

201332021A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

癌治療用組換え麻疹ウイルスの開発  
に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 甲斐知恵子

東京大学医科学研究所

平成26（2014）年 5月

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

癌治療用組換え麻疹ウイルスの開発  
に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 甲斐知恵子

東京大学医科学研究所

平成26（2014）年 5月

## 目 次

I. 総括研究報告		
癌治療用組換え麻疹ウイルスの開発	-----	1
甲斐知恵子、米田美佐子		
II. 分担研究報告		
1. 品質確保癌治療用組換え麻疹ウイルスの製造に関する研究	-----	7
藤堂具紀、稲生靖		
2. 癌治療用組換え麻疹ウイルスの安定性に関する研究	-----	11
古川洋一		
3. 癌治療用組換え麻疹ウイルス開発における規制対応に関する研究	-----	13
長村文孝		
4. 癌治療用組換え麻疹ウイルスのイヌでの有効性に関する研究	-----	15
松田浩珍、田中あかね		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	21

# I . 総括研究報告

癌治療用組換え麻疹ウイルスの開発

研究代表者 甲斐知恵子 東京大学医科学研究所教授  
研究分担者 米田美佐子 東京大学医科学研究所准教授

研究要旨

癌治療用麻疹ウイルスrMV-SLAMblindの増殖用マスターセルバンク構築の準備として、受容体恒常的発現細胞の樹立とともに、GMP対応に必要な標準手順書や手続き等を整えた。ウイルスに感受性の乳癌細胞の迅速判定法として受容体発現の検出法を確立した。ウイルス継代による遺伝子変異解析のための条件も決定した。また、イヌでの安全性試験を行い、安全性を確認した。さらに難知性乳癌細胞にも有効性を認め、広い適用範囲が期待できる結果を得るなど、本年度計画は順調に進展した。

研究分担者

米田美佐子・東京大学医科学研究所准教授  
藤堂具紀・東京大学医科学研究所教授  
稲生 靖・東京大学医科学研究所准教授  
古川洋一・東京大学医科学研究所教授  
長村文孝・東京大学医科学研究所教授  
松田浩珍・東京農工大学農学研究院教授  
田中あかね・東京農工大学農学研究院教授

A. 研究目的

我々は麻疹ウイルス野外株(MV-HL)が、乳癌細胞に対して高い殺傷能力を持つこと、細胞侵入には病原性発現に必須のSLAM受容体ではなく、成体組織では胎盤以外では発現しないPVRL4受容体を介することを発見し、SLAM結合部位を欠失させた組換え麻疹ウイルスrMV-SLAMblindを作出した。rMV-SLAMblindは、サルでの安全性も確認され、またマウス移植乳癌に対して米国の先行研究であるCD46受容体を標的とした癌治療用麻疹ウイルスよりも高い乳癌細胞殺傷能力を示したことから、競争力の高い有望なシーズと考えられた。本開発研究では、rMV-SLAMblindについて効率の良いウイルス増殖法の確立、マスターウイルスバンクの構築、イヌでの安全性試験、適用範囲試験、受容体の迅速検出法の確立およびイヌでの自家腫瘍症例での試験を経

て非臨床POCを確保し、3年以内に医師主導治験につなげることを目的とする。がんは厚生労働省が医療イノベーションとして推進する8つの重点領域の一つであり、我が国の癌治療薬の75%が輸入に依存している現在、日本発の新治療剤の開発は医療保険料の軽減にもつながり厚生労働行政への貢献が期待できる。

B. 研究方法

[増殖用細胞の構築] PVRL4発現プラスミドを Vero細胞またはMDCK細胞に導入後、G418含有無血清培地中で培養を続け、増殖した細胞株を得た。その後、細胞表面におけるPVRL4発現を抗PVRL4抗体による染色およびFACS解析により検討した。

[ウイルス遺伝子変異の解析] 導入した変異部位の安定性を迅速に解析する手法を確立するため、本年度はrMV-SLAMblindストック液中のウイルスについて、プライマーセットを合成し、Ion PGM次世代シーケンサーを用いて解析を行い、至適条件を決定した。

[イヌでの安全性試験] 4ヶ月令のビーグル犬6頭にウイルス液1ml ( $2 \times 10^7$  TCID50)を静脈内投与し、状態を28日間観察した。対照群として3頭のウイルス非投与個体を用意した。ウイルス投与1, 4, 7, 14, 28日後に体重測定、尿検査、血液検査を行った。また、採材した尿、血液、糞便、拭い液中にウイルスゲノムRNAが残存するかをRT-PCR法を用いて検討した。さらに、ウイルス投与28日後に剖検し、各臓器を摘出後、病理学的解析およびRT-PCR法によるウイルスの有無を検討した。

[適用範囲試験] 難治性乳癌由来培養細胞株について、細胞表面におけるPVRL4発現

を抗PVRL4抗体による染色およびFACS解析により検討した。また、ウイルス感染性を、GFP発現型組換えウイルス接種後の蛍光観察により検討した。PVRL4発現とウイルス感染性が認められた細胞株については、ウイルス感染による細胞傷害性をWSTアッセイにより検討した。

[受容体発現細胞の迅速検出系の確立] 免疫組織化学的手法を用いたPVRL4の検出条件を確立するため、ヒト乳癌細胞株のスミア標本を用いて一次抗体の種類・抗体濃度・シグナル検出方法を検討した。

[イヌのPVRL4に対するpolyclonal抗体の作製] イヌのPVRL4をpET21bにクローニングし、大腸菌の発現系で発現させ精製したタンパク質をウサギに2~4回免疫し採血を行った。血清中抗体価の上昇は、発現細胞株を用いたFACS, FA, WBで確認後ELISAで力価を測定した。

[イヌの腫瘍細胞への有効性試験] イヌの乳癌細胞株2種でPVRL4発現をFACSで解析し、rMV-SLAMblindでの溶解性も検討した。

[倫理面への配慮] 全ての動物実験は、東京大学動物実験規則に従って、医科学研究所動物実験委員会の承認を得た後に、東京大学動物実験マニュアルに従って適正に行った。遺伝子組換え実験は、東京大学遺伝子組み換え委員会の承認後に行った。組換えウイルス作製実験は、文部科学大臣確認を受けた後に行っている。

### C. 研究結果

1) 増殖細胞の構築: PMDAの助言によりWHO基準Vero細胞を元にウイルス増殖用細胞を作製する予定であったが、平成25年度8月の本研究事業採択後3ヶ月を要しても供与を受けられなかったため、これまでFDA承認製剤で用いられた実績のあるATCCの細胞株2株(Vero, MDCK)を入手し、PVRL4を恒常的に発現する細胞を作製した。現在クローニングにより最も高率に発現する細胞株を選択中である。また、本細胞樹立後にGLP準拠培養室で増殖させマスターセルバンクを構築する予定であるため、培養室の準備を行った。

2) マスターセルバンク構築の準備: ウイルス増殖用細胞が確立後、平成26年度にはGLP施設においてGMP対応マスターセルバンクおよびワーキングセルバンクを構築する予定である。そのための準備として、平成25年度は使用する装置や細胞培養器具の選定を行った。また、現行の指針や通達等の規定にそった手順書の作成も行い準備を整えた。

3) ウイルス遺伝子変異の解析: rMV-SLAMblind作製の際に導入した遺伝子変異部位が、ウイルスの継代や個体内での増殖によっても安定に維持されるかを検討する必要がある。本年度はその準備として解析手法の確立を行った。ウイルスゲノムに対して

