

201407008A

別紙1

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

難治がんに対する標的バイオ医薬の探索技術の確立と
開発研究を支援する研究基盤の構築 (H23-政策探索-一般-009)

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 青木 一教

平成27(2015)年 5月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告	
難治がんに対する標的バイオ医薬の探索技術の確立と 開発研究を支援する研究基盤の構築	1
青木 一教	
II. 分担研究報告	
1. がんに対する標的ベクターの網羅的探索	13
青木 一教	
2. 転写制御等を利用した腫瘍標的ベクターの構築と それによる抗腫瘍効果の検討	18
田川 雅敏	
3. 標的ベクターに関する細胞表面分子の探索	25
内田 宏昭	
4. アデノウイルスベクターに対する生体反応の解析	28
水口 裕之	
5. 標的ベクターの臨床面からの検討と評価	33
水野 正明	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	36
IV. 研究成果の刊行物・別刷	別添

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

難治がんに対する標的バイオ医薬の探索技術の確立と
開発研究を支援する研究基盤の構築

研究代表者 青木 一教 国立がん研究センター研究所遺伝子免疫細胞医学研究分野・分野長

研究要旨

本研究では、がんを標的するバイオ医薬（ベクター）の探索技術を、ベクター構造・腫瘍細胞・生体反応の3つの観点から開発し、生体内での効果と安全性に優れたがん標的ベクターや腫瘍溶解ウイルスを開発することを目的としている。本年度は、以下の研究成果を得た。①サバイビン転写調節領域により増殖を制御する腫瘍溶解アデノウイルスに、膵がん標的リガンドを組み合わせた、膵がん標的腫瘍溶解ウイルス (AdSur-SYE) を構築した。ヒト膵がん切除標本由来の膵がん細胞に AdSur-SYE を感染すると、腫瘍溶解効果は非標的ベクターと比較して著明に増強しており、臨床応用に資するベクターであることを示した。②E4 遺伝子の 3' 非翻訳領域に肝臓特異的 miRNA である miR-122a を挿入した Ad-E4-122aT は、後期の肝障害のみならず自然免疫活性化によって引き起こされる早期の肝障害も有意に抑制できることを明らかとした。③がん細胞表面の特異抗原を探索するシステムとして、従来用いてきたファイバー変異型 Ad 系に加えて、抗体結合変異型単純ヘルペスウイルスベクターを探索プローブに用いた抗体スクリーニング法の樹立に成功し、すでに 30 クローンの抗体を選抜・樹立した。④p53 経路の活性化により腫瘍溶解アデノウイルスによるアポトーシスが増強し、細胞障害活性の相乗効果が得られることを示した。⑤将来的な標的ベクターの臨床応用を目指し、第一段階として悪性中皮腫を対象に非増殖性アデノウイルスによる臨床研究を計画し、現在実施に向けて患者のリクルートに入った。また、腫瘍標的型アデノウイルスベクターの GMP 製造法を確立するため、必要な手順書等のリスト化と文書化を行った。さらに腫瘍標的型 Ad ベクターの製造法の確立においては、製造過程で生じる余剰の腫瘍標的型 Ad ベクターや生物材料を適切に処理する方法の基礎を確立した。

研究分担者

青木 一教 国立がん研究センター研究所
分野長
田川 雅敏 千葉県がんセンター研究所
部長
内田 宏昭 東京大学医科学研究所
講師
水口 裕之 大阪大学大学院
教授
水野 正明 名古屋大学医学部附属病院
教授

な基盤技術となる。本研究では、1. 個別化した腫瘍を標的する遺伝子医薬（ベクター）の探索技術の開発と、2. その応用例としての腫瘍標的ベクターの探索、3. 腫瘍標的ウイルスの臨床応用、を3つの柱とし、サブテーマを分担しながら情報・技術の交換を行いつつ統合的に研究を推進する。

1. 腫瘍標的ベクターの探索技術の開発

ベクