

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

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できにくく、新規技術の導入が必要と考えられる。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、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(CS)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。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 1 相臨床研究実施を目指す。平成 24 年度から 25 年度にかけて、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。併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 レベルで CS-MV を大量生産できる環境を整備した。CS-MV が各種がん細胞に対し、抗麻疹ウイルス中和抗体存在の有無に関わらず、NPL よりも有意に高い殺細胞効果を持つことを *in vitro* および一部 *in vivo* 実験にて明らかにした。濱田らは、腫瘍溶解性アデノウイルス癌細胞感染時に走査型電子顕微鏡の検討、*in vitro* における抗体存在下での遺伝子発現実験を詳細に検討することにより、抗体存在下での抗腫瘍効果を高め、NPL に対してもさらに強力で静注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。さらに、本治療法の臨床試験開始のための安全性試験開始のために、麻疹ウイルスの感染性良好なビーグル犬を用いて腫瘍溶解性アデノウイルスの安全性試験を行い、本結果を参考に、マウスおよびカニクイザルを用いた用量漸増試験、毒性評価を GLP (Good laboratory practice) レベルで行う実験にも着手した。

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 (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 は型インターフェロンによりその増殖が抑えられ、反復投与による *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（ポリエチレンジアミン：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 1 相臨床研究実施を目指す。

B. 研究方法

平成 23～25 年度前半には、まず非 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 1 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 25～27 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 療法第相臨床研究実施に向けた Proof of concept を確立し、遺伝子治療研究実施計画書を作成する。可能であれば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、臨床研究実施に向けた諸検討を開始する。

平成 25 年度 研究方法

(1)培養細胞

HEp2 細胞（ヒト頭頸部癌細胞株）は国立感染症研究所清水博之先生より譲渡いただいた。Vero 細胞（アフリカミドリザル腎上皮細胞由来細胞株）、A549 細胞（ヒト肺癌細胞株）、MDA-MB-231 細胞（ヒト乳癌細胞株）は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。WiDr 細胞（ヒト大腸癌細胞株）は JCRB 細胞バンクより購入し、すべての細胞株は DMEM/10% Heat-inactivated fetal bovine serum 培養液を用いて培養を行った。NPL 受容体 CD46 発現は、PE 標識抗ヒト CD46 抗体で染色した各細胞を Flow cytometry 法にて比較定量した。

(2)ウイルスの増殖

in vitro 殺細胞効果ならびに in vivo 抗腫瘍効果の確認に用いる遺伝子改変麻疹ウイルス NPL は Vero 細胞を用いて増殖させ、細胞内ウイルスを凍結融解法にて回収した。ウイルス力価は Vero 細胞を用いた段階希釈法にて判定した。

(3)CS-MV の作製

PEI 及び CS の順次付加により作製した。電荷変移は、順次ゼータサイザー (Zetasizer) を用いて確認した。

(4)ヒト CD46 発現マウス肺癌細胞株 (LL/2-CD46) の作製

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。しかし現在、麻疹ウイルスに感染可能な細胞はヒトおよびサルであり、マウス由来細胞は、その感染受容体の発現が無いことより感染しない。正常免疫マウスにおいて本 CS-MV 剤の投与実験を行い、本剤の抗腫瘍効果と抗麻疹中和抗体に対する抵抗性を検討することは、サルでの前臨床試験実施およびヒトでの臨床試験を行う前に極めて重要であると考えられる。そこでヒト 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ベクターを作製した。作製したレンチウイルスベクターをマウス肺癌細胞株 LL/2 に感染させた後、1 ヶ月間培養・継代を繰り返し樹立した CD46 遺伝子導入 LL/2 細胞株を用いて、ヒト CD46 発現の確認ならびに NPL による殺細胞効果を確認した。

(5)CS-MV の中和抗体存在下 in vitro 殺細胞効果の確認

抗麻疹ウイルス中和抗体として、化血研より譲渡いただいた献血ベニロン R を使用した。献血ベニロン R 液の希釈液もしくは PBS を、あらかじめ 96 ウェルプレートに播種した培養細胞へ添加し、その後同量のウイルス段階希釈液を添加した。2~5 日間培養後、Crystal Violet (CV) 液にて染色した。生細胞率は、CV 染色された細胞を 1% SDS 液にて溶解し、各ウェルの OD570nm を測定することで測定した。

(6)CS-MV の担癌マウスモデルにおける in vivo 抗腫瘍効果の確認

免疫不全マウスモデルでの抗腫瘍効果の確認は、BALB/cSlc-nu/nu (ヌードマウスと以下略) に HEp2 細胞 (2×10^6 個細胞) A549 細胞 (3×10^6 個細胞) もしくは WiDr 細胞 (3×10^6 個細胞) を皮下接種し、3~5mm 径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 (2.5×10^5 TCID₅₀) および C. CS-MV 液 (2.5×10^5 TCID₅₀) を各群 6 匹ずつ週 1 回腫瘍内投与し、週 3 回腫瘍径の経時的測定を行った。野生型マウスモデル (抗麻疹ウイルス中和抗体存在下モデル) での抗腫瘍効果の検討は、ウイルス投与 3 週間前に NPL 液 (1×10^6 TCID₅₀) を皮下接種し、抗麻疹ウイルス中和抗体産生を誘導した。その後、C57BL/6N マウスに LL/2-CD46 細胞 (2×10^5 個細胞) を皮下接種し、3~5 mm の腫瘍形成が認められた時点で、上記免疫不全マウスモデルと同様に A. B. C 各群 9 匹に振り分け、週 1 回の腫瘍内投与を行い、週 3 回の経時的腫瘍径測定を行った。抗腫瘍免疫誘導 (補体依存性細胞障害; CDC) の確認は、CDC assay 法を用いて行った (Sci Transl Med 5; 185ra63, 2013)。各ウイルス液の腫瘍内投与を行った野生型マウスより投与 2 週間後に採血を行い (各群 5 匹)、血清を採取した。LL/2-CD46 細胞浮遊液と 4 倍希釈した血清を共培養した後の細胞生存率を比較定量した。細胞生存率の評価は MTS assay 法を用いて行った。