オーバーラップするようPCRプライマーセットを合成した。まず親株のMVに対して、RT-PCRを行い、PCR産物をIon PGM次世代シーケンサーで314チップを用いて解析した。200回以上の重複で読む事ができ、変異が認められない事を確認した。コストも通常の方法よりかなり低価格におさえられた。次に、rMV-SLAMblindのストックウイルス液中のウイルスに対して、同様に全ゲノム解析を行った結果、rMV-SLAMblind作出の際に導入した変異コドン(R533A)は、100%保存されていること、およびそれ以外の新たな突然変異が加わっていないことが確認された。

4) 安全性試験: イヌ6頭にrMV-SLAMblindを接種したところ、発熱や体重減少、その他の症状は何も示さなかった。また尿中および安楽死させた後の各種臓器からもPCRでウイルス遺伝子は検出されなかった。従ってイヌの接種試験によって本ウイルスの安全性が高いことが示された。

5) 適用範囲試験: 難治性の乳癌細胞株でも本ウイルスが感染し細胞溶解能を示す事がわかった。また、乳癌以外の癌細胞に関しても感受性が高い細胞株が複数見つかった。さらに、投与方法の検討として、SCIDマウスへの移植乳癌に対して従来の腫瘍内投与以外に静脈注射による投与も検討したところ、有効性が認められた。

6) 受容体発現の迅速検出法の確立: 本年度はまずPVRL4発現ヒト乳癌細胞のスミアを作製し、固定後に市販のmAbを用いて免疫染色した結果、陽性像がよく判定できる条件を検討した。その結果、ヒトPVRL4ポリクローナル抗体を50~100倍希釈して反応させ、酵素ポリマー法で染色するとPVRL4を検出できることが判った。またイヌの乳癌症例での非臨床試験を行うために、イヌの乳癌由来細胞株を集めて抗ヒトPVRL4抗体を用いて検索したところ、PVRL4が発現している細胞を複数見いだした。そこで、イヌでの効率の良いPVRL4迅速検出系も確立するため、まずイヌPVRL4に対するウサギのpolyclonal抗体(poly Ab)を作出し、ELISA力価x12800の抗血清を得た。この抗イヌPVRL4 poly Abを用いてイヌ乳癌由来細胞のスミアの免疫染色条件を検討し、強い陽性像を認める染色条件を決定した。

7) イヌ乳癌細胞に対する有効性試験: イヌの乳癌由来細胞株を集めている。その中でPVRL4を発現する細胞株を見だし、本ウイルスを接種したところ、高い細胞溶解性を確認した。また、プレ実験ながらイヌの乳癌症例からの組織にもPVRL4が発現しているものを確認した。

8) イヌの自家乳癌症例での非臨床試験にむけての準備: 東京農工大学の臨床動物試験・研究倫理委員会を発足および新たな

委員会規則を設定し、獣医生命倫理上の十分な配慮を行える体制を整備した。これにより、同大学で行う計画の獣医臨床試験の生命倫理については、本委員会の承認を得た上で行えることとなった。また、イヌの乳癌症例を集めるための獣医病院の連携体制を整えた。

9) 規制対応に関する情報収集：腫瘍溶解ウイルスによる新たな癌治療法については、我が国ではまだ認可されたものはなく、国際的なガイドラインも2009年に発布されて以来進展がない。しかし、諸外国では第一相試験が実施されており、米国ではHSV-1由来製剤で平成26年度中に第三相試験を経て承認される見通しがある。これら最新の情報や各国の規制当局から発出されている各種ガイドラインの収集を行い、来年度からの非臨床製剤製造準備の検討に備えた。

#### D. 考察

ウイルス増殖用細胞株の作製およびマスターセルバンクを構築する準備は予定どおり進んでおり、来年度には構築できると考えられる。ウイルスの継代や、個体に用いた場合の安定性を解析するための、遺伝子変異迅速解析手法の確立もできた。次世代シーケンサーによる解析手法は、感度、費用、簡便性の点で従来法より優れていると示唆された。

適用範囲試験では、難治性乳癌でも予想以上の効果を得られたことから来年度は詳細な解析を行う事とした。さらに、遠隔投与方法である静脈内投与方法でも高い有効性を示したことから、転移癌への有効な治療法としても期待できると考えられた。

イヌを用いた安全性試験では静脈注射で投与しても症状も出ず、ウイルス遺伝子も採取したどの臓器からも検出されなかったことから、本ウイルスは安全性が高いと判断された。本ウイルスは通常の感染経路であるリンパ系細胞上に発現するSLAMへの結合能を欠失させており、以前の研究により受容体としてPVRL4を介して癌細胞に侵入する事を明らかにしている。ヒトではPVRL4は、胚の発生期にのみ発現し、成体では胎盤にのみ発現することが知られている。イヌの正常成体でのPVRL4の分布は、これまでに免疫染色で検索した報告がありヒトより広く分布することが示されている。しかし、今回の安全性試験でいずれの臓器でも増殖が見られなかったことから、PVRL4は血液にさらされる細胞膜上には発現していないことが推測された。イヌでの安全性試験は、ヒトでの安全性試験のみならず、本計画にあるイヌの自家乳癌症例での解析研究が安全に行えることを検証する試験でもある。今回の結果によりイヌの正常個体には感染しないことが示されたことから、計画どお

りイヌの自家腫瘍での非臨床試験が可能と考えられた。また、プレ実験ながらイヌの乳癌細胞株およびイヌ乳癌組織でもPVRL4を高率に発現するものがあること、本ウイルスはPVRL4発現腫瘍細胞株を効率よく溶解することが明らかになったことから、イヌでの自家乳癌症例での試験の有用性が期待できる。実際にこの試験を行う機関において、獣医生命倫理を所掌する委員会および規定を整備したことから、来年度の試験を速やかに行うための準備が整った。

#### E. 結論

癌治療用麻疹ウイルスrMV-SLAMblindの開発における研究の初年度に計画した増殖用細胞の構築、受容体発現癌細胞の検出法の確立のための条件決定、ウイルス継代による遺伝子変異検法の条件決定、イヌでの安全性試験は計画通りに進んだ。また適用範囲試験では難治性乳癌細胞にも予想以上の効果が認められたことからさらなる有効性も期待できる。

その他の準備研究も計画通り進み、全体として本年度計画は順調に進捗した。

#### F. 健康危険情報

該当なし

##### 1. 論文発表

1. Sugai A, Sato H, Hagiwara K, Kozuka-Hata H, Oyama M, Yoneda M, Kai C. Newly identified minor phosphorylation site threonine-279 of measles virus nucleoprotein is a prerequisite for nucleocapsid formation. *J Virol*. 88(2):1140-9, 2014.
2. Sugai, A., Sato, M., Yoneda, M. and Kai, C. Phosphorylation of Measles Virus Nucleoprotein Affects Viral Growth by Changing Gene Expression and Genomic RNA Stability. *J. Virol.* 87(21):11684-92, 2013
3. Yoneda, M., Georges-Courbot, M-C., Ikeda, F., Ishii, M., Jacquot, F., Raoul, H., Sato, H. and Kai, C. Recombinant measles virus vaccine expressing the Nipah virus glycoprotein protects against lethal Nipah virus challenge. *PLoS ONE*, 2013;8(3) e58414. 2013. Doi:10.1371/journal.pone.0058414, Epub 2013 Mar 14.
4. Sugiyama, T., Yoneda, M., Kuraishi, T., Hattori, S., Inoue, Y., Sato, H. and Kai, C. Measles virus selectively blind to signaling lymphocyte activation molecule as a novel oncolytic virus for breast cancer treatment. *Gene Therapy*,( E-pub 1-10, 2012) 20, 338-347, 2013.
5. Tsuji T, Nakamori M, Iwahashi M,

