遺伝子改変マウスに本製剤を投与し、感染部位、臓器毒性、生存率等を検討する計画である。

(7) 前臨床試験(毒性評価を目的とした用量漸増試験)の対象動物種の選定

ウイルスを用いた毒性試験が可能な施設は、極めて少ないため、その実験条件を検討する必要がある。このため、腫瘍溶解性アデノウイルスを用いて、毒性試験の予備試験を行った。皮下投与後、血中中和抗体価は上昇するものの、血液、糞便、尿、唾液、摘出臓器において、プラーク形成ユニット(PFU)アッセイおよびリアルタイム定量的DNA-PCRにおいて、腫瘍溶解性アデノウイルスは検出されなかった。

D. 考察

NPL大量産生系構築に向け、詳細な条件検討を行い、①無血清培養液を使用する、②培養温度は32°Cとする、③上清中のNPLを回収して精製に用いる、各条件を決定し、大量かつ安定的にNPLを得ることが概ね可能となった。当初、米国Mayo ClinicにおいてGalanisらにより実施された臨床試験結果の報告を参考に、本試験で用いられた限外濾過によるNPL精製法を採用し、準備を進めたが、高純度NPLを得ることが困難であった。そこで代替方法として液体クロマトグラフィーによるNPL精製法を検討した。検討したカラムのうち、陰イオン交換カラムを用いたNPL精製法により、30%前後のNPL回収率と高純度産物を得ることができた。現在使用中の機器から円滑

なスケールアップが可能な機器を昨年度既に購入済みであり、KU-MCPCでのNPL製剤製造の準備が整ったものと考えている。一般的に限外濾過法のみでの精製よりも、イオン交換クロマトグラフィーを併用した方が精製度は格段に高くなることは明らかであり、我々の方法がGalanisらの方法より優れているものと考えている。しかし、臨床応用を考えた場合には大量生産が必要となるため、単純に精製度を高めるだけではなく、ウイルス量を十分確保する必要がある。我々の今回開発した方法では、十分量のウイルスも確保可能であると考えられ、今後の臨床展開が期待できるものと考えている。

昨年度より引き続きNPL、PEI、CSによる多元複合体の作成ならびに加工条件、添加割合について検討を行い、ポリマー加工による変化を、① Zetasizerによる表面電荷の変化度、② Zetasizerによるサイズ分布の変化度、③ 透過型電子顕微鏡による負染色法によるNPL粒子周囲の不染色域の発生、を確認することで判定した。In vitroにおいて作成した多元複合体のうち、3 layer (NPL/PEI/CS) がヒト肺癌細胞株 (A549細胞) に対して、抗麻疹ウイルス中和抗体存在の有無に関わらず、最も高い殺細胞効果を持つことを確認した。また、担癌マウス実験においても抗麻疹ウイルス中和抗体の有無によらず、3 layer (NPL/PEI/CS) 投与が、対照群となる1 layer (NPL) 投与に対して、より高い抗腫瘍効果をもつことが確認できた。濱田らの報告においては、より多層の加工 (13-15 layer) にて、抗ウイルス中和抗体存在条件下で最も高い抗腫瘍効果が確認されているが、今回の検討では、3 layer で最も高い抗腫瘍効果が確認された。この原因としては、使用しているウイルス (アデノウイルスと麻疹ウイルス) の構造 (エンベロープの存在、表面ファイバーと糖タンパクの長さ) の違いが考えられた。

濱田らのアデノウイルスを用いたウイルスポリマー多元複合体の作成条件の検討により、腫瘍溶解性アデノウイルスポリマー加工による抗体の感染抑制解除には、室温で、ミキサーを用いた十分な攪拌条件下での加工が必要であることが明らかとなった。従来、ポリマー加工後のプラスミドあるいはウイルスに関しては、局所投与においては十分な抗腫瘍効果が認められるものの、静脈内投与においては投与後の急死が問題であったが、今回の検討により、これは、静置処理によるウイルスの凝集が原因であることが明らかとなった。この凝集は、ミキシングによる攪拌での加工により防ぐことができ、粒子径の小さい単一分子での加工が可能となり、安全に静脈投与が可能になるものと思われる。PEIとコンドロイチン硫酸によるポリマー加工に加えて、ヘパリンさらにはEGF等の成長因子による加工により感染性の改善が望めるのみならず、成長因子による腫瘍特異的感染性の向上も望める可能性が示唆され、今後、成長因子の選択が重要課題になってくるものを思われる。

今年度は引き続き、マウス in vivo 実験において、より高い抗腫瘍効果が得られる投与量および投与回数を検討し、前臨床試験における投与量を決定する。次にNPLが感染可能なCD46-Tg/IFNR-KOマウスに対

して、多元複合体投与の用量漸増試験を行い、NPL分布、臓器毒性、生存率等を評価する。さらに、マウスおよびカニクイザル (もしくはイヌ) に対する用量漸増試験を行い、毒性評価をGLP (Good laboratory practice) レベルで行う予定である。

E. 結論

NPL大量産生ならびに精製方法について詳細な条件検討実験を行い、液体クロマトグラフィーを用いた精製法により、安定かつ高純度のNPL産生系を確立することができた。あわせてKU-MCPC内においてGMPレベルでCS-MV (3 layer : NPL/PEI/CS) を大量生産できる環境を整備することができた。さらにin vitroならびにin vivoマウス実験系にて、NPL/PEI/CSの高い抗腫瘍効果及び同麻疹ウイルス中和抗体回避能を明らかにすることができた。アデノウイルスを用いた検討で、感染力向上には室温、ミキシング処理でのポリマー加工が適していることが確認できた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

1. Yokota, Y., Inoue, H., Matsumura, Y., Nabeta, H., Narusawa, M., Watanabe, A., Sakamoto, C., Hijikata, Y., Iga-Murahashi, M., Takayama, K., Sasaki, F., Nakanishi, Y., Yokomizo, T., Tani, K. Absence of LTB4/BLT1 axis facilitates generation of mouse GM-CSF-induced long-lasting antitumor immunological memory by enhancing innate and adaptive immune systems. *Blood* 120:3444-3543, 2012.
2. 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. Coxsackievirus B3 is an oncolytic virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 72:2609-2621, 2012.
3. Mizuochi, C., Hirio, Y., Blasch, K., Kikushige, Y., Tani, K., Akashi, K., Taviani, M., Sugiyama, D. Intra-aortic clusters undergo endothelial to hematopoietic phenotypic changes in early embryogenesis. *PLoS ONE* 7:e35763, 2012.
4. 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.* 2:1-10, 2012.
5. 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* 57:2031-2037, 2012.
6. Nunomura, S., Shimada, S., Kametani, Y., Yamada, Y., Yoshioka, M., Suemizu, H., Ozawa, M., Itoh, T., Kono, A., Suzuki, R., Tani, K., Ando, K., Yagita, H., Ra, C., Habu, S., Satake, M., Sasaki, E. Double expression of CD34 and CD117 on bone marrow

progenitors is a hallmark of the development of functional mast cell of *Callithrix jacchus* (common marmoset). *Int Immunol.* 24:593-603, 2012.