(7)ポリマー加工腫瘍溶解アデノウイルス系での中和抗体解除法の基礎的検討

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。in vitro による実験で、24 ウェルプレートを用い、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 gal 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加工方法の検討を加えた。アデノウイルスに対する PEI および CS 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、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、感染性の改善を試みた。大動物を用いた NPL の前臨床試験実施を最終目的に、その参考として、腫瘍溶解性アデノウイルスを用いてビーグル犬に対し皮下投与を行う、安全性試験および体内分布試験を行っ

た。さらに NPL の前臨床有効性試験の実施を念頭に、扁平上皮癌担癌ウサギを用いて腫瘍溶解性アデノウイルスの前臨床有効性試験を行い、NPL を用いて行う場合のシミュレーションを行った。

(8)統計解析方法

統計解析は GraphPad Prism 6.0 を用いて行った。解析は unpaired-t 検定を用いて行い、CDC 活性と腫瘍サイズ / 生存期間の相関解析はスピアマン検定を用いて実施した。

生存解析は Kaplan-Meier 法を用いて行い、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

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 大量産生系構築に向け詳細な条件検討を行い、無血清培養液使用、培養温度 32、上清中 NPL 回収、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。
2. 当初、米国 Mayo Clinic で実施された臨床試験で使用するウイルス製造法を記した報告 (Methods Mol Biol 737:345-366,2011) を参考に、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ため、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) の確保が可能となった。
3. 平成 23 年度より引き続き NPL、PEI、CS による多元複合体の作製ならびに加工条件、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、Zetasizer による表面電荷の推移、Zetasizer によるサイズ分布の変化、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、を確認することで確認した。多元複合体のうち、3 layer (NPL/PEI/CS : CS-MV) が in vitro において肺癌細胞株 (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。

平成 25 年度 研究結果

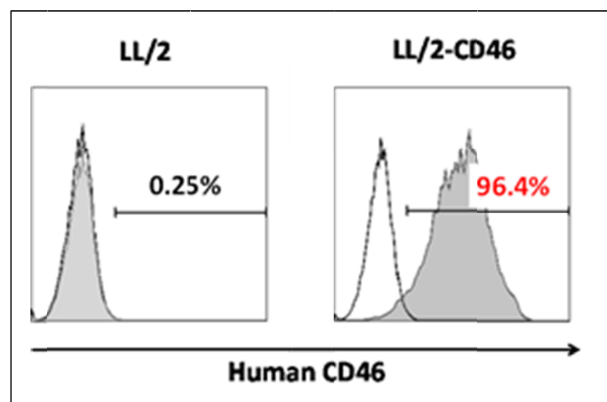


図 1
ヒト CD46 発現マウス肺癌細胞株作製

CD46 を高発現する HEP2 細胞、A549 細胞、WiDr 細胞、MDA-MB-231 細胞は NPL による高い腫瘍溶解感受性を有することが明らかになった (図 1)。ヒト CD46 を発現させたマウス細胞株 LL/2-CD46 細胞もヒト癌細胞株と同様に NPL 感染に対する高い腫瘍溶解感受性を持つことが明らかになった (図 2)

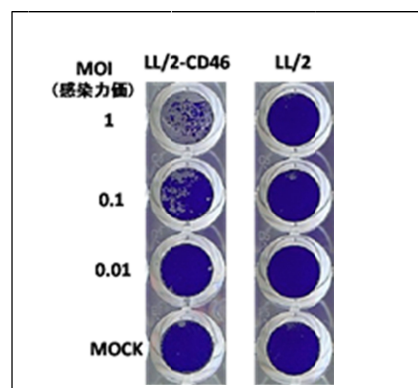


図 2
ヒト CD46 発現マウス肺癌細胞株 (LL/2-CD46) の NPL 感染による細胞傷害性

NPL 液に PEI 液を添加することで、複合体表面電荷はプラスへと変移した。さらに CS 液を添加することで再び表面電荷はマイナスへと変化した (図 3)。

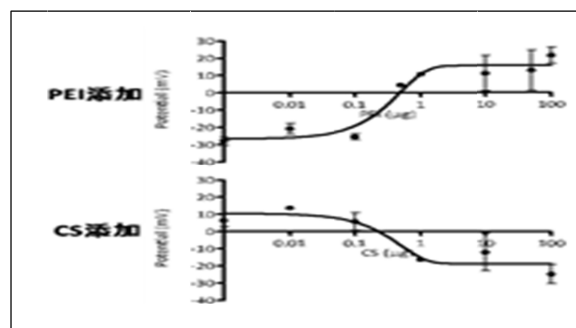


図 3

CS-MV (NPL/PEI/CS) の作製 (電位変化推移)

得られた CS-MV (NPL/PEI/CS) による各細胞株への *in vitro* 殺細胞効果を確認した。抗麻疹ウイルス中和抗体非存在下において、NPL、CS-MV はともに各種ヒト癌細胞株 (HEp2、A549、WiDr、MDA-MB-231 細胞) に対して MOI 依存性に殺細胞効果を示した。EC₅₀ を比較すると MOI=0.57 (NPL) MOI=0.095 (CS-MV) と有意差をもって (P<0.05) CS-MV が高い殺細胞効果を示した (図 4、図 5)。