- Nakamura M, Ojima T, Iida T, Katsuda M, Haya ta K, Ino Y, Todo T, Yamaue H: An armed oncolytic herpes simplex virus expressing thrombospondin-1 has an enhanced in vivo antitumor effect against human gastric cancer. *Int J Cancer* 132 (2): 485-494, 2013 (published online 2012 Jun 22. doi: 10.1002/ijc.27681).
6. Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Todo T, Ino Y, Saito N, Aburatani H, Funato K, Echizen K, Sugano H, Haruta R, Matsui M, Takahashi R, Manabe E, Oda T, Akiyama T: The critical role of cyclin D2 in cell cycle progression and tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* 32 (33): 3840-3845, 2013 (published online 2012 Sep 10. doi: 10.1038/onc.2012.399).
  7. Tanaka M, Tsuno NH, Fujii T, Todo T, Saito N, Takahashi K: Human umbilical vein endothelial cell vaccine therapy in patients with recurrent glioblastoma. *Cancer Sci* 104 (2): 200-205, 2013 (Epub 2012 Oct 27. doi: 10.1111/cas.12055).
  8. Shibui S, Narita Y, Mizusawa J, Beppu T, Ogasawara K, Sawamura Y, Kobayashi H, Nishikawa R, Mishima K, Muragaki Y, Maruyama T, Kuratsu J, Nakamura H, Kochi M, Minamida Y, Yamaki T, Kumabe T, Tominaga T, Kayama T, Sakurada K, Nagane M, Kobayashi K, Nakamura H, Ito T, Yazaki T, Sasaki H, Tanaka K, Takahashi H, Asai A, Todo T, Wakabayashi T, Takahashi J, Takano S, Fujimaki T, Sumi M, Miyakita Y, Nakazato Y, Sato A, Fukuda H, Nomura K: Randomized trial of chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy with nimustine (ACNU) versus nimustine plus procarbazine for newly diagnosed anaplastic astrocytoma and glioblastoma (JCOG0305). *Cancer Chemother Pharmacol* 71 (2): 511-512, 2013 (Epub 2012 Dec 11. doi:10.1007/s00280-012-2041-5)
  9. Koyama-Nasu R, Hruta R, Nasu-Nishimura Y, Taniue K, Katou Y, Shirahige K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Matsui M, Takahashi R, Hoshino-Okubo A, Sugano H, Manabe E, Funato K, Akiyama T: The pleiotrophin-ALK axis is required for tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* (Epub 2013 May 20. doi: 10.1038/onc.2013.168).
  10. Echizen K, Nakada M, Hayashi T, K, Morishita Y, Hirano S, Terai K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Takayanagi S, Ohtani R, Saito N, Akiyama T:PCDH10 is required for the tumorigenicity of glioblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 444(1): 13-18, 2014 (Epub 2014 Jan 6. Doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.138).
  11. Takahashi N, Yamaguchi K, Ikenoue T, Fujii T, Furukawa Y. Identification of two Wnt-responsive elements in the intron of RING Finger Protein 43 (RNF43) gene. *PLoS ONE*, 9: e86582, 2014.
  12. Yamaguchi K, Rui Yamaguchi R, Takahashi N, Ikenoue T, Fujii T, Shinozaki M, Tsurita G, Hata K, Niida A, Imoto S, Miyano S, Nakamura Y, Furukawa Y. Overexpression of cohesion establishment factor DSCC1 through E2F in colorectal cancer. *PLoS ONE*, 9: e85750, 2014.
  13. Shigeyasu K, Tanakaya K, Nagasaka T, Aoki H, Fujiwara T, Sugano K, Ishikawa H, Yoshida T, Moriya Y, Furukawa Y, Goel A, Takeuchi H. Early detection of metachronous bile duct cancer in Lynch syndrome: report of a case. *Surg Today*. Jul 31, Epub, 2013.
  14. Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, Michizuki 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(8):3023-3028, 2013.
  15. Mae H, Ooi J, Takahashi S, Kato S, Kawakita T, Ebihara Y, Tsuji K, Nagamura F, Echizen H, Tojo A. Acute kidney injury after myeloablative cord blood transplantation in adults: the efficacy of strict monitoring of vancomycin serum trough concentrations. *Transplant Infect Dis* 15:181-6, 2013.
  16. Oida K, Matsuda A, Jung K, Xia Y, Jang H, Amagai Y, Ahn G, Nishikawa S, Ishizaka S, Jensen-Jarolim E, Matsuda H and Tanaka A. Nuclear factor-kB plays a critical role in both intrinsic and acquired resistance against endocrine therapy in human breast cancer cells. *Scientific Reports* 2014 17;4:4057. doi: 10.1038/srep04057.
  17. Nishikawa S, Tanaka A, Matsuda A, Oida K, Jang H, Jung K, Amagai Y, Ahn G, Okamoto N, Ishizaka S, Matsuda H. A molecular targeting against nuclear factor-kB, as a chemotherapeutic approach for human malignant mesothelioma. *Cancer Medicine* 2014 3:416-425. doi: 10.1002/cam4.202.