7. 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
8. 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
9. Hiwasa, K., Nagaya, H., Terao, S., Acharya, B., Hamada, K., Mizuguchi, H. and Gotoh, A. Improved gene transfer into bladder cancer cells using adenovirus vector containing RGD motif. *Anticancer research* 32:3137-3140, 2012
10. Hiramoto, T., Ebihara, Y., Mizoguchi, Y., Nakamura, K., Yamauchi, K., Ueno, K., Nariai, N., Mochizuki, S., Yamamoto, S., Nagasaki, M., Furukawa, Y., Tani, K., Nakauchi, H., Kobayashi, M., Tsuji, K. Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia patient-derived pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:3023-3028, 2013.
11. Liao, J., Marumoto, T., Yamaguchi, S., Okano, S., Takeda, N., Sakamoto, C., Kawano, H., Nii, T., Miyamoto, S., Nagai, Y., Okada, M., Inoue, H., Kawahara, K., Suzuki, A., Miura, Y., Tani, K. Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells. *Mol Ther* 2013 (in press)
12. Kurita, R., Suda, N., Sudo, K., Miharada, K., Hiroyama, T., Miyoshi, H., Tani, K., Nakamura, Y. Establishment of immortalized human erythroid progenitor cell lines able to produce enucleated red blood cells. *PLoS ONE* 2013 (in press)

2. 学会発表

1. Murahashi M, Hijikata Y, Tanaka Y, Inoue H, Marumoto T, Nakanishi Y, Yoshida K, Tsunoda Nakamura, Y, Tani K. Phase I clinical trial of cancer vaccine combined with chemotherapy targeting both tumor antigen and immune tolerance against advanced solid tumors. 37th ESMO Congress, September 2012, Vienna, Austria
2. 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 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. American Society of Hematology, 53th Annual Meeting, San Diego, 2011.
3. 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 and Kenzaburo Tani. Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells. American Society of Hematology, 53th Annual Meeting, San Diego, 2011.
4. Hiroyuki Inoue, Yasuki Hijikata, Keisuke Yasunari, Akira Sakamoto, Shohei Miyamoto, Kaname Nosaki,

Yumiko Matsumura, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered oncolytic Edmonston strain of measles virus harboring the wild-type *M, P, L* Genes (MV-NPL) effectively target lung cancer stem cells. American Association of Cancer Research, 103th Annual Meeting, Chicago, 2012

5. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Beibei Wang, Keisuke Yasunari, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Tomotoshi Marumoto, Atsushi Takahashi, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Coxsackievirus B3 is an immunostimulatory oncolytic virus active against lung adenocarcinoma. American Association of Cancer Research, 103th Annual Meeting, Chicago, 2012
6. Keisuke Yasunari, Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Beibei Wang, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Oncolytic Echovirus 4 as a potent virotherapy agent against human esophageal squamous cell carcinoma. American Society of Gene and Cell Therapy, 15th Annual Meeting, Philadelphia, 2012.
7. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Akira Sakamoto, Shohei Miyamoto, Kaname Nosaki, Yumiko Matsumura, Takafumi Nakamura, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered Measles virus Edmonston strain expressing the wild-type *M, P, L* Genes (MV-NPL) is a promising oncolytic virotherapy agent against lung cancer stem cells. American Society of Gene and Cell Therapy, 15th Annual Meeting, Philadelphia, 2012.
8. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Yumiko Matsumura, Shohei Miyamoto, Kaname Nosaki, Akira Sakamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered oncolytic measles virus lyses non-small cell lung cancer stem cells *in vitro* and *in vivo*. Asian Pacific Lung Cancer Conference, 5th Annual Meeting, Fukuoka, 2012.
9. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Yumiko Matsumura, Shohei Miyamoto, Akira Sakamoto, Kaname Nosaki, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered oncolytic measles virus effectively targets and kills non-small cell lung cancer stem cells. Asian Pacific Society of Respiriology, 17th Annual Meeting, Hong Kong, 2012.
10. Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Coxsackievirus B3 (CVB3) as a Novel Oncolytic Virotherapy Agent against Non Small Cell Lung Cancer. 第52回日本肺癌学会総会, 大阪, 2011
11. Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Meiko Yamada, Takafumi Nakamura, Nosaki Kaname, Urata Yasuo, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Coxsackievirus B3 is an Oncolytic Virus Active Against Non-Small Cell Lung Cancer, 第52回日本呼吸器学会学術講演会, 神戸, 2012
12. Hiroyuki Inoue, Akira Sakamoto, Keisuke Yasunari, Shohei Miyamoto, Yumiko Matsumura, Kaname Nosaki, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Novel engineered oncolytic Edmonston strain of measles virus elicits remarkable oncolytic activity against non-small cell lung cancer stem cells. 第18回日本遺伝子治療学会, 熊本, 2012
13. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Beibei Wang, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi

- Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Cocksackievirus B3 is an immunostimulatory oncolytic virus active against lung adenocarcinoma. 第18回日本遺伝子治療学会, 熊本, 2012
14. Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Beibei Wang, Keisuke Yasunari, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. 非小細胞肺癌に対するコクサッキーウイルス B3 を用いた新規腫瘍溶解性ウイルス療法, 第28回日本DDS学会学術集会, 札幌, 2012
15. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Yosuke Yokota, Ayumi Watanabe, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. TLR7 ligand Imiquimod enhances GM-CSF-induced immunological antitumor effect. 第4回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会, 金沢, 2012
16. Ayumi Wanatabe, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Keisuke Okita, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Shinya Yamanaka and Kenzaburo Tani. Novel cancer immunotherapy using induced pluripotent stem cells genetically engineered to produce GM-CSF. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012
17. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Ayumi Watanabe, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Plasmacytoid DCs are involved in an antitumor immunity induced by GM-CSF gene-transduced tumor cells. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012
18. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Shohei Miyamoto, Yumiko Matsumura, Kaname Nosaki, Akira Sakamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Novel engineered oncolytic measles virus shows oncolytic activity against non-small cell lung cancer stem cells. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012
19. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Beibei Wang, Keisuke Yasunari, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Immunostimulatory coxsackievirus B3 as a potent oncolytic agent against non-small cell lung carcinoma. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012
20. Hiroyuki Inoue, Oncolytic virotherapy using novel RNA viruses. 第18回日本遺伝子治療学会, 熊本, 2012
21. Hamada, K., Yoshihara, C., Ito, T., Koyama, Y., Itoh, H., Takagi, K., Nawa, A. Gene therapy of chondroitin sulfate-coated ternary GM-CSF plasmid complex for ovarian cancer. American Society of Gene & Cell Therapy 15th Annual Meeting. Philadelphia, Pennsylvania May 15, 2012 - May 19, 2012.
22. 濱田雄行、高木香津子、芳原智恵子、小山義之、那波明宏. ポリマー多重加工処理によるオンコリティックアデノウイルスの免疫原性克服と抗腫瘍効果の検討. 第71回日本癌学会, 2012年9月19-21日、札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
 - 整理番号 QP120013
 - 国際特許分類 A61K 35/76
 - 発明の名称： 新規腫瘍溶解性ウイルス
 - 代表発明者 井上博之
 - 発明者 宮本将平、安成啓祐、谷憲三朗
 - 出願日： 2012-04-19
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

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 憲三朗 九州大学ゲノム病態学分野 教授

研究要旨

現行の腫瘍溶解性ウイルス療法では接種後に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、新規技術の導入が求められている。我々が開発したMV-NPL株（以後、NPLと略）は、インターフェロン抵抗性獲得によ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 Ther18:544-551,2010）、新規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、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（CS-MV）療法を開発し、その第I相臨床研究実施を目指す。平成24年度は、NPL大量産生ならびに精製方法について詳細な条件検討実験を行い、液体クロマトグラフィーを用いた精製法により安定かつ高純度のNPL産生系を確立した。合わせて九州大学病院分子・細胞調整センター（KU-MCPC）内においてGMP（Good manufacturing practice）レベルでCS-MVを大量生産できる環境を整備した。さらに、in vitroならびにin vivoマウス実験系において、CS-MVの高い抗腫瘍効果及び同麻疹ウイルス中和抗体回避能を明らかにした。