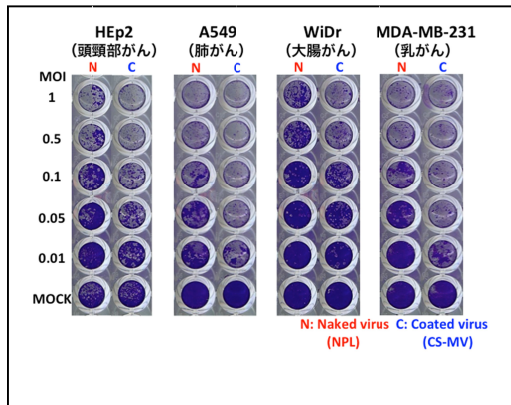


図 4 CS-MV の各種ヒト癌細胞株に対する高い殺細胞効果 (麻疹ウイルス中和抗体非存在下、クリスタルバイオレット法)

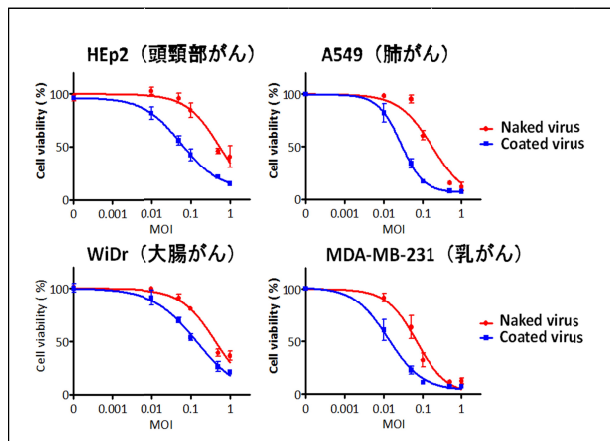


図 5 CS-MV の各種ヒト癌細胞株に対する高い殺細胞効果 (麻疹ウイルス中和抗体非存在下、MTS アッセイ)

抗麻疹ウイルス中和抗体存在下においては、NPL、CS-MV とともに非存在下と比較して低い殺細胞効果を示した。中和抗体存在下における EC₅₀ を比較すると、NPL で MOI=1.35、CS-MV で MOI=0.11 と有意差をもって (P<0.0001) CS-MV が各種ヒト癌細胞株に対し、高い殺細胞効果を示した (図 6、図 7)。

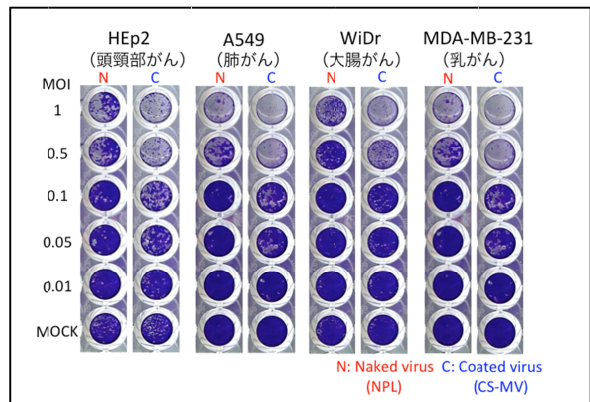


図 6 CS-MV の各種ヒト癌細胞株に対する高い殺細胞効果 (麻疹ウイルス中和抗体存在下、クリスタルバイオレット法)

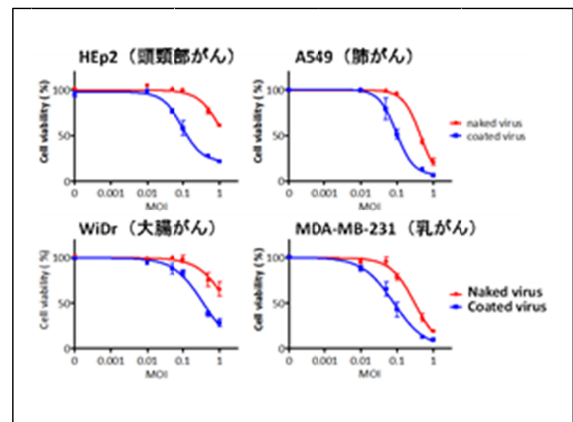


図 7 CS-MV の各種ヒト癌細胞株に対する高い殺細胞効果 (麻疹ウイルス中和抗体存在下、MTS アッセイ)

LL/2 細胞、LL/2-CD46 細胞を用いて同様の検討を行った。LL/2 細胞に対しては、NPL、CS-MV とともに殺細胞効果を示さない一方、LL/2-CD46 細胞に対しては、NPL、CS-MV とともに MOI 依存性の殺細胞効果を示し、また CS-MV がより高い殺細胞効果を示すことが確認された (図 8)。

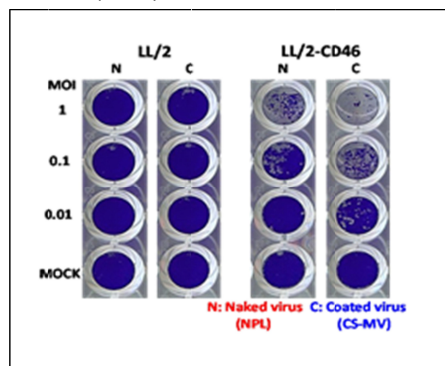


図 8 CS-MV のヒト CD46 発現マウス癌細胞に対する高い殺細胞効果

加えて、CS-MV 液添加後のヒト癌細胞株、LL/2-CD46 細胞が麻疹ウイルス感染後に特徴的(広大)な多核巨細胞形成を示したことから、NPL に PEI 及び CS ポリマー加工を行うことにより多核巨細胞形成促進あるいはウイルスの周囲細胞播種促進による NPL の腫瘍溶解性が高まることが示唆された(図 9)。