18. Amagai Y, Tanaka A, Jung K, Matsuda A, Oida K, Nishikawa S, Jang H, Ishizaka S, Matsuda H. Production of stem cell factor in canine mast cell tumors. *Research in Veterinary Science* 2014 96: 124-126. doi:10.1016/j.rvsc.2013.10.014.
  19. Amagai Y, Tanaka A, Matsuda A, Jung K, Oida K, Nishikawa S, Jang H, Matsuda H. Heterogeneity of internal tandem duplications in the c-kit of dogs with multiple mast cell tumours. *J Small Anim Practice* 2013, 54:377-380. doi: 10.1111/jsap.12069.
  20. Amagai Y, Tanaka A, Matsuda A, Oida K, Jung K, Nishikawa S, Jang H, Ishizaka S, Matsuda H. Increased expression of the antiapoptotic protein MCL1 in canine mast cell tumors. *J Vet Med Sci*, 2013 75:971-974.
2. 学会発表
1. Doi, T., Sato, H., Yoneda, M. and Kai, C. Cellular adaptation for establishment of measles virus persistent infection in culture. XVth Int. Conf. on Negative Strand Viruses. Granada, Spain, June 16-21, 2013.
  2. Kwon, H-J., Honda, T., Nambu, A., Miyakawa, A., Sato, H., Nakae, S., Yoneda, M. and Kai, C. Measles virus inclusion bodies may be implicated in development of myopathy. XVth Int. Conf. on Negative Strand Viruses. Granada, Spain, June 16-21, 2013.
  3. 米田美佐子. パラミクソウイルスの病原性発現機序の解析とワクチン開発。第61回日本ウイルス学会、2013年11月10-12日、神戸。
  4. 菅井亮宏、佐藤宏樹、米田美佐子、甲斐知恵子。組換え麻疹ウイルスによるN蛋白リン酸化の機能解析。第61回日本ウイルス学会、2013年11月10-12日、神戸。
  5. 木曾有里、佐藤宏樹、米田美佐子、甲斐知恵子。神経由来細胞樹立麻疹ウイルス持続感染株の樹立と性状。第61回日本ウイルス学会、2013年11月10-12日、神戸。
  6. Doi, T., Sato, H., Yoneda, M. and Kai, C. Measles virus establishes persistent infection by negative feedback regulation with IFN $\beta$ . 12<sup>th</sup> Awa-ji Int. Forum on Infect. Immun. 2013. 9. 10-13.
  7. 庄司紘一郎、米田美佐子、池田房子、荻原喜久美、納谷裕子、佐藤宏樹、甲斐知恵子。イヌ腫瘍に対するイヌジステンパーウイルスを用いた新規治療法開発の基礎研究。第156回日本獣医学会、2013年9月20-22日、岐阜
  8. 藤堂 具紀：がんのウイルス療法の開発。第112回日本皮膚科学会総会（横浜）、2013年6月14日。
  9. 藤堂 具紀：悪性グリオーマに対するウイルス療法の臨床開発。第12回小児脳腫瘍研究会（大阪）、2013年6月29日。
  10. Uchihashi T, Nakahara H, Ino Y, Todo T: A new therapeutic strategy for oral squamous cell carcinoma using oncolytic herpes simplex virus type 1. 第19回日本遺伝子治療学会年次学術集会（岡山）、2013年7月4日。
  11. Kakutani S, Fukuhara H, Takeshima Y, Homma H, Ino Y, Todo T: Oncolytic virus therapy using recombinant HSV-1 for nonseminoma germ cell tumors. 第19回日本遺伝子治療学会年次学術集会（岡山）、2013年7月4日。
  12. 藤堂 具紀、田中 実、伊藤 元一、福原 浩、稲生 靖: Clinical development of a third-generation recombinant oncolytic HSV-1 (G47 $\Delta$ ) for brain tumors and rare cancers. 第19回日本遺伝子治療学会年次学術集会（岡山）、2013年7月4日。
  13. 藤堂 具紀：がんのウイルス療法の臨床開発。第17回日本がん免疫学会総会（山口）、2013年7月4日。
  14. Uchihashi T, Nakahara H, Ino Y, Fukuhara H, Kogo M, Todo T: Therapeutic efficacy of oncolytic virus G47 $\Delta$  for oral squamous cell carcinoma in orthotopic tongue cancer models. 第72回日本癌学会学術総会（横浜）、2013年10月4日。
  15. Kakutani S, Fukuhara H, Takeshima Y, Homma H, Ino Y, Todo T: Antitumor efficacy of oncolytic HSV-1 (G47 $\Delta$ ) for testicular cancer. (がん治療用 HSV-1 (G47 $\Delta$ ) の精巣腫瘍に対する抗腫瘍効果)。第72回日本癌学会学術総会（横浜）、2013年10月4日。
  16. 藤堂 具紀、福原 浩、稲生 靖：ウイルス療法の臨床開発。第72回日本癌学会学術総会（横浜）、2013年10月5日。
  17. Uchihashi T, Nakahara H, Ino Y, Fukuhara H, Kogo M, Todo T: A new therapeutic strategy for oral squamous cell carcinoma using oncolytic herpes simplex virus G47 $\Delta$ . The 9th China-Japan Joint Laboratory Workshop — Pathogenesis, Gene Regulation and Signal Transduction—, Beijing. Nov 1, 2013.
  18. Todo T: Clinical development of third generation oncolytic HSV-1. The 7th Annual Meeting of Korean Society of Gene and Cell Therapy,

- Seoul. Nov 22, 2013.
19. 藤堂 具紀：がんのウイルス療法の  
実用化と課題。第34回日本臨床薬理  
学会（東京）、2013年12月4日。
  20. 田中 実、伊藤 元一、稲生 靖、藤堂 具  
紀：12月9日、G47Δを用いた嗅神経芽細胞  
腫の臨床試験。第31回日本脳腫瘍学会学術  
集会（宮崎）、2013年12月9日。
  21. 伊藤 元一、稲生 靖、田中 実、伊藤 博  
崇、藤堂 具紀：がん治療用ウイルス  
(G47Δ)とマイクロRNA阻害を併用した  
悪性グリオーマ治療の開発。第31回日本  
脳腫瘍学会学術集会（宮崎）、2013年12  
月9日。
  22. 内橋 俊大、中原 寛和、古郷 幹彦  
、稲生 靖、藤堂 具紀：第三世代がん  
治療用単純ヘルペスウイルス I 型  
G47Δを用いた口腔扁平上皮癌に対す  
る新規治療戦略。第32回日本口腔腫瘍  
学会総会・学術大会（札幌）、2014年1  
月24日
  23. 古川洋一：次世代シーケンサーが  
もたらす近未来の医療。第19回日本家族  
性腫瘍学会学術集会 2013年7月27日  
大分
  24. 古川洋一：患者さんひとりひとりの  
治療のために。第22回日本癌学会市民公  
開講座 2013年10月5日 横浜
  25. 長村文孝 細胞療法への臨床試験支  
援組織の取り組み～免疫療法を中心と  
して 第5回造血器腫瘍免疫療法研究会  
学術集会
  26. 藤田由利子、小野敏明、落合央、Ann M  
Lee、長村文孝、高橋聡、森尾友宏 実  
臨床応用に向けたウイルス特異的細胞  
障害性T細胞療法の開発 第5回造血器  
腫瘍免疫療法研究会学術集会
  27. M Nojima, Y Aoki, H Yasui, R  
Maruyama, E Yamamoto, H Asaoku, T  
Tokino, F Nagamura, T Ishida, K Imai,  
Y Shinomura, H Suzuki 多発性骨髄腫に  
おけるLINE-1異常低メチル化と臨  
床遺伝子学的特徴の相関 第72回 日  
本癌学会学術総会
  28. Oida K, Nishikawa S, Tanaka A,  
Matsuda H. NF-kappa B, a new target  
molecule in treatment of  
mesothelioma. 18th World Congress on  
Advances in Oncology, 2013, Greek.
  29. Tanaka A, Matsuda A, Amagai Y,  
Matsuda H. The role of splicing  
factors in glucocorticoid  
sensitivity in neoplastic  
lymphocytes. 18th World Congress on  
Advances in Oncology, 2013, Greek
  30. 雨貝陽介、田中あかね、松田浩珍、他  
。KIT細胞膜外ドメインの点変異による  
肥満細胞の腫瘍化。第156回日本獣医学  
会学術集会、岐阜
  31. Nishikawa S, Tanaka A, Matsuda H.  
NF-k B as a chemotherapeutic target  
molecule for human malignant  
mesothelioma. EAACI-WAO Congress  
2013, Italy 32. Tanaka A, Matsuda A,  
Matsuda H. Splicing regulation of  
glucocorticoid receptor isoforms in  
lymphocytes with glucocorticoid  
resistance. EAACI-WAO Congress 2013,  
Italy
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
1. 特許出願  
特願 2012-087958：癌治療のための組換え  
麻疹ウイルス（発明者：甲斐知恵子、米  
田美佐子、杉山貴紹）
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）  
（分担）研究報告書

高品質な癌治療用組換え麻疹ウイルスの製造に関する研究

研究分担者 藤堂 具紀 東京大学医科学研究所教授  
研究分担者 稲生 靖 東京大学医科学研究所准教授

研究要旨

癌治療用組換え麻疹ウイルスの製造を、医科学研究所附属病院治療ベクター開発室において行うための体制整備を開始した。すなわち、ウイルス製造用のマスターセルバンクおよびワーキングセルバンクを構築するべく、標準作業手順書の整備と製造作業従事者の教育訓練用資料の準備とを開始した。標準作業手順書については、手順の確認および改訂のための試験作業を一部実施した。セルバンク構築後に組換え麻疹ウイルスの製造を速やかに行うべく、カルタヘナ法第二種使用大臣確認申請の準備を開始した。製造されたセルバンクシステムが充足すべき、日本薬局方および日米欧医薬品規制調和国際会議の規定について最新の記載内容を確認し、セルバンク製造作業における品質試験提出用中間産物の採取計画の準備を行った。