分担研究者

谷憲三朗 九州大学生体防御医学研究所・教授

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（OpenVirolJ4:103-108,2010）。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（以後、NPLと略）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 Ther18:544-551,2010）、新規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（ウイルスにPEI（ポリエチレンイミン：カチオンポリマー）及びCS（コンドロイチン硫酸：アニオンポリ

マー）を交互に付加し多重ポリマー層化する）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

5ヶ年研究計画概要

平成23～25年度前半には、先ず非GMP（Good manufacturing practice）レベルでCS-MV製剤を作製し、in vitroでの腫瘍溶解性および各種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CS-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）内においてGMP準拠CS-MV製剤の生産の準備を行う。平成25・26年度はCS-MV製剤をKU-MCPC内においてGMP準拠にて生産する。次に本GMP製剤を用いた前臨床試験として、マウスおよび適切な大型動物種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。平成26・27年度は上記結果をもとに、CS-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。

平成 24 年度 研究方法

(1) NPL 大量生産条件検討

① 温度、回収時期の検討

NPL 増殖に最適な培養温度と回収時間を検討するため、37°Cもしくは32°Cに設定したインキュベータにて Vero 細胞感染による NPL 増殖実験を行い、経時的に細胞ならびに培養上清液を回収した。培養は無血清培養液を用いて行い、37°Cでは DMEM を、32°Cでは VP-SFM (インビトロジェン社) を使用した。回収した細胞ならびに培養上清中 NPL の定量は Vero 細胞を用いた TCID₅₀ 法にて行った。

② NPL 回収方法の検討

無血清培養液/32°C培養系において、適切な NPL 回収方法を検討するため、A法(上清中に出現した NPL を回収)と B 法(細胞内で増殖した NPL を回収)との間で比較検討を行った。NPL 回収時期は上記①実験において、最も効率よく NPL を回収できる時期を採用した。上清中 NPL の回収は、1日1回の培養液交換の際に培養上清を回収することで行った。

(2) NPL 精製条件の検討

① NPL 精製用カラムの検討

単純ヘルペスウイルス (PLoS One 8(2):e57224, 2013)、エンテロウイルス 71 (PLoS One 7(4):e34834, 2012)、アデノ随伴ウイルス (Hum Gene Ther 22(5):595-604, 2011) など他ウイルスの精製で用いられている液体クロマトグラフィー法を検討した。ゲル濾過カラム (HiPrep Sephacryl S-300 HR)、陰イオン交換カラム (Poros (R) HQ)、陽イオン交換カラム (HiTrap SP XL) を用いて、NPL を分離し、NPL 回収率 (%) 及び純度を比較検討した。NPL 量の定量は、上記と同様に Vero 細胞を用いて TCID₅₀ 法により行った。NPL 純度の評価は、SDS-PAGE 法を用いて行った。

② 陰イオン交換カラム使用緩衝液組成、pH 及び塩濃度の検討

陰イオン交換カラムによる NPL の精製時における至適緩衝液条件を検討するため、各種緩衝液(トリス、ピストリス、ピストリスプロパンおよびリン酸緩衝液)、pH (pH5.5-8.5) 塩濃度 (0-2.0 M) 下に NPL 分離を行い回収率を比較検討した。NPL 定量は TCID₅₀ 法にて行った。

③ 回収率、純度の評価

液体クロマトグラフィー法によるウイルス精製前後で NPL 回収率及び純度の評価を行った。NPL 回収率は、各 NPL 液に含まれる NPL の定量 (TCID₅₀ 法) により評価した。純度の評価は、タンパク質定量 (BCA assay) および SDS-PAGE 法にて行った。

(3) NPL への PEI、CS 付加によるウイルスポリマー多元複合体の作成

多元複合体の作成は、陽イオンポリマーの PEI に引き続き、陰イオンポリマーの CS を順次付加することで行った。NPL 表面の各ポリマーによる修飾の確認は、Zetasizer を用いた NPL 表面電荷の変化を確認することにより行った。

① 電子顕微鏡撮影

上記実験と同様、多元複合体の電子顕微鏡観察は酢酸ウラン溶液を用いた負染色後、九州大学生体防御医学研究所内の透過型顕微鏡 (TEM) を用いて行った。

② 多元複合体の in vitro 抗腫瘍効果の検討

実験 1: 1-5 layer の各多元複合体を作成した。ター

ゲット癌細胞として A549 ヒト肺癌細胞を用い、各多元複合体感染による殺細胞効果の評価は、Crystal Violet 法にて行った。

実験 2: 抗麻疹ウイルス中和抗体存在下での殺細胞効果の評価は、実験 1 で殺細胞効果の高い 1 layer (NPL)、2 layer (NPL-PEI)、3 layer (NPL/PEI/CS) を用いて行った。抗麻疹ウイルス中和抗体を含有するヒト免疫グロブリン製剤希釈液下に、各多元複合体による A549 細胞に対する殺細胞効果を Crystal Violet 法により比較定量した。

(4) 多元複合体の担癌マウスモデルにおける in vivo 抗腫瘍効果の検討

① 麻疹ウイルス非免疫同系担癌マウスモデルでの抗腫瘍効果の検討

野生型 C57BL/6N マウス (メス、6 週齢) に昨年度樹立した LLC/CD46 細胞を皮下接種 (右側腹部) し、3-5 mm の腫瘍形成が認められた時点で、A. コントロール液 (トリス緩衝液のみ)、B. NPL 液 (1 layer: 2.5x10⁵TCID₅₀/dose トリス緩衝液にて希釈)、C. 上記実験で決定した多元複合体液 (3 layer: 2.5x10⁵TCID₅₀/dose トリス緩衝液にて希釈) を各群 5 匹ずつ腫瘍内単回投与し、週 3 回腫瘍径の経時的測定を行った。

② 多元複合体投与間隔の検討

野生型 C57BL/6N マウス (メス、6 週齢) に LLC/CD46 細胞を皮下接種し、3-5mm の腫瘍形成が認められた時点より、NPL 液 (1 layer: 5x10⁵ TCID₅₀/dose)、多元複合体液 (3 layer: 5x10⁵ TCID₅₀/dose) を各群 2 匹ずつ 1 日 2 回 3 日間もしくは 1 日 1 回 6 日間腫瘍内投与した。上記実験同様、週 3 回腫瘍径の測定を行った。

③ 麻疹ウイルス既免疫同系担癌マウスモデルでの抗腫瘍効果の検討

NPL 液 1x10⁶ TCID₅₀ を野生型 C57BL/6N マウス (メス、6 週齢) 腹腔内に投与し、麻疹ウイルス既免疫マウスモデルを確立した。NPL 液接種後 21 日目にマウス血清中に抗麻疹ウイルス中和抗体が十分に誘導されたことを確認後、LLC/CD46 細胞を皮下接種し、3-5 mm の腫瘍形成が認められた時点で、上記と同様に、A. NPL 液 (1 layer: 2.5x10⁵TCID₅₀/dose)、B. 多元複合体液 (3 layer: 2.5x10⁵TCID₅₀/dose) を各群 3 匹ずつに対して計 6 日間 1 日 1 回腫瘍内投与し、週 3 回腫瘍径を計測した。