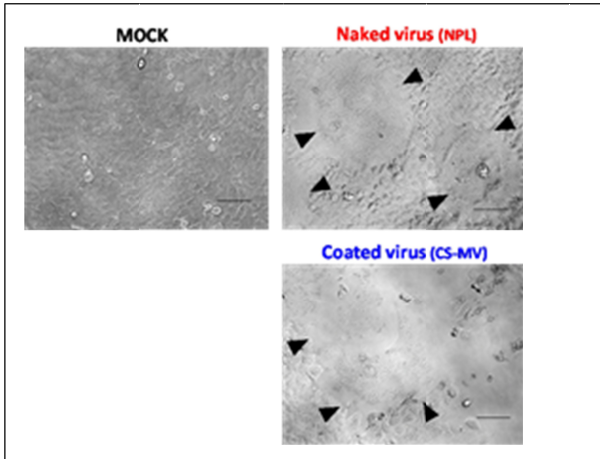


図 9
CS-MV 感染による多核巨細胞形成促進

次に、免疫不全マウスに対しヒト癌細胞株を皮下接種して得られた腫瘍に対して、NPL、CS-MV を腫瘍内投与し、その抗腫瘍効果を比較した。HEp2 細胞を用いたモデルでは、NPL、CS-MV とともにコントロールと比較して著明な腫瘍増殖抑制効果が確認された(ともに $P < 0.05$)。NPL と CS-MV では CS-MV でやや高い腫瘍増殖抑制効果が見られるものの、有意差は認められなかった($P = 0.34$) (図 10)。

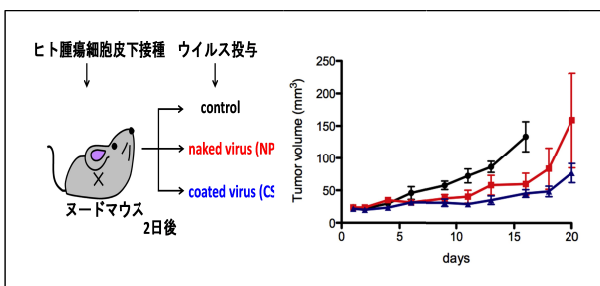


図 10
CS-MV 腫瘍内投与による in vivo 抗腫瘍効果(ヒト頭頸部癌マウスモデル)

A549 細胞、WiDr 細胞を用いたモデルにおいては、NPL、CS-MV 投与マウス群では、コントロール群と比較して著明かつ有意な腫瘍増殖抑制効果を示した(図 11)。

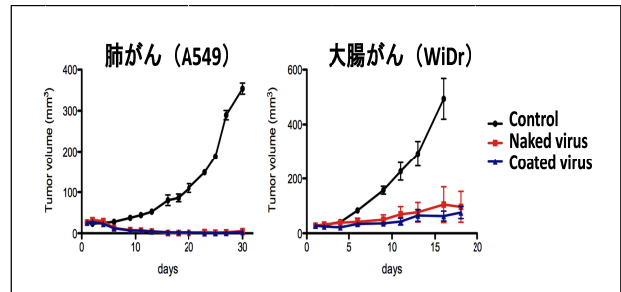


図 11
CS-MV 腫瘍内投与による in vivo 抗腫瘍効果(ヒト非小細胞肺癌及び大腸癌マウスモデル)

野生型マウスに対し NPL の事前投与を行うことで、抗麻疹ウイルス中和抗体産生を誘導した。その後、LL/2-CD46 細胞を皮下接種して得られた腫瘍に対して、NPL、CS-MV を腫瘍内投与し、その抗腫瘍効果を比較した。NPL がコントロールと比較してやや高い抗腫瘍効果を示した一方($P = 0.053$) CS-MV はコントロール、NPL に比較して著明な腫瘍増殖抑制効果を示した($P < 0.01$, $P < 0.01$) (図 11)。

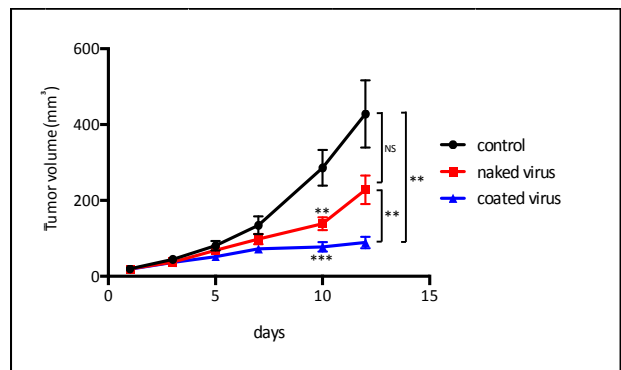


図 12
NPL 事前投与既免疫野生型マウスにおける CS-MV の高い in vivo 抗腫瘍効果(腫瘍増殖曲線)

また、生存解析においても、NPL がコントロールと比較して、生存期間延長効果を示す傾向が確認された一方($P = 0.063$) CS-MV はコントロールと比較して明らかな生存期間延長効果を示した($P < 0.001$)。NPL と CS-MV の比較では生存期間に有意差は認められなかった($P = 0.079$)。この点に関してはサンプルサイズが小さいことが原因と考えられた(図 13)。

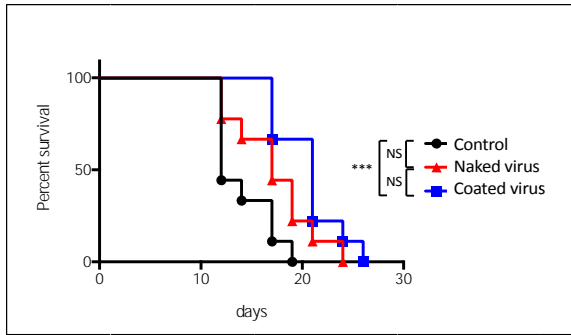


図 13
NPL 事前投与既免疫野生型マウスにおける CS-MV の高い in vivo 抗腫瘍効果 (マウス生存率曲線)