A. 研究目的

がん特異的に複製するウイルスをがん細胞に感染させ、ウイルス複製による直接的な殺細胞作用を利用してがんの治療を図るウイルス療法は、全く新しい概念に基づく治療法である。高い抗腫瘍活性を維持しつつ正常組織に対する安全性を確保するためには、ウイルスの複製が腫瘍細胞特異的であることが重要である。本研究で使用する rMV-SLAMblind は野生型の麻疹ウイルスが感染することのできる SLAM への結合能を欠いており、正常細胞には感染せず、よって正常細胞に対しては細胞毒性を示さない。rMV-SLAMblind は乳癌細胞など PVRL4 を発現する腫瘍細胞には感染し、殺細胞効果を呈する。

rMV-SLAMblind を臨床研究に使用するには GMP 基準でのウイルス調製を行う必要がある。ウイルス液の製造は医科学研究所附属病院治療ベクター開発室において行う。品質検査のための中間産物採取計画を含めた標準作業手順書(SOP)の制定の後、マスターセルバンク、マスターウイルスシードストックの調製を経て、臨床用ウイルスの製造に進む計画である。

B. 研究方法

GMP対応にてマスターセルバンクおよびワーキングセルバンクを作成するための体制の整備を行う。製造に使用する装置や細胞培養用器具の選定を行い、標準作業手順書を整備する。十分な品質と安全性を備え

たセルバンクシステムとすべく、原料材料の選定に際しては現行の指針や通達等の規定を確認する。作製後のセルバンクシステムの品質検査項目や保管方法についても、現行の指針や通達等の規定を充足すべく計画する。

（倫理面への配慮）本研究は、遺伝子組換え実験等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）（平成 15 年法律第 97 号）、研究開発等に係る遺伝子組換え実験等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令（平成 16 年文部科学・環境省令第 1 号）を遵守して行われる。研究の進展に伴い臨床研究や治験に進む際には、遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成 14 年 3 月 27 日、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 20 年 12 月 1 日一部改正、文部科学省・厚生労働省）や遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令（平成 16 年財務・厚生労働・農林水産・経済産業・環境省令第 1 号、一部改正：平成 18 年 6 月 6 日財務・厚生労働・農林水産・経済産業・環境省令第 2 号）も参照する。臨床研究に関する倫理指針には該当せず、ヒト ES 細胞を用いる研究にも該当しない。分担研究者らは動物実験は担当せず、該当しない。

C. 研究結果

分担研究者らは学内の P2 対応 GMP 施設（治療ベクター開発室）において遺伝子組

換え単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)の臨床用製剤を製造した経験があり、ウイルス製造用のマスターセルバンクの製造についての経験を有している。過去の製造においては、すでに多くの品質検査を終えたうえで WHO から供与されている WHO-Vero 細胞を出発点として使用したが、当時の入手元である理化学研究所バイオリソースセンターは現在は WHO-Vero 細胞(WRC0002)の分譲を停止しており、再入手は不可能であった。欧州の European Collection of Cell Cultures (ECACC)も分譲を行っており、かつては国内代理店である DS ファーマバイオメディカル(株)の手配により購入が可能であったが、今回は ECACC と直接交渉し許可を得ることが必要とされた。ECACC 担当者とは時間をかけて交渉を重ねたが、分譲の承認にはさらに時間を要する見通しとなり、研究を効率的に推進するためにこの入手経路は断念した。米国の American Type Culture Collection (ATCC)も WHO-Vero 細胞を所持しており、担当責任者の承認が得られれば分譲を受けられるが、こちらも ECACC と同様担当者との交渉に長時間を要する状態であった。結局、過去の医薬品製造に使用された実績も確認のうえ、ATCC から分譲されている通常の Vero 細胞(CCL-81)を使用することとした。

セルバンクが充足すべき基準としては、次のものを参照した。細胞・組織を利用した医療機器又は医薬品の品質及び安全性の確保について(医薬発第906号平成11年7月30日(一部改正 薬食発第0518001号平成21年5月18日)、ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について(医薬発第1314号平成12年12月26日)、生物由来原料基準(平成15年厚生労働省告示第210号)、遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について(薬発第1062号平成7年11月15日)、遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針の改正について(医薬発第0329004号平成14年3月29日)、遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針の一部改正について(薬食発第1228004号平成16年12月28日)、治験薬の製造管理、品質管理等に関する基準(治験薬GMP)について(薬食発第0709002号平成20年7月9日)、生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の規格及び試験方法の設定について(ICH-Q6B)(医薬審発第571号平成13年5月1日)、「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」について(ICH-Q5A)(医薬審第329号平成12年2月22日)、医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準(厚生労働省令第

179号、平成16年12月24日)。

#### D. 考察

所内GMPベクター調製施設では臨床用セルバンク調製の実績があり、今回製造予定のものについても過去の手順書等の応用が可能である。今回、開始原料としてWHO-Vero細胞ではなくATCC CCL-81を使用することになったが、CCL-81から作成されたマスターセルバンクにより製造されたワクチンが国内において医薬品として承認されていることから、品質は保証されていると考えた。GMP施設に搬入する前の非GMP施設における細胞への遺伝子導入に際しても、その過程で使用する原材料に生物由来原料が含まれる場合においては慎重な管理を行うべく、該当する基準等に注意が払われる。

#### E. まとめ(結論)

癌治療用組換え麻疹ウイルスの臨床用ウイルス製造にむけて、マスターセルバンク調製に必要な事項の整備をおこなった。GMP対応でのセルバンク作製のために必要な書類および手続きの準備が行われている。次年度およびそれ以降に、マスターセルバンクおよび臨床用ウイルス調製を行うべく準備が進んでいる。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① Tsuji T, Nakamori M, Iwahashi M, Nakamura M, Ojima T, Iida T, Katsuda M, Hayata K, Ino Y, Todo T, Yamaue H: An armed oncolytic herpes simplex virus expressing thrombospondin-1 has an enhanced in vivo antitumor effect against human gastric cancer. *Int J Cancer* 132 (2): 485-494, 2013 (published online 2012 Jun 22. doi: 10.1002/ijc.27681).
- ② Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Todo T, Ino Y, Saito N, Aburatani H, Funato K, Echizen K, Sugano H, Haruta R, Matsui M, Takahashi R, Manabe E, Oda T, Akiyama T: The critical role of cyclin D2 in cell cycle progression and tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* 32 (33): 3840-3845, 2013 (published online 2012 Sep 10. doi: 10.1038/onc.2012.399).

- ③ Tanaka M, Tsuno NH, Fujii T, Todo T, Saito N, Takahashi K: Human umbilical vein endothelial cell vaccine therapy in patients with recurrent glioblastoma. *Cancer Sci* 104 (2): 200-205, 2013 (Epub 2012 Oct 27. doi: 10.1111/cas.12055).
- ④ Shibui S, Narita Y, Mizusawa J, Beppu T, Ogasawara K, Sawamura Y, Kobayashi H, Nishikawa R, Mishima K, Muragaki Y, Maruyama T, Kuratsu J, Nakamura H, Kochi M, Minamida Y, Yamaki T, Kumabe T, Tominaga T, Kayama T, Sakurada K, Nagane M, Kobayashi K, Nakamura H, Ito T, Yazaki T, Sasaki H, Tanaka K, Takahashi H, Asai A, Todo T, Wakabayashi T, Takahashi J, Takano S, Fujimaki T, Sumi M, Miyakita Y, Nakazato Y, Sato A, Fukuda H, Nomura K: Randomized trial of chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy with nimustine (ACNU) versus nimustine plus procarbazine for newly diagnosed anaplastic astrocytoma and glioblastoma (JCOG0305). *Cancer Chemother Pharmacol* 71 (2): 511-512, 2013 (Epub 2012 Dec 11. doi:10.1007/s00280-012-2041-5)
- ⑤ Koyama-Nasu R, Hruta R, Nasu-Nishimura Y, Taniue K, Katou Y, Shirahige K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Matsui M, Takahashi R, Hoshino-Okubo A, Sugano H, Manabe E, Funato K, Akiyama T: The pleiotrophin-ALK axis is required for tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* (Epub 2013 May 20. doi: 10.1038/onc.2013.168).
- ⑥ Echizen K, Nakada M, Hayashi T, Sabit H, Furuta T, Nakai M, Koyama-Nasu R, Nishimura Y, Taniue K, Morishita Y, Hirano S, Terai K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Takayanagi S, Ohtani R, Saito N, Akiyama T: PCDH10 is required for the tumorigenicity of glioblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 444(1): 13-18, 2014 (Epub 2014 Jan 6. Doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.138).
2. 学会発表
- ① 藤堂 具紀：がんのウイルス療法の開発。第112回日本皮膚科学会総会（横浜）、2013年6月14日。
- ② 藤堂 具紀：悪性グリオーマに対するウイルス療法の臨床開発。第12回小児脳瘍研究会（大阪）、2013年6月29日。
- ③ Uchihashi T, Nakahara H, Ino Y, Todo T : A new therapeutic strategy for oral squamous cell carcinoma using oncolytic herpes simplex virus type 1. 第19回日本遺伝子治療学会年次学術集会（岡山）、2013年7月4日。
- ④ Kakutani S, Fukuhara H, Takeshima Y, Homma H, Ino Y, Todo T : Oncolytic virus therapy using recombinant HSV-1 for nonseminoma germ cell tumors. 第19回日本遺伝子治療学会年次学術集会（岡山）、2013年7月4日。
- ⑤ 藤堂 具紀、田中 実、伊藤 元一、福原 浩、稲生 靖：Clinical development of a third-generation recombinant oncolytic HSV-1 (G47Δ) for brain tumors and rare cancers. 第19回日本遺伝子治療学会年次学術集会（岡山）、2013年7月4日。
- ⑥ 藤堂 具紀：がんのウイルス療法の臨床開発。第17回日本がん免疫学会総会（山口）、2013年7月4日。
- ⑦ Uchihashi T, Nakahara H, Ino Y, Fukuhara H, Kogo M, Todo T : Therapeutic efficacy of oncolytic virus G47Δ for oral squamous cell carcinoma in orthotopic tongue cancer models. 第72回日本癌学会学術総会（横浜）、2013年10月4日。
- ⑧ Kakutani S, Fukuhara H, Takeshima Y, Homma H, Ino Y, Todo T : Antitumor efficacy of oncolytic HSV-1 (G47Δ) for testicular cancer. (がん治療用HSV-1(G47Δ)の精巣腫瘍に対する抗腫瘍効果)。第72回日本癌学会学術総会（横浜）、2013年10月4日。
- ⑨ 藤堂 具紀、福原 浩、稲生 靖：ウイルス療法の臨床開発。第72回日本癌学会学術総会（横浜）、2013年10月5日。
- ⑩ Uchihashi T, Nakahara H, Ino Y, Fukuhara H, Kogo M, Todo T: A new therapeutic strategy for oral squamous cell carcinoma using oncolytic herpes simplex virus G47Δ. The 9th China-Japan Joint Laboratory Workshop — Pathogenesis, Gene Regulation and Signal Transduction—, Beijing. Nov 1, 2013.
- ⑪ Todo T : Clinical development of third generation oncolytic HSV-1. The 7th Annual Meeting of Korean Society of Gene and Cell Therapy, Seoul. Nov 22, 2013.
- ⑫ 藤堂 具紀：がんのウイルス療法の実用化と課題。第34回日本臨床薬理学会（東京）、2013年12月4日。

- ⑬ 田中 実、伊藤 元一、稲生 靖、藤堂 具紀：12月9日、G47Δを用いた嗅神経芽細胞腫の臨床試験。第31回日本脳腫瘍学会学術集会（宮崎）、2013年12月9日。
- ⑭ 伊藤 元一、稲生 靖、田中 実、伊藤 博崇、藤堂 具紀：がん治療用ウイルス（G47Δ）とマイクロRNA阻害を併用した悪性グリオーマ治療の開発。第31回日本脳腫瘍学会学術集会（宮崎）、2013年12月9日。
- ⑮ 内橋 俊大、中原 寛和、古郷 幹彦、稲生 靖、藤堂 具紀：第三世代がん治療用単純ヘルペスウイルス I 型G47Δを用いた口腔扁平上皮癌に対する新規治療戦略。第32回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会（札幌）、2014年1月24日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

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

癌治療用組換え麻疹ウイルスの安定性に関する研究

研究分担者 古川 洋一 東京大学医科学研究所教授

研究要旨

本研究では、癌治療用組換え麻疹ウイルス (rMAV-SLAMblind) 株の安全性を検証するために、効果的な麻疹ウイルスの全ゲノム解析法開発を行った。次世代シーケンサーと麻疹ウイルスゲノムを特異的に増幅するプライマーセットを用いた amplicon sequencing により、全ゲノムを約6万円の費用で4日以内に解読するシステムを整備した。このシステムを用いて、親株となるHL株のゲノムに突然変異はなく、作製されたrMAV-SLAMblind株には、H遺伝子に導入した塩基置換がウイルスゲノム配列の100%に存在すること、加えて他に変異を認めないことを示した。これらの結果は、rMAV-SLAMblind株に導入した変異が保持されていること、ウイルスの安全性検証が迅速かつ効果的に行えることを示唆している。

A. 研究目的

癌治療用に用いられるウイルスには、ウイルス自体の感染により効果を発揮するOncolytic virusや、遺伝子治療の運び屋として用いられるvirus vectorがある。いずれのウイルスの場合も、ヒトへの利用に際して安全性を確保するためには、virusの性質が変化していないことを確認する必要がある。短いライフサイクルをもつウイルスは、培養等におけるウイルスの増殖の際に、ゲノムに突然変異が生じて性質が変化する可能性がある。そこで安全性の確認のためには、ウイルスゲノムの変化をシーケンシング解析により検討することが望ましい。従来のサンガー法によるシーケンシング解析では、一度の解析で決定できる塩基配列はせいぜい500~600塩基であり、1万塩基を越えるウイルスゲノムの全配列を解析するには、かなりの費用（十万元以上）と多くの労力を要した。しかも、20%以下の微量なゲノム変異の検出は困難であった。しかし近年発展した次世代シーケンサーでは、一度に膨大な塩基配列を解析することが出来、しかもコストダウンが進んでいるため比較的安価に解析が可能となった。また同一箇所の変異を数十回~数百回解析するため、頻度の低い配列変化も検出することが出来る。そこで本研究では、乳がん等の治療のために開発されたoncolytic virusであるrMAV-SLAMblindの全ゲノム配列を、次世代シーケンサーを用いて網羅的かつ効率的に解析するシステムを開発し、同ウイルスの臨床応用に対する安全性評価を可能