(5) CD46-Tg/IFNR-KO マウス (麻疹ウイルス感染マウス) の作製

in vivo マウスモデルにおける多元複合体投与の安全性を評価するために、麻疹ウイルス感染可能マウスが必要である。麻疹ウイルス受容体ヒト CD46 を発現し、I 型インターフェロン (IFN) 受容体を欠失させることで麻疹ウイルス感受性を獲得した遺伝子二重改変マウスの作出を開始した。すなわち、ヒト CD46 トランスジェニック (CD46-Tg) マウスと I 型 IFN 受容体 (IFNR) ノックアウト (KO) マウスを交配し作製したヘテロマウス (CD46-Tg/IFNR^{+/+}) とさらに IFNR-KO マウスを交配することで CD46-Tg/IFNR-KO マウスを作出する予定である。

C. 研究結果

平成 23 年度研究結果

(1) ヒト固形癌細胞全 28 株が、遺伝子改変麻疹ウイルス (NPL) 受容体 CD46 を高発現し、NPL 感染にて高い殺細胞効果を示すことを確認した。投与安全性を鑑

み、臨床試験対象癌種は先ず頭頸部癌とした。

(2) ウイルス精製法は限外濾過法を採用した。

(3) コンドロイチン硫酸 (CS)、ポリエチレンジアミン (PEI) と NPL の各表面電荷の違い (各陰性、陽性、陰性) による多元複合体の作製は、順次付加により結合させ、電荷の推移は Zetasizer にて確認した。

(4) レンチウイルスを用いた遺伝子導入法によりヒト CD46 発現マウス肺癌細胞株を樹立し、そのヒト CD46 高発現、および NPL 感染による腫瘍溶解性獲得を確認した。

(5) 野生型マウスにおいて腹腔内投与による NPL 感染実験を行い、抗麻疹ウイルス中和抗体産生誘導を確認し、麻疹ウイルス免疫回避のための in vivo マウス実験系への利用可能性が判明した。

平成 24 年度 研究結果

(1) NPL 大量生産条件検討

無血清培養液を用いた NPL 大量産生系構築のため以下の条件による比較検討を行った。

- ① 感染時に使用した NPL 量に対し最大 NPL 回収量は、32°C 培養系で 37 倍 (細胞内 NPL) と 1.4 倍 (上清中 NPL)、37°C 培養系で 1.9 倍 (細胞内 NPL) と 0.34 倍 (上清中 NPL) であった (図 1)。以上の結果より、無血清培養液を使用した NPL 産生系において、32°C を至適温度として決定した。

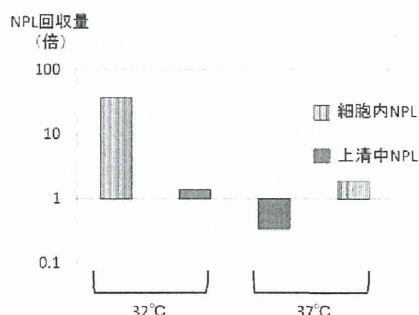


図 1 培養温度による細胞内および上清中 NPL 回収量の比較

② 32°C 培養における A 法 (上清中 NPL 回収) と B 法 (細胞内 NPL 回収) の比較において、回収した NPL 総量は、2 回の実験において A 法で B 法の 5.8 倍、6.5 倍であった (図 2)。

実験①、②の結果より、無血清培養液使用、培養温度 32°C、培養上清中からのウイルス回収の各条件を NPL 大量生産のための至適条件と決定した。

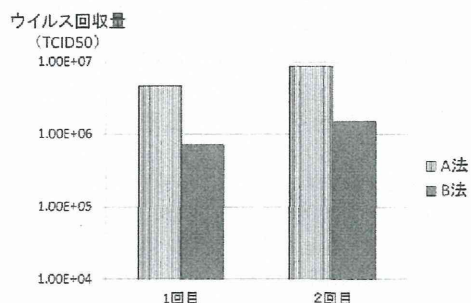


図 2 回収方法による NPL 回収量の比較検討 (A 法: 上清中 NPL 回収、B 法: 細胞内 NPL 回収)

(2) NPL 精製条件検討ゲル過ラムにおける NPL 分離実験では、NPL 回収率は 14% であったが、SDS-PAGE 法による評価にて、NPL 純度の上昇は得られなかった。そこで、陰イオン交換カラムによる NPL 分離実験を施行し、緩衝液塩濃度、pH の詳細な条件検討の結果、27.1%、33.3% の回収率が得られ (図 3、図 4)、SDS-PAGE 法による評価においても、検知バンド数減少による明らかな NPL 純度の上昇が確認された (図 5)。一方、陽イオン交換カラムにおける NPL 分離では、NPL 回収率は検出限界以下であった。以上の結果より、NPL 精製の液体クロマトグラフィー法に使用する至適カラムとして陰イオン交換カラムを選択した。オン交換カラムを用いた分離により得られた精製 NPL は、BCA assay により測定したタンパク質量により精製前後で 99.8% 以上の夾雑タンパク質が取り除かれたことを確認した (図 6)。同様に SDS-PAGE 法においても、夾雑タンパク質が取り除かれたことを確認できた。

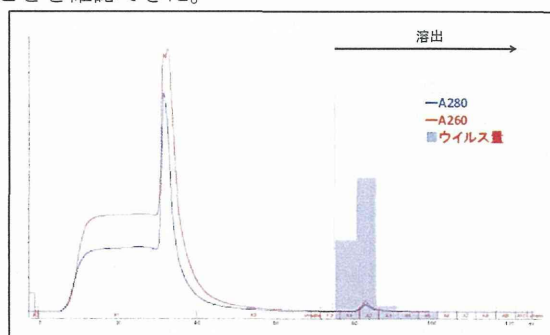


図 3 陰イオン交換カラム法を用いた NPL 分離結果

	液量 (mL)	ウイルス力価 (TCID50/mL)	ウイルス量 (TCID50)	回収率 (%)
精製前①	20	3.54×10 ⁵	7.08×10 ⁶	100
精製後①	40	4.73×10 ⁴	1.92×10 ⁶	27.1
	47	6.3×10 ⁷		
精製前②	450	2.66×10 ⁵	1.12×10 ⁸	100
精製後②	15	2.66×10 ⁶	3.99×10 ⁷	33.3

図 4 陰イオン交換カラムを用いた NPL 精製結果と回収率

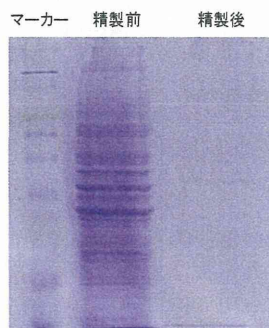


図 5 精製前後 NPL サンプルの SDS-PAGE 法による純度の比較検討

	液量 (mL)	タンパク濃度 (μg/mL)	タンパク量比
精製前	25	3804	100
精製後	5	検出限界以下 (<20)	<0.105

図6
精製前後のNPLタンパク量の比較検討

(3) NPLへのPEI、CS付加によるウイルス・ポリマー多元複合体の作成

表面電荷が陰性であるNPLに陽イオンポリマーであるPEIを付加することで(静電引力によるイオン結合を利用)、NPL/PEI複合体(2 layer)を作成した。付加するPEI量が漸増するに伴い、複合体の表面電荷の上昇を認めた(PEI約4 μgで陽転化し、20 μg以上で30 ~ 40 mVプラトー化)。続いて、陰イオンポリマーであるCSを付加することで、NPL/PEI/CS複合体(3 layer)を作成した。付加するCS量が増加するに従い、複合体の表面電荷は再度低下した(CS約5 μgで陰転化し、20 μg以上で-30 ~ -40 mVでプラトー化)(図7)。引き続き、PEIの付加にてNPL/PEI/CS/PEI複合体(4 layer)、さらにCSを付加することでNPL/PEI/CS/PEI/CS複合体(5 layer)を作成した。

NPL(1 layer)及びNPL/PEI/CS(3 layer)の粒子径サイズ分布を比較した結果、粒子径ピークが100 nm程度(1 layer)から150 nm程度(3 layer)に軽度の増加を認めた(図8)。

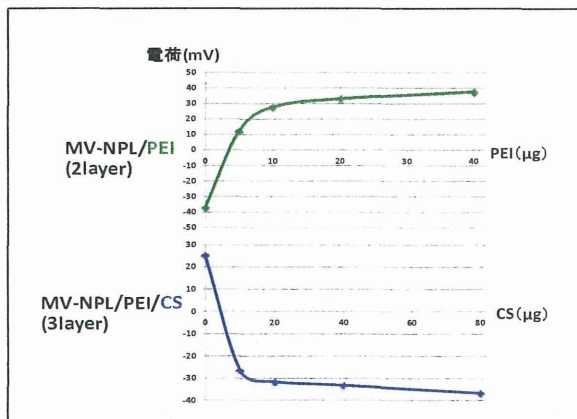


図7
ポリマー付加による表面電荷変化の検討

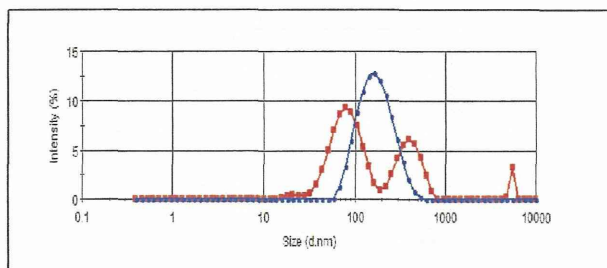


図8
多元複合体(1 layer、3 layer)のサイズ変化

①電子顕微鏡撮影

負染色法後のTEM観察にて、3 layerにおいて、1 layerでは見られないNPL粒子周囲のリング状不染領域が認められ、ポリマー付加によるNPL表面の修飾が確認された(図9)

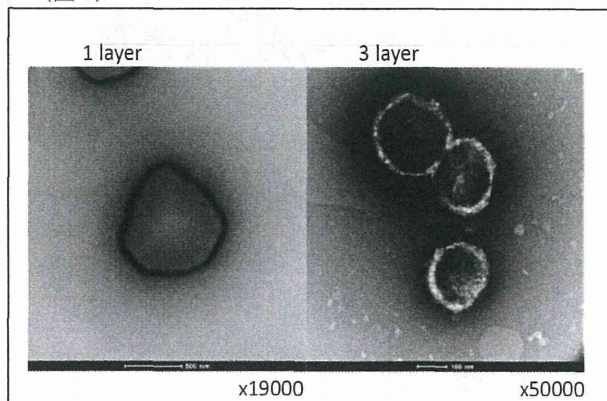


図9
多元複合体(1 layer、3 layer)の電子顕微鏡像

②多元複合体のin vitro抗腫瘍効果の検討

実験1: 作成した多元複合体のin vitroにおけるA549細胞に対する殺細胞効果は、1-3 layerまでは同程度であったが、4 layer以降で、急激に低下することを確認した(図10)。

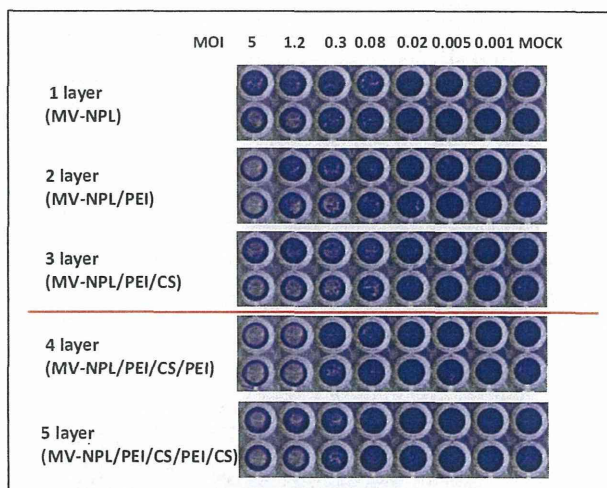


図10
多元複合体(1 layer、3 layer)の肺癌細胞に対する殺細胞効果の比較検討

実験2: 実験1で殺細胞効果が保たれていた各1、2、3 layerを用いて以下の実験を施行した。抗麻疹ウイルス中和抗体なし、もしくは存在下の条件で行ったA549細胞に対する殺細胞効果を比較検討した結果、中和抗体の有無に関わらず、3 layerで最も高い殺細胞効果が確認された。また、多元複合体作成時に使用するポリマーのみによるA549細胞への細胞傷害性を確認したところ、3 layer作成時に使用するPEI/CSのみでは、細胞傷害性は軽微であったことから、3 layerの殺細胞効果増強はポリマーによる直接的効果ではなく、抗麻疹ウイルス中和抗体からの回避による効果と類推された(図11、図12)。

中和抗体なし

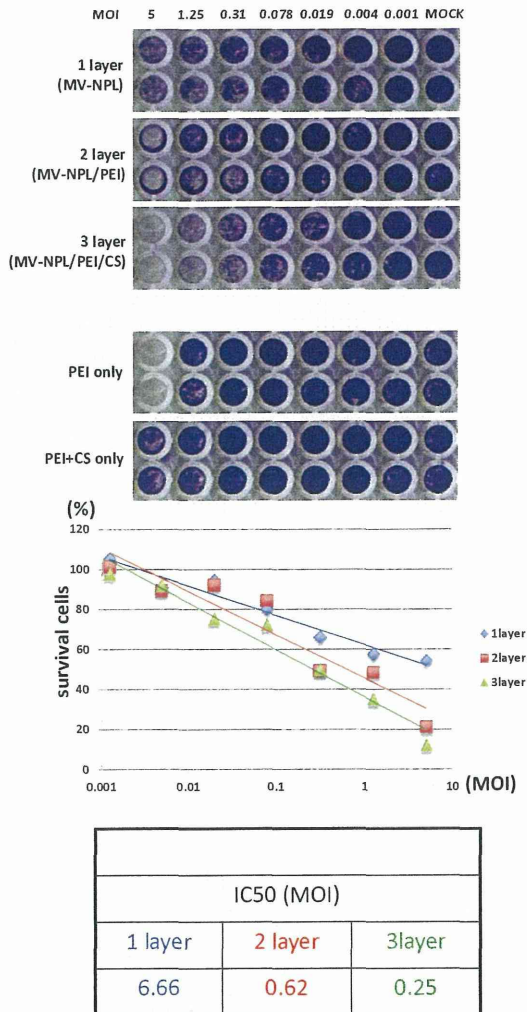
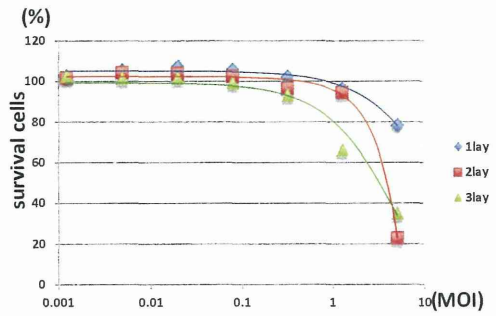
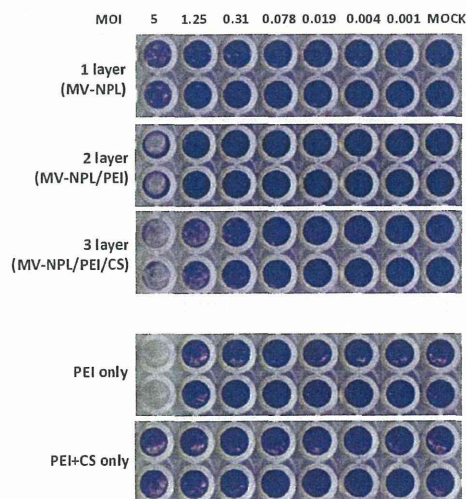