さらに、CS-MV の抗腫瘍効果誘導原因のひとつとして、CDC (Complement-Dependent Cytotoxicity : 補体依存性細胞傷害) 活性が考えられたため、腫瘍内投与を行ったマウスから採取した血清を用いて CDC 活性を測定し、比較検討した。その結果、CS-MV 投与マウス群はコントロール群、NPL 群と比較して、有意な CDC 活性誘導を示した ($P < 0.0001$, $P < 0.01$) (図 14)。また、CDC 活性と腫瘍サイズ ($P < 0.01$)、CDC 活性と生存期間 ($P < 0.001$) には有意な相関関係が確認された(図 15)。

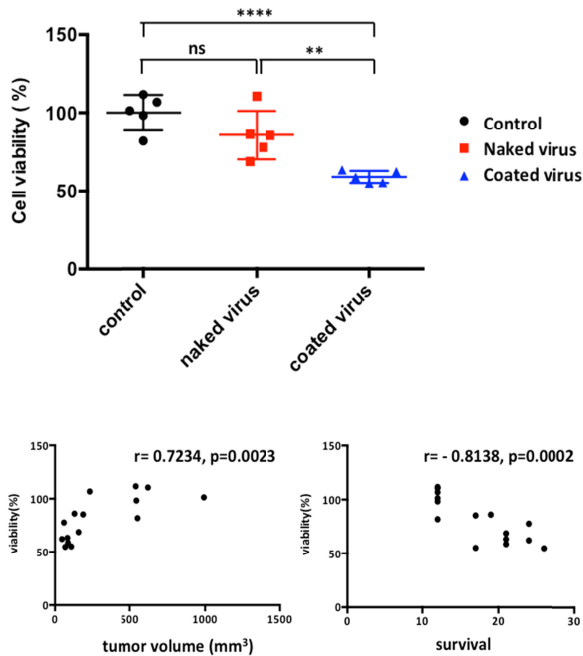


図 14、15
CS-MV 腫瘍内投与マウスにおける CDC 活性

陰イオン交換カラムによる液体クロマトグラフィー(AE)を用いた精製法でウイルスの純度の解析を、SDS-PAGE タンパク染色/Western Blot、透過型電子顕微鏡で解析し、各方法において精製後の夾雑タンパクの除去が確認できた(図 16、図 17)。

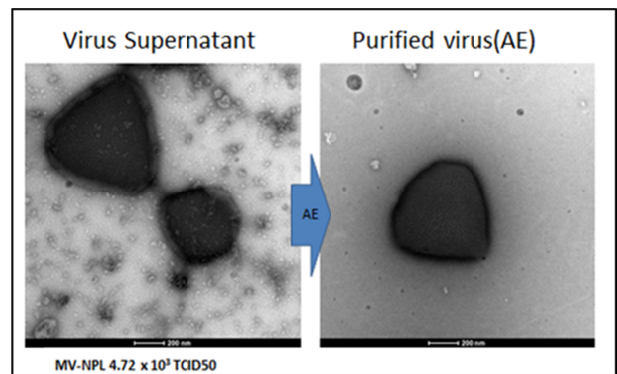
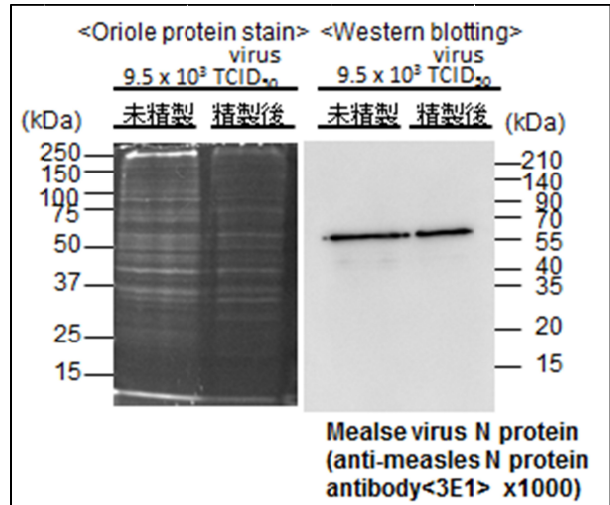


図 16、17、
陰イオン交換カラムを用いた液体クロマトグラフィー精製後のウイルス純度の確認

また、陰イオン交換カラムを用いた液体クロマトグラフィー(AE)を用いた精製方法の他に、新たな精製方法を検討した結果、高い回収率で同等の精製度を得ることができた(本報告書は公開予定ですが、本結果は現在特許申請準備中であるため、ここでの提示は控えさせていただきます)。

現在、NPL 感染可能な CD46Tg/ IFNAR1-KO (ヒト CD46 トランスジェニック IFN 受容体ノックアウト)マウスを用いて、CS-MV 投与の用量漸増試験を行い、NPL 分布、臓器毒性、生存率等の評価を行う実験に着手した。さらに、マウスおよびカニクイザルを用いた用量漸増試験、毒性評価を GLP (Good laboratory practice) レベルで行う実験にも着手した。

濱田らは、ポリマー加工腫瘍溶解性アデノウイルス系での中和抗体解除法の基礎的検討として、アデノウイルスに PEI 及び CS を加えるポリマー加工を行い、走査型電子顕微鏡を用いて立体的構造を検討した。各種条件を検討し、CS 量の減量と PEI との等量追加により凝集発生を防ぐことができ、薄層の多重加工が可能となった。また一定時間のミキシングにて、良好な中和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。強陽性荷電を有する PEI に比べ生体