とすることを目的としている。

B. 研究方法

本研究の代表研究者である甲斐教授らの作製した組換え麻疹ウイルス (SLAMblind) 株は、野生型麻疹ウイルス (HL) 株のhemagglutinin (H) 遺伝子を改変し、リンパ球などの免疫細胞が発現する細胞膜分子signaling lymphocyte activation molecule へのウイルス結合能を欠失した変異株である。この変異株のゲノムは、H遺伝子のコドン533の塩基配列がAGGからGCAへ改変されており、この部分のアミノ酸がアルギニン (R) からアラニン (A) へと変化する (p. R533A)。この組換えウイルスは、免疫担当細胞への感染が低下していることが報告されており、ヒトに投与しても免疫担当細胞へは感染しにくく、副作用が起こりにくいと考えられる。本組換えウイルスの性質を遺伝学的見地から調べるため、ライフテックノロジー社のIon PGM次世代シーケンサーを用いて次の二つの課題を検討することとした。

- 1) 組換えウイルス (SLAM blind) ゲノムに導入した変異 (p. R533A) が、ウイルスゲノムのほぼ100%を保存されていかどうか検討する。
- 2) 組換えウイルス (SLAM blind) ゲノムに、一度導入した変異 (p. R533A) 以外の突然変異が起きていないか検討する。  
(倫理面への配慮)

本研究はヒト臨床検体を用いない。また調



べるゲノムもウイルスゲノムであり、とくに倫理面への配慮は不要である。

### C. 研究結果

#### 1. 解析手法の確立

まず麻疹ウイルスゲノムを、互いにオーバーラップする9領域に分け、それぞれの領域を増幅するPCRプライマーセットを合成した。ウイルスRNAを逆転写して作製したcDNAをテンプレートとして、上記プライマーセットを用いて増幅した。PCR産物を確認し、Ion PGMのためのamplicon sequenceライブラリーを調整した。

#### 2. ML株の全ゲノム解析

まずテスト解析として、HL株の全ゲノム解析を行った。Ion PGM 314チップを用いて解析した結果、すべての領域の塩基配列を200回以上の重複で読むことができた。またPCRから配列決定までにかかる期間は、4日間であった。コストも、定価ベースで約6万円であった。得られた配列には、homopolymer部分のエラーが3か所で認められたが、すべてSanger法にて異常がないことが確認された。解析したHL株のゲノム配列には、新たな変異は認めなかった。

#### 3. SLAM blind株の全ゲノム解析

SLAM blind株についても、HL株と同様の方法で全ゲノム解析を行った。その結果、コドン533部分の配列はcoverage=約390にて解読されており、100%にAGGからGCAへ変異(p. R533A)が認められた。その他の領域に関してはcoverage>70で解読でき、変異を認めなかった。

### D. E. 考察と結論

本解析で用いたHL株は、SLAM blind株作製に用いられた親株である。HL株とSLAM blind株の比較から、正しく変異株のゲノムが改変されていることが確認された。また、全ゲノム領域にわたって塩基配列を決定し、SLAM blind株のコドン533以外に、新たな突然変異が加わっていないことが確認できた。このことは、この組換えウイルスの安定性を裏付けるものである。

また本研究により、治療用組換え麻疹ウイルスのゲノムを効率的に解読できる体制が整えられた。次世代シーケンサーによる解析法が、感度や、費用・簡便性の点で従来の解析法より優れていることが示唆された。

### F. 健康危険情報 なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- ① Takahashi N, Yamaguchi K, Ikenoue T, Fujii T, Furukawa Y. Identification of two Wnt-responsive elements in the intron of RING Finger Protein 43 (RNF43) gene. PLoS ONE, 9: e86582, 2014.

- ② Yamaguchi K, Rui Yamaguchi R, Takahashi N, Ikenoue T, Fujii T, Shinozaki M, Tsurita G, Hata K, Niida A, Imoto S, Miyano S, Nakamura Y, Furukawa Y. Overexpression of cohesion establishment factor DSCC1 through E2F in colorectal cancer. PLoS ONE, 9: e85750, 2014.

- ③ Shigeyasu K, Tanakaya K, Nagasaka T, Aoki H, Fujiwara T, Sugano K, Ishikawa H, Yoshida T, Moriya Y, Furukawa Y, Goel A, Takeuchi H. Early detection of metachronous bile duct cancer in Lynch syndrome: report of a case. Surg Today. Jul 31, Epub, 2013.

- ④ Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, Michizuki 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(8):3023-3028, 2013.

#### 2. 学会発表

- ① 「次世代シーケンサーがもたらす近未来の医療」(第19回日本家族性腫瘍学会学術集会 2013年7月27日 大分)
- ② 「患者さんひとりひとりの治療のために」(第22回日本癌学会市民公開講座 2013年10月5日 横浜)

### H. 知的財産権の出願・登録状況

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

癌治療用組換え麻疹ウイルス開発における規制対応に関する研究

研究分担者 長村 文孝 東京大学医科学研究所教授

研究要旨

本研究は、研究代表者が開発した遺伝子組換え麻疹ウイルスをがん治療法の医薬品として開発することを目指し、必要な非臨床試験の立案と規制対応を目的とする。組換え麻疹ウイルスは本邦では遺伝子治療に分類されるが、治験を実施するために必要な非臨床試験の種類やその方法に関する法規・ガイドラインは十分に発出されているとはいえず、適切な実施のためには情報の収集が欠かせない。本年度はこのような情報を収集し、本研究に活用した。

A. 研究目的

遺伝子組換え麻疹ウイルスの臨床試験開始に必要な非臨床試験の立案とそれに必要な規制情報の収集と検討を行い、研究期間内に必要な非臨床試験を終了する。

B. 研究方法

医薬品医療機器総合機構（PMDA）、米国FDA（Food and Drug Administration）及びEMA（European Medicinal Agency）等の規制当局の発出している法規・ガイドライン、審査報告書等の資料あるいは論文・学会等での資料の収集と解析を行い、必要に応じて規制当局の担当者と接触し意見の聴取を行った。

（倫理面への配慮）  
該当せず

C. 研究結果

腫瘍溶解ウイルスについてのガイドラインは、ICH（International Conference on Harmonization）が2009年にConsiderationsとして発出したがその後進展がみられていない。一方、米国FDAは、非臨床試験のガイダンスとして”Guidance for Industry: Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products”を2013年11月に最終的に発出し、2013年6月に早期臨床試験用のドラフト・ガイダンスとして”Considerations for the Design of Early-Phase Clinical Trials of Cellular and Gene Therapy Products DRAFT GUIDANCE”を発出している。ICH Considerationは技術的な評価にかなり踏み込んだ記載がなされているが、FDAのガイダンスは、個々の治療概念によって、従来の知見が外挿できる部分とそうでない部分が存在していること

を前提に、非臨床試験の限界をどのように見極め、臨床試験でのリスクを最小化するかという観点でまとめられている。ただし、FDAの後者のガイドラインに関する諮問委員会が2014年2月に開催され、早期に最終化され発出される可能性が高い。これらの発出までの期間は従来よりも相当短縮されており、今後の継続的な情報収集が不可欠であると考えられる。本研究で用いられる遺伝子組換え麻疹ウイルスは、国内では治験実施例がないため上記ガイダンスを参照しながら、薬事戦略相談を実施し非臨床試験のデザインを取りまとめていくことが妥当であると考えられた。