図 11 多元複合体 (1 layer、3 layer) の肺癌細胞株に対する殺細胞効果の比較検討 (中和抗体非存在下)

中和抗体存在下



IC50 (MOI)		
1 layer	2 layer	3 layer
12.38	4.02	3.18

図 12

多元複合体 (1 layer、3 layer) の肺癌細胞株に対する殺細胞効果の比較検討 (中和抗体存在下)

以上の結果より、以後の in vivo マウス実験では、十分な抗腫瘍効果を保持し抗麻疹ウイルス中和回避可能な多元複合体として 3 layer を使用することとした。

(4) 多元複合体の担癌マウスモデルにおける in vivo 抗腫瘍効果の検討

①麻疹ウイルス非免疫同系担癌マウスモデルでの抗腫瘍効果の検討

A (コントロール)、B (NPL 液: 1 layer 2.5×10^5 TCID₅₀)、C (多元複合液: 3 layer 2.5×10^5 TCID₅₀) を単回腫瘍内投与した後 (day1)、各マウスグループにおける腫瘍容積 (mm³) を比較測定した結果、C 投与群において、最も高い腫瘍形成抑制効果が確認された (図 13)。上記と同様の条件で A 投与群と C 投与群を比較した別実験において生存期間を検討した結果 (Kaplan-Meier Curve)、A 投与群と比較し C 投与群において有意な生存率の改善が認められた (p<0.05) (図 14)

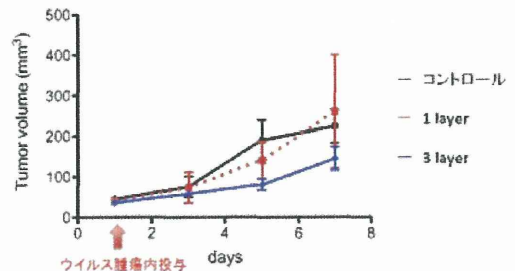


図 13 in vivo モデルにおける多元複合体の腫瘍増大抑制効果の比較 (中和抗体非存在下)

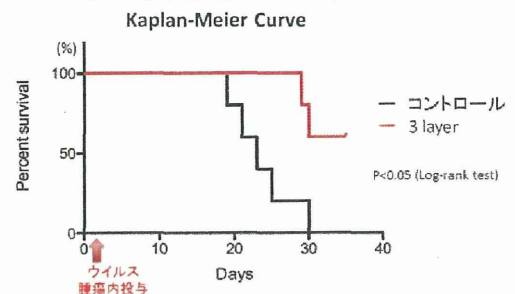


図 14 多元複合体 (3 layer) の生存期間延長効果の比較 (中和抗体非存在下)

②多元複合体投与間隔の検討

上記実験(単回投与)では、その後腫瘍の再増大が確認されたため、治療効果を高める目的で合計6回までNPL液(1 layer)あるいは多元複合体液(3 layer)の反復腫瘍内投与を行った。投与間隔を1日1回投与と1日2回投与で比較するとNPL液では投与間隔による腫瘍形成抑制効果の差は見られなかったが、多元複合体液の投与マウス群間では1日1回投与でより高い腫瘍形成抑制効果が確認された(図15)

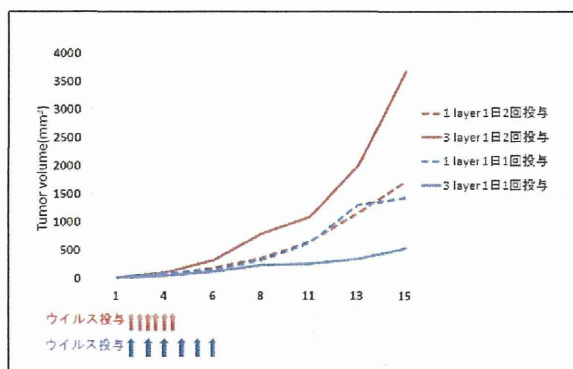


図15 多元複合体最適投与間隔の検討(中和抗体非存在下)

③麻疹ウイルス既免疫同系担癌マウスモデルでの抗腫瘍効果の検討

麻疹ウイルス既免疫(抗麻疹ウイルス中和抗体存在)状態でのin vivo抗腫瘍効果を検討するため、NPL液の前投与により抗麻疹ウイルス中和抗体を誘導した野生型マウスに対して、NPL液(1 layer)あるいは多元複合体液(3 layer)を計6回反復腫瘍内投与した。3 layerにてより高い腫瘍形成抑制効果が確認された(図16)。

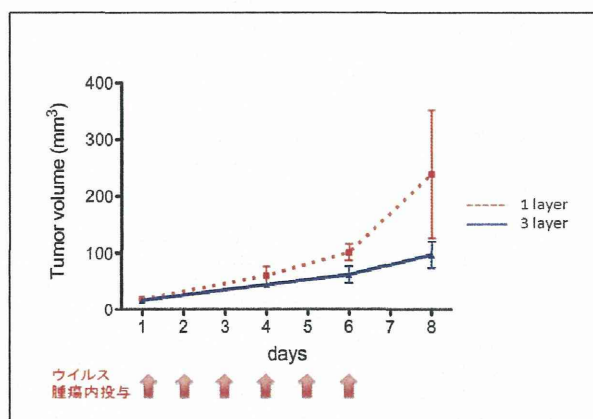


図16 多元複合体の腫瘍増大抑制効果(中和抗体存在下)

(5) CD46-Tg/IFNR-KOマウスの作製

本来ヒト(サル)でしか感染しない麻疹ウイルスに感染する性質を付与するため、ヒトCD46トランスジェニック(Tg)IFNRノックアウト(KO)ダブル改変マウスの作製を進めた。

CD46-Tgマウスを北海道大学大学院医学研究科免疫学分野・瀬谷司教授より供与いただいた。また、IFNR-KOマウスを米国ジャクソンラボラトリーより購入し、九州

大学発生工学室にて体外受精を行い、IFNR^{-/-}マウスを得た。現在IFNR^{-/-}マウス同士を交配し、KOマウスの作製を進めている。今後CD46-TgマウスとIFNR-KOマウスを交配し、目的のCD46-Tg/IFNR-KOマウスを作出し、本遺伝子改変マウスに本製剤を投与し、感染部位、臓器毒性、生存率等を検討する計画である。