由来物質で弱陰性荷電のCSでは、十分にPEIの陽性荷電を中和できていない可能性があるため、ポリマー加工のアデノウイルスの感染率をさらに改善する目的で、CSよりさらに強力な陰性荷電を有するヘパリンナトリウムをCS付加後さらに付加することにより中和抗体存在下での感染性を比較検討した。PEIとCSに比べ、粉末状のヘパリンナトリウムを溶解して加えると3倍まで感染性が向上した。そこで現在医薬品として用いられているヘパリン製剤各種を用いて各種条件で比較検討したが、いずれにおいても、粉末状のヘパリンナトリウムに比べ感染性の改善は認められず、ヘパリンは液体に溶解した状態では急速に陰性荷電を失うことから液体ヘパリンの使用は本目的には利用しにくいものと結論された。

腫瘍溶解性アデノウイルスを用いて、安全性試験の予備試験を行った。まず扁平上皮癌担癌ウサギを用いた前臨床有効性試験において、週3~4回の腫瘍溶解性アデノウイルスを投与したところ、一晩で腫瘍が溶解し、嚢胞状となり、血液所見でDICが発現し、強度の貧血と血小板減少が認められた。今後本ウイルス製剤での臨床試験を行う場合には腫瘍溶解に伴うDIC発症への注意が必要であると考えられた。さらにビーグル犬4匹を用いて、アデノウイルスを1回皮下投与し、糞便、尿、唾液は毎日、血液は1-2日毎に採取し、14日後に屠殺し全身臓器を摘出した。また、ビーグル犬3匹を用いて、アデノウイルスを1回皮下投与し、24時間後、4日後、11日後に屠殺し全身臓器を摘出した。皮下投与後、血中中和抗体価は上昇するものの、1~2日毎に採取した血液、糞便、尿、唾液、さらに24時間後、4日後、2週間後に各屠殺して摘出した全身臓器で、PFU assayおよび腫瘍溶解性アデノウイルス特異的プライマーを使用した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。リアルタイム定量的DNA-PCRは、その検量線から100コピーのアデノウイルスが検出限界であり、数時間で検査できるものの、1コピーから検出できるPFU assayは1週間ほどかかるものの非常に感度良好なこと、さらに野生型アデノウイルスとのhomologous recombinationにより発生する増殖性アデノウイルスRCA(replication competent adenovirus)の検知も可能であることから併用して検査する必要があるものと思われた。また、ウイルス治療が外来治療となる可能性もあるため、唾液、糞便、尿の採取とウイルスのリアルタイム定量的DNA-PCR測定とPFU assayは必須であると考えられた。

D. 考察

23年度、ヒト固形がん細胞全28株が、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明らかにした。投与安全性、簡便性を鑑み、臨床試験対象癌種は先ず頭頸部がんとした。また、中和抗体産生誘導モデルにおけるin vivoマウス実験を行うため、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た。24年度は、NPL大量産生系構築に向けた詳細な条件

検討を行い、大量かつ安定的にNPLを得る方法を確立することが可能となった。さらなる効率化を目的に、液体クロマトグラフィーによるNPL精製法を検討し、陰イオン交換カラムを用いたNPL精製法により、約30%の効率でのNPL回収と高純度化(99.8%以上の夾雑タンパクを除去可能)が可能になった。25年度は、PEIとCSの順次付加により得られたCS-MVが、in vitroにおいて肺がん細胞株(A549細胞)、頭頸部がん細胞(HEp2細胞)、大腸がん細胞株(WiDr)、乳がん細胞株(MDA-MB-231細胞)の全細胞株に対し、抗麻疹ウイルス中和抗体存在の有無に関わらず、NPLと比較して有意に高い殺細胞効果を持つことを確認し、ヌードマウスを用いたin vivo実験においても、CS-MVがHEp2腫瘍、A549腫瘍、WiDr腫瘍の増殖抑制効果を持つことを明らかにした。WiDr細胞は標準治療として用いられている抗癌剤オキサリプラチンに抵抗性を有し、またMDA-MB-231細胞はハーセプチンや抗エストロゲン療法に抵抗性を示すトリプルネガティブ乳癌細胞であることから、本結果のもつ臨床的意義は大きいものと考えられる。

特に、野生型マウスを用いた抗麻疹ウイルス中和抗体存在(NPL前投与による免疫誘導状態)マウスモデルにおいて、CS-MVがNPLと比較して有意に高い腫瘍増殖抑制効果をもつことを確認できたことは、本研究の主要目的の達成に向けて大きな成果と考えられる。即ち、MV-NPLはCS修飾により、担癌マウスモデルにおいて、in vivo抗ウイルス免疫応答の回避が可能となり、腫瘍溶解性ウイルス療法における同ポリマーコーティング技術の臨床応用への可能性を強く示唆した。さらに我々は、CS-MV治療がin vivoにおいて効果的に抗腫瘍免疫応答(CDC活性)を誘導することを初めて明らかにした。今後は、PEI+CSによる付加的CDC活性誘導の分子学的メカニズムやその他の腫瘍免疫応答(NK細胞や抗原特異的T細胞誘導)の解明も必要と考えられる。

ポリマー加工アデノウイルスを用いたin vitroおよびin vivo研究結果は、CS-MVの製剤化およびin vivo投与実験を行う上での多くの示唆を得ることができ、有意義かつ実質的な情報源となった。