Targeted Anticancer TherapiesではFDAの審査官と質疑を行い、ガイドラインは開発の方針・方向性を示すものであり、詳細は規制当局との相談によるべきであるとの見解が得られた。そして分子標的療法は現在の有力な開発分野であるが遺伝子的にも多様な固形がん、特にトリプルネガティブ乳がんのようなハイリスクで特定の系に依存しない腫瘍溶解ウイルス療法のような癌に対しては開発を積極的に進める事が必要であり、ただ従来の抗がん剤とは異なるゲノム情報の関与はありえるので検体保存の必要性が強調されていた。

本研究では、出口として医師主導治験の実施とそれによる企業導出を目指している。そのため国内での腫瘍溶解ウイルスの開発状況も調査を行った。国内では自然変異型HSV-1と遺伝子改変5型アデノウイルスが開発されている。前者は米国で第一相試験が実施され国内では遺伝子治療臨床研究に関する指針で実施されている。後者は韓国と米国で第一相試験が実施され遺伝子指針下で実施されている。後者は韓国

と米国で第一相試験が実施され遺伝子指針下で実施されている。国内の実施例を参考にはできかねる状況であり、国内動向についても情報を収集し、国際会議等にはできるだけ参加していく必要がある。

#### D. 考察

第二世代HSV-1にGM-CSF産生遺伝子を修飾した製剤が第三相試験を経て今年度中には米国にて承認と言われている。承認されれば、世界初の承認薬剤となり、腫瘍溶解ウイルス療法は開発が飛躍的に進むと考えられている。現在のところ各国の規制当局から発出されているガイドライン等のうち、非臨床試験に関しては米国FDAから発出された”Guidance for Industry: Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products”が具体的内容を伴いファイナライズされた唯一のものである。とはいえ、技術的な内容に踏み込んでおらず、今後本研究を進めていくうえでは不十分であり、製造、品質、規格については十分な事前の検討を踏まえた上での規制当局との相談が不可欠である。本研究の利点の1つとして東京大学医科学研究所は治療ベクター開発室を有し、臨床用製剤の製造経験を有していることである。来年度は、非臨床用製剤の製造にはいることから、十分な連携が必要であると考えられた。

#### E. 結論

新規性の非常に高い組換え麻疹ウイルスの非臨床試験の実施に関して、国内外の規制に関する情報を収集し、今後の開発に関して検討を行った。現在のところ、大きな障壁はないものの継続的な情報収集と検討は必要であり、開発段階にあわせて薬事戦略相談を研究分担者が医薬品医療機器総合機構と薬事戦略相談を行いながら非臨床試験の完遂を来年度以降継続していく。

#### F. 健康危険情報

該当せず

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

①Mae H, Ooi J, Takahashi S, Kato S, Kawakita T, Ebihara Y, Tsuji K, Nagamura F, Echizen H, Tojo A. Acute kidney injury after myeloablative cord blood transplantation in adults: the efficacy of strict monitoring of vancomycin serum trough concentrations. *Transplant Infect Dis* 15:181-6, 2013.

##### 2. 学会発表

①長村文孝 細胞療法への臨床試験支援組織の取り組み～免疫療法を中心とし

て 第5回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会

② 藤田由利子、小野敏明、落合央、Ann M Lee、長村文孝、高橋聡、森尾友宏 実臨床応用に向けたウイルス特異的細胞障害性T細胞療法の開発 第5回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会

③ M Nojima, Y Aoki, H Yasui, R Maruyama, E Yamamoto, H Asaoku, T Tokino, F Nagamura, T Ishida, K Imai, Y Shinomura, H Suzuki多発性骨髄腫におけるLINE-1異常低メチル化と臨床遺伝子学的特徴の相関 第72回 日本癌学会学術総会

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

癌治療用組換え麻疹ウイルスのイヌでの有効性に関する研究

研究分担者 松田 浩珍 東京農工大学教授  
研究分担者 田中あかね 東京農工大学教授

研究要旨

乳癌細胞のみに侵入して癌細胞を破壊する遺伝子組換え麻疹ウイルスrMV-SLAMblindを、乳癌の革新的治療法として確立するため、ヒトと同様に乳癌を自然発症するイヌを用いた非臨床試験を実施して、開発したウイルスの臨床的有効性と問題点とを明らかにすることを目的とする。本年度は、非臨床試験開始のための制度設定、法規対応およびサンプル収集など準備を整えた。

A. 研究目的

伴侶動物であるイヌに自然発症する乳癌に対する組換え麻疹ウイルスrMV-SLAMblindの有効性を調べるために、平成26年度より非臨床試験を開始する予定である。平成25年度は、その第一段階として、以下の研究および制度設定、準備を行った。

- 1) 組換え麻疹ウイルスが細胞への侵入の足がかりとするPVRL4の発現を調べるために、イヌの乳癌組織サンプル（外科手術摘出組織）を収集した。
- 2) 伴侶犬に対して臨床動物研究を行うために、東京農工大学動物医療センターにおけるイヌ臨床研究に関する制度作りを行った。
- 3) 東京農工大学における遺伝子組み換えウイルスの取り扱い規定に従い、施設設備の整備および届け出の準備を開始した。

B. 研究方法

- 1) イヌ臨床サンプルの収集： 東京農工大学動物医療センター、あるいは、近隣の動物病院および他大学の付属動物診療施設へ、広く乳癌サンプルの提供を呼びかけた。
- 2) 臨床動物試験あるいは動物に対する治療に関する制度の新設とそれに伴う規則改正： ヒトの臨床研究や治療に関する倫理規定を参考に、東京農工大学における伴侶動物を用いた臨床動物研究や治療に関する制度を作成した。
- 3) イヌ乳癌細胞の遺伝子発現解析： 採取したイヌ乳癌組織より、RNAを抽出して、逆転写によりcDNAを作成、PCR法を用いてPVRL4の発現を解析する条件検討を実施した。また、血管新生因子など、乳癌細胞の悪性形質を示す遺伝子の発現解析の条件を検討した。

C. 研究結果

- 1) イヌ臨床サンプルの収集： 初発あるいは、再発性の乳癌と診断され、摘出手術を受けたイヌの乳癌サンプルを、冷蔵で保存し、手術直後に回収した。サンプルの収集については、飼い主へのインフォームドコンセントおよび動物倫理に十分配慮した。
- 2) 制度の新設とそれに伴う規則改正： 伴侶動物を用いた臨床動物研究や治療に関する倫理規定が承認され、平成26年4月9日より施行された。
- 3) イヌ乳癌細胞の遺伝子発現解析： 採取したイヌ乳癌組織においてPVRL4の発現が確認された。また、血管新生因子などの遺伝子の発現解析の条件を適化した。

D. 考察

平成26年度より、組換え麻疹ウイルスを用いたイヌ臨床研究（非臨床試験）を開始するための制度が新設されたが、これは全国の獣医系大学において初の制度化例である。今後は、この制度に則り、臨床試験計画を立案し、承認を得ていくこととなるが、再発や転移があり、他に有効な治療法がない乳癌イヌ症例を対象とするため、症例の確保が重要となるものと考えられる。また、遺伝子組み換えウイルスの安全な取り扱いのために、専用の機器や場所の準備を進める。

E. 結論

乳癌を自然発症する伴侶犬を用いる臨床動物研究（非臨床試験）を開始するための、動物倫理に十分配慮した制度が策定され、非臨床試験の準備が整った。また、イヌの乳癌細胞ではPVRL4が発現しているこ