D. 考察

NPL大量産生系構築に向け、詳細な条件検討を行い、①無血清培養液を使用する、②培養温度は32℃とする、③上清中のNPLを回収して精製に用いる、の各条件を決定し、大量かつ安定的にNPLを得ることが概ね可能となった。当初、米国Mayo ClinicにおいてGalanisらにより実施された臨床試験結果の報告(Cancer Res 70(3): 875-872, Methods Mol Biol 737: 345-366)を参考に、本試験で用いられた限外濾過によるNPL精製法を採用し、準備を進めたが、高純度NPLを得ることが困難であった。そこで代替方法として液体クロマトグラフィーによるNPL精製法を検討した。検討したカラムのうち、陰イオン交換カラムを用いたNPL精製法により、30%前後のNPL回収率と高純度産物(99.8%以上の夾雑タンパクを除去可能)を得ることができた。現在使用中の機器(AKTA explorer)から円滑なスケールアップが可能な機器(AKTA pilot)を昨年度既に購入済みであり、KU-MCPCでのNPL製剤製造の準備が整ったものと考えている。一般的に限外濾過法のみでの精製よりも、イオン交換クロマトグラフィーを併用した方が精製度は格段に高くなることは明らかであり、我々の方法がGalanisらの方法よりは優れているものと考えている。しかし、臨床応用を考えた場合には大量生産が必要となるため、単純に精製度を高めるだけではなく、ウイルス量を十分確保する必要がある。我々の今回開発した方法では、十分量のウイルスも確保可能であると考えられ、今後の臨床応用展開が期待できるものと考えている。

昨年度より引き続きNPL、PEI、CSによる多元複合体の作成ならびに加工条件、添加割合について検討を行い、ポリマー加工による変化を、①Zetasizerによる表面電荷の変化度、②Zetasizerによるサイズ分布の変化度、③透過型電子顕微鏡による負染色法によるNPL粒子周囲の不染域の発生、を確認することで判定した。In vitroにおいて作成した多元複合体のうち、3 layer(NPL/PEI/CS)がヒト肺癌細胞株(A549細胞)に対して、抗麻疹ウイルス中和抗体存在の有無に関わらず、最も高い殺細胞効果を持つことを確認した。また、担癌マウス実験においても抗麻疹ウイルス中和抗体の有無によらず、3 layer(NPL/PEI/CS)投与が、対照群となる1 layer(NPL)投与に対して、より高い抗腫瘍効果をもつことが確認できた。濱田らの報告においては、より多層の加工(13-15 layer)にて、抗ウイルス中和抗体存在条件下で最も高い抗腫瘍効果が確認されているが、今回の検討では、3 layerで最も高い抗腫瘍効果が確認された。この原因としては、使用しているウイルス(アデノウイルスと麻疹ウイルス)の構造(エンベロープの存在、表面ファイバーと糖タンパクの長さ)の違いが考えられた。

今年度は引き続き、マウスin vivo実験において、より高い抗腫瘍効果が得られる投与量および投与回数を検討し、前臨床試験における投与量を決定する。次にNPL

が感染可能な CD46-Tg/IFNR-KO マウスに対して、多元複合体投与の用量漸増試験を行い、NPL 分布、臓器毒性、生存率等を評価する。さらに、マウスおよび適切な大型動物種に対する用量漸増試験を行い、毒性評価を GLP (Good laboratory practice) レベルで行う予定である。

E. 結論

NPL 大量産生ならびに精製方法について詳細な条件検討実験を行い、液体クロマトグラフィーを用いた精製法により安定かつ高純度の NPL 産生系を確立することができた。あわせて KU-MCPC 内において GMP レベルで CS-MV (3 layer : NPL/PEI/CS) を大量生産できる環境を整備することができた。さらに、in vitro ならびに in vivo マウス実験系にて、NPL/PEI/CS の高い抗腫瘍効果及び同麻疹ウイルス中和抗体回避能を明らかにすることができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

1. Yokota, Y., Inoue, H., Matsumura, Y., Nabeta, H., Narusawa, M., Watanabe, A., Sakamoto, C., Hijikata, Y., Iga-Murahashi, M., Takayama, K., Sasaki, F., Nakanishi, Y., Yokomizo, T., Tani, K. Absence of LTB4/BLT1 axis facilitates generation of mouse GM-CSF-induced long-lasting antitumor immunological memory by enhancing innate and adaptive immune systems. *Blood* 120:3444-3543, 2012.
2. 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. Coxsackievirus B3 is an oncolytic virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 72:2609-2621, 2012.
3. 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* 7:e35763, 2012.
4. 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.* 2:1-10, 2012.
5. 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* 57:2031-2037, 2012.
6. Nunomura, S., Shimada, S., Kametani, Y., Yamada, Y., Yoshioka, M., Suemizu, H., Ozawa, M., Itoh, T., Kono, A., Suzuki, R., Tani, K., Ando, K., Yagita, H., Ra, C., Habu, S., Satake, M., Sasaki, E. Double expression of CD34 and CD117 on bone marrow progenitors is a hallmark of the development of functional mast cell of *Callithrix jacchus* (common marmoset). *Int Immunol.* 24:593-603, 2012.

7. Hiramoto, T., Ebihara, Y., Mizoguchi, Y., Nakamura, K., Yamauchi, K., Ueno, K., Nariai, N., Mochizuki, S., Yamamoto, S., Nagasaki, M., Furukawa, Y., Tani, K., Nakauchi, H., Kobayashi, M., Tsuji, K. Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia patient-derived pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:3023-3028, 2013.
8. Liao, J., Marumoto, T., Yamaguchi, S., Okano, S., Takeda, N., Sakamoto, C., Kawano, H., Nii, T., Miyamoto, S., Nagai, Y., Okada, M., Inoue, H., Kawahara, K., Suzuki, A., Miura, Y., Tani, K. Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells. *Mol Ther* 2013 (in press)
9. Kurita, R., Suda, N., Sudo, K., Miharada, K., Hiroshima, T., Miyoshi, H., Tani, K., Nakamura, Y. Establishment of immortalized human erythroid progenitor cell lines able to produce enucleated red blood cells. *PLoS ONE* 2013 (in press)

2. 学会発表

1. Murahashi M, Hijikata Y, Tanaka Y, Inoue H, Marumoto T, Nakanishi Y, Yoshida K, Tsunoda Nakamura, Y, Tani K. Phase I clinical trial of cancer vaccine combined with chemotherapy targeting both tumor antigen and immune tolerance against advanced solid tumors. 37th ESMO Congress, September 2012, Vienna, Austria
2. 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 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. American Society of Hematology, 53th Annual Meeting, San Diego, 2011.
3. Jiyuan Liao, Tomotoshi Marumoto, Shinji Okano, Saori Yamaguchi, Takenobu Nii, Hirota Kawano, Yoko Nagai, Chika Sakamoto, Michiyo Okada, Yoshie Miura, Hiroyuki Inoue, Masato Tanaka, Kaori Nagatoshi, Kohichi Kawahara, Akira Suzuki and Kenzaburo Tani, Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells. American Society of Hematology, 53th Annual Meeting, San Diego, 2011.
4. Hiroyuki Inoue, Yasuki Hijikata, Keisuke Yasunari, Akira Sakamoto, Shohei Miyamoto, Kaname Nosaki, Yumiko Matsumura, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered oncolytic Edmonston strain of measles virus harboring the wild-type *N*, *P*, *L* Genes (MV-NPL) effectively target lung cancer stem cells. American Association of Cancer Research, 103th Annual Meeting, Chicago, 2012
5. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Beibei Wang, Keisuke Yasunari, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Tomotoshi Marumoto, Atsushi Takahashi, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Coxsackievirus B3 is an immunostimulatory oncolytic virus active against lung adenocarcinoma. American Association of Cancer Research, 103th Annual Meeting, Chicago, 2012
6. Keisuke Yasunari, Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Beibei Wang, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Oncolytic Echovirus 4 as a potent virotherapy agent against human

esophageal

7. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Akira Sakamoto, Shohei Miyamoto, Kaname Nosaki, Yumiko Matsumura, Takafumi Nakamura, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered Measles virus Edmonston strain expressing the wild-type *N*, *P*, *L* Genes (MV-NPL) is a promising oncolytic virotherapy agent against lung cancer stem cells. American Society of Gene and Cell Therapy, 15th Annual Meeting, Philadelphia, 2012.
8. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Yumiko Matsumura, Shohei Miyamoto, Kaname Nosaki, Akira Sakamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered oncolytic measles virus lyses non-small cell lung cancer stem cells *in vitro* and *in vivo*. Asian Pacific Lung Cancer Conference, 5th Annual Meeting, Fukuoka, 2012.
9. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Yumiko Matsumura, Shohei Miyamoto, Akira Sakamoto, Kaname Nosaki, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered oncolytic measles virus effectively targets and kills non-small cell lung cancer stem cells. Asian Pacific Society of Respiratory, 17th Annual Meeting, Hong Kong, 2012.
10. Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Coxsackievirus B3 (CVB3) as a Novel Oncolytic Virotherapy Agent against Non Small Cell Lung Cancer. 第 52 回日本肺癌学会総会, 大阪, 2011
11. Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Meiko Yamada, Takafumi Nakamura, Nosaki Kaname, Urata Yasuo, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Coxsackievirus B3 is an Oncolytic Virus Active Against Non-Small Cell Lung Cancer, 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会, 神戸, 2012
12. Hiroyuki Inoue, Akira Sakamoto, Keisuke Yasunari, Shohei Miyamoto, Yumiko Matsumura, Kaname Nosaki, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Novel engineered oncolytic Edmonston strain of measles virus elicits remarkable oncolytic activity against non-small cell lung cancer stem cells. 第 18 回日本遺伝子治療学会, 熊本, 2012
13. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Beibei Wang, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Coxsackievirus B3 is an immunostimulatory oncolytic virus active against lung adenocarcinoma. 第 18 回日本遺伝子治療学会, 熊本, 2012
14. Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Beibei Wang, Keisuke Yasunari, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. 非小細胞肺癌に対するコクサッキーウイルス B3 を用いた新規腫瘍溶解性ウイルス療法, 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 札幌, 2012
15. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Yosuke Yokota, Ayumi Watanabe, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. TLR7 ligand Imiquimod enhances GM-CSF-induced immunological antitumor effect. 第 4 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会, 金沢, 2012
16. Ayumi Watanabe, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Keisuke Okita, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Shinya Yamanaka and Kenzaburo Tani. Novel cancer immunotherapy using induced pluripotent stem cells genetically engineered to produce GM-CSF. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012
17. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Ayumi Watanabe, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Plasmacytoid DCs are involved in an antitumor immunity induced by GM-CSF gene-transduced tumor cells. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012
18. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Shohei Miyamoto, Yumiko Matsumura, Kaname Nosaki, Akira Sakamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Novel engineered oncolytic measles virus shows oncolytic activity against non-small cell lung cancer stem cells. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012
19. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Beibei Wang, Keisuke Yasunari, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Immunostimulatory coxsackievirus B3 as a potent oncolytic agent against non-small cell lung carcinoma. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012
20. Hiroyuki Inoue, Oncolytic virotherapy using novel RNA viruses. 第 18 回日本遺伝子治療学会, 熊本, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
整理番号 QP120013
国際特許分類 A61K 35/76
発明の名称: 新規腫瘍溶解性ウイルス
代表発明者 井上博之
発明者 宮本将平、安成啓祐、谷憲三朗
出願日: 2012-04-19
2. 実用新案登録
該当
なし
3. その他
該当なし

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

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

遺伝子改変腫瘍溶解性麻疹ウイルス（MV-NPL）の製剤化を効率的に進めることを目的に、陽性コントロールとして腫瘍溶解性アデノウイルスに対するポリエチレンイミン（PEI）およびコンドロイチン硫酸によるポリマー加工方法について、抗アデノウイルス抗体存在下において実験を並行して行った。氷中の4℃に比べ室温の方が感染性が良好であったが、静置による加工では、走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡による検討により、ほとんどのウイルスが扁平に凝集していた。このため、ミキシング操作を加えると、この凝集が抑制できたが、巨大粒子の形成が起これ、これはPEIとコンドロイチン硫酸によるポリマー自体による凝集と思われた。ポリマー加工に際し、PEIの非常に強力な陽性荷電に比べ、生体由来物質であるコンドロイチン硫酸は陰性荷電が弱く、PEIの中和も不十分であった。このため、強力な陰性荷電を有するヘパリンを用いてさらに加工したところ、ウシ胎児血清（FCS）非存在下では感染性が改善したが、FCSを加えた場合、血清中の凝固因子への吸着によると思われる感染性の低下を認めた。このため、ヘパリンに対してさらに、腫瘍特異性を有する上皮成長因子（EGF）成長因子による加工により、FCS存在下、非存在下においても抗腫瘍効果が増大した。

A. 研究目的

従来、抗癌剤、分子標的治療薬等の開発が世界中で行われてきたが、著明な生存率の改善は未だ見られず、日本においては癌の死亡率は年々増加して30%となり、癌が死亡率の一番となっている。これは、高脂血症剤、高血圧薬の開発、メタボリック症候群改善等により、他の重要な死因疾患であった脳卒中、心疾患が、その死亡率の低下を見ていることと比較しても、その有効な治療薬の開発が、未だ癌治療において行われていないことに起因するものである。ウイルスを用いた遺伝子治療は、従来の手術、放射線、抗癌剤に取って代わる治療法として20年来研究が続けられてきたが、中和抗体産生による感染抑制が最大の障害となり、未だ有効な臨床試験成績が得られていない。ところが、PEIとコンドロイチン硫酸を用いた腫瘍溶解性アデノウイルスのポリマー加工において、抗体による感染抑制が回避でき、抗アデノウイルス細胞障害性リンパ球（CTL）誘導により根治的な抗腫瘍効果が得られることが明らかとなった。今回の研究において、さらに、電子顕微鏡による検討を加え、抗体存在下での抗腫瘍効果を高め、MV-NPLに対してもさらに強力に静脈内投与可能な根治的な癌治療薬を得るためにポリマー加工技術の改善を試みた。

B. 研究方法

ポリマー加工による腫瘍溶解性アデノウイルスの抗アデノウイルス中和抗体による感染抑制解除のため、PEIとコンドロイチン硫酸を用いて実験を行った。氷

中と室温での加工について比較検討を行い、その際、加工時間も検討した。これには、in vitroによる実験で、96 well plateを用い、抗アデノウイルス中和抗体を、液量にして培養液の10分の1程度加えて、A549細胞のアデノウイルス-LacZを用いたアデノウイルスの感染性の判定を行った。さらに、走査型電子顕微鏡的検討により、ポリマー加工の立体的な構造から検討を加えた。アデノウイルスに対するPEIおよびコンドロイチン硫酸加工後、感染性改善のため、ヘパリンナトリウムを加えて、その投与量、反応時間、静置とミキシングにおける加工条件について、抗アデノウイルス抗体存在下において、FCS非存在下と存在下において感染性を比較した。イスにおけるMV-NPLの毒性試験の可能性を検討するため、腫瘍溶解性アデノウイルスとの比較において、皮下投与における体内分布試験を行った。

（倫理面への配慮）

特になし

C. 研究結果

実験は、FCS非存在下、抗体存在下で3時間感染後、FCSを10%加えて、3日間の培養を行い、感染性を検討した。アデノウイルス単独では100%感染するものの、抗体存在下では、全く感染は認められなかった。アデノウイルスにPEI、コンドロイチン硫酸を加えることによりポリマー加工を行った。氷中における加工に比べ室温での加工は、30%感染性が改善した。静置時間を検討したところ、30分が最も良好な感染