現時点で、CS-MVの投与方法として腫瘍内投与を想定しているが、遠隔転移を有する進行がんに対する治療方法としては静脈内投与が望ましい。当研究においても静脈内投与の安全性、有用性を検討していく予定であり、その有用性が確認された場合には、患者数の多い、肺がん、大腸がん、乳がんを対象に変更する可能性がある。しかしながら、腫瘍溶解性ウイルス療法の開発経過から、静脈内投与では、腫瘍内投与と同等の効果を得るためには、より高用量の薬剤の投与が必要であることが知られている。このためにはさらに大量のNPLを産生する必要があるため、どの程度まで製造スケールを上げられるかは今後の検討課題ではあるが、今回開発した新規MV精製技術はその大きな一助となるものと期待している。今後、現在着手したサル実験において安全性を確認すると共に、マウスを用いたGLP(Good laboratory practice)レベルでの有効性、安全性の確認を着実に実施して行く計画である。

E. 結論

invitroならびに invivo マウス実験系において、CS-MV の高い抗腫瘍効果、抗麻疹ウイルス中和抗体回避能、さらには腫瘍免疫誘導能を明らかにすることに成功した。また 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や新規開発精製法により、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 を大量生産できるための条件検討を行うことができた。さらに CS-MV 製剤を用いた大動物実験として、サルをもちいた毒性評価試験に着手した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hiramoto, T., Ebihara, Y., Mizoguchi, Y., Nakamura, K., Yamaguchi, 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.
2. Kobayashi, S., Tian, Y., Ohno, N., Yujji, K., Ishigaki, T., Isobe, M., Tsuda, M., Oyaizu, N., Watanabe, E., Watanabe, N., Tani, K., Tojo, A., Uchimar, K., The CD3 versus CD7 Plot in Multicolor Flow Cytometry Reflects Progression of Disease Stage in Patients Infected with HTLV-I. *PLoS ONE* 8:e53728, 2013.
3. 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* 21:1242-1250, 2013
4. 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* 8:e59890, 2013.
5. Chen, M-H., Soda Y., Izawa K., Kobayashi S., Tani, K., Maruyama, K., Tojo, A., Asano, S. A versatile drug delivery system using streptavidin-tagged pegylated liposomes and biotinylated biomaterials. *Int J Pharm* 454:478-485, 2013
6. Nii, T., Marumoto, T., Kawano, H., Yamaguchi, S., Liao, J., Okada, M., Sasaki, E., Miura, Y., Tani, K. Analysis of essential pathways for self-renewal in common marmoset embryonic stem cells. *FEBS Open Bio*. 4:213-219, 2013.
7. Fujioka, T., Yasuoka, T., Koizumi, M., Tanaka, H., Hashimoto, H., Nabeta, M., Koizumi, K., Matsubara, Y., Hamada, K., Matsubara, K., Katayama, T., Nawa, A. Concurrent chemoradiotherapy with nedaplatin in patients with stage IIA to IVA cervical carcinoma. *Molecular and clinical oncology*, 1:165-170, 2013.

8. Inoue, H., Tani, K. Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. *Cell Death Differ*. 21:39-49, 2014
9. Yamaguchi S, Marumoto T, Nii T, Kawano H, Liao J, Nagai Y, Okada M, Takahashi A, Inoue H, Sasaki E, Fujii H, Okano S, Ebise H, Sato T, Suyama M, Okano H, Miura Y, Tani, K. Characterization of common marmoset dysgerminoma like tumor induced by the lentiviral expression of reprogramming factors. *Cancer Sci*. 105: 402-408, 2014.
10. Narusawa M, Inoue H, Sakamoto C, Matsumura Y, Takahashi A, Inoue T, Watanabe A, Miyamoto S, Miura Y, Hijikata Y, Tanaka Y, Inoue M, Takayama K, Okazaki T, Hasegawa M, Nakanishi Y, Tani, K. TLR7 ligand augments GM-CSF-initiated antitumor immunity through activation of plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Immunol Res*. 2014 (in press)
11. Hamada, K., Shirakawa, T., Terao, S., Gotoh, A., Tani, K., Huang W. Biosafety studies of carrier cells infected with a replication-competent adenovirus introduced by IAI.3B promoter. *Mol Ther Meth Clin Develop* 2014(in press)

2. 学会発表

1. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Yumiko Matsumura, Kaname Nosaki, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. 肺癌幹細胞を標的とした新規遺伝子改変麻疹腫瘍溶解性ウイルス療法. 第53回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2013
2. Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani A novel cancer cell vaccine using induced pluripotent stem cells genetically engineered to produce GM-CSF elicits substantial antitumor immunity in a syngeneic mouse model. The 16th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Salt Lake City, UT, May 15-18, 2013
3. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Dual microRNA-regulated oncolytic coxsackievirus B3 infection displays antitumor activity with attenuated pathogenicity in mice. The 16th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Salt Lake City, UT, May 15-18, 2013
4. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Combination use of TLR7 ligand with GM-CSF gene-transduced tumor vaccines provides substantial antitumor immunity against poorly immunogenic mouse lung cancer cells. The 16th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Salt Lake City, UT, May 15-18, 2013
5. Miyako Sagara, Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto,

- Chika Sakamoto, Yuki Nakano, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. CVB3 infection elicits potent oncolytic activity against lung cancer stem cells. The 16th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Salt Lake City, UT, May 15-18, 2013
6. Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Chika Sakamoto, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. Gene expression profiling identifies plasmacytoid dendritic cells as positive regulators in GM-CSF-induced antitumor immunity. The 4th Japanese Society of Hematology International Symposium 2013, Matsuyama, Japan, May 24-25, 2013
 7. Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Vaccination with irradiated induced pluripotent stem cells genetically engineered to secrete GM-CSF provides substantial antitumor immunity in immunocompetent syngeneic mouse models. 第 19 回日本遺伝子治療学会, 岡山, 2013
 8. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. Plasmacytoid dendritic cells play an essential role in GM-CSF-induced antitumor immunity. 第 19 回日本遺伝子治療学会, 岡山, 2013
 9. Miyako Sagara, Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Chika Sakamoto, Yuki Nakano, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Differential susceptibility of cancer stem cells and cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition to oncolysis by CVB3 infection. 第 19 回日本遺伝子治療学会, 岡山, 2013
 10. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Infection with dual microRNA-targeted coxsackievirus B3 abrogates its pathogenicity retaining oncolytic activity. 第 19 回日本遺伝子治療学会, 岡山, 2013
 11. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Beibei Wang, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Infection with Echovirus 4 elicits potent oncolytic activity against cisplatin-resistant esophageal carcinoma. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013
 12. Miyako Sagara, Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Chika Sakamoto, Yuki Nakano, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. CVB3 infection displays different oncolytic activities against cancer stem cells and cancer cells undergoing EMT. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013
 13. Chika Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Therapeutic vaccine with GM-CSF gene-transduced cancer stem cells inhibits tumor growth and metastasis of breast cancer. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013
 14. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. MicroRNA-targeted coxsackievirus B3 infection markedly reduces its pathogenicity retaining oncolytic activity. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013
 15. Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Vaccination with irradiated induced pluripotent stem cells elicits substantial antitumor immunity. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013
 16. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. TLR7 ligand overcomes therapeutic resistance to GM-CSF-gene transduced tumor vaccination. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013
 17. Chika Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, and Kenzaburo Tani. Therapeutic vaccine with GM-CSF gene-transduced cancer stem cells inhibits tumor growth and metastasis of breast cancer. The 23rd Hot Spring Harbor International Symposium, Recent Advances in Stem Cell Biology 2013. Fukuoka, Japan, November 4-6, 2013
 18. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. MicroRNA-regulated coxsackievirus B3 abrogates its pathogenicity retaining oncolytic activity. The 23rd Hot Spring Harbor International Symposium, Recent Advances in Stem Cell Biology 2013. Fukuoka, Japan, November 4-6, 2013
 19. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. MicroRNA-targeted coxsackievirus B3 infection markedly reduces its toxicity without losing its original oncolytic activity. Therapeutics Discovery Symposium Asia Small RNAs to Stem Cells & Epigenetic Reprogramming Asia-2013 Meeting On 'RNA Regulation to Delivery, Programming to Pluripotency & Therapeutics'. Tokyo, Japan, November 25-26, 2013
 20. Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Takafumi Hiramoto, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama,

Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Vaccination with irradiated induced pluripotent stem cells genetically engineered to produce GM-CSF confers potent T cells-mediated antitumor immunity. The 53th ASH Annual Meeting and Exposition. New Orleans, LA, December 10-13, 2013

21. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Yumiko Matsumura, Atsushi Takahashi, Ayumi Watanabe, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. TLR7 ligand potentiates GM-CSF-initiated antitumor immunity through activation of plasmacytoid dendritic cells. The 53th ASH Annual Meeting and Exposition. New Orleans, LA, December 10-13, 2013
22. 高木香津子、濱田雄行、伊藤智子、芳原智恵子、小山義之、谷憲三朗、那波明宏. 卵巣がんに対するコンドロイチン硫酸およびポリエチレンイミンによる多重コーティングを施行したオンコリティックアデノウィルスの遺伝子治療. 第55回日本婦人科腫瘍学会学術講演会. 2013年12月13-15日、京都.
23. 高木香津子、濱田雄行、伊藤智子、芳原智恵子、小山義之、谷憲三朗、那波明宏. midkineプロモーター導入オンコリティックアデノウィルスによるコンドロイチン硫酸ポリマー多重加工人工皮膜を用いた卵巣癌に対する抗腫瘍効果. 第35回日本バイオマテリアル学会大会. 2013年11月25-26日、東京.
24. 高木香津子、濱田雄行、伊藤智子、芳原智恵子、小山義之、谷憲三朗、那波明宏. 卵巣癌に対するコンドロイチン硫酸を用いたオンコリティックアデノウィルスのポリマー多重加工による抗腫瘍効果. 日本癌学会学術総会. 2013年10月3-5日、神奈川.
25. 高木香津子、濱田雄行、伊藤智子、芳原智恵子、小山義之、谷憲三朗、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ウィルスの電子顕微鏡による評価. 第19回日本遺伝子治療学会学術総会. 2013年6月4-6日. 岡山.
26. Hamada, K., Takagi, K., Tani, K., Nawa, A. 特別シンポジウム-5「がん治療」Cancer gene therapy with oncolytic adenovirus by cell and polymer processing. 第19回日本遺伝子治療学会学術総会. 2013年7月4-6日. 岡山.
27. Hamada, K., Takagi, K., Yoshihara, C., Ito, T., Koyama, Y., Itoh, H., Nawa, A. Gene transfer of chondroitin sulfate-coated granulocyte macrophage-colony stimulating factor in ovarian cancer. The ASGCT 16th Annual Meeting, May 15-18, 2013 in Salt Lake City, UT, USA.

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

発明名称： **新規腫瘍溶解性ウイルス**

- 整理番号 QP120013

- 国際特許分類 A61K 35/76
- 代表発明者 井上博之
- 発明者 谷憲三朗、宮本将平、王 倍倍
- 出願日： 2013-04-19
- 出願番号： PCT/JP2013/061686

発明名称：**遺伝子組換えコクサッキーウイルス**

- 整理番号 QP130008-US
- 代表発明者 谷憲三朗
- 発明者：谷憲三朗、井上博之、宮本 将平
- 出願日：2013/4/17
- 出願番号： 61/812943

発明名称：**新規細胞、それを用いた抗腫瘍効果の誘導剤、癌の遺伝子治療用医薬および抗腫瘍効果の誘導方法**

- 発明者：濱田雄行
- 権利者：愛媛大学
- 種類：特許
- 番号：特願 2014-074181
- 出願年月日：平成 26年 3月 31日
- 国内外の別：国内

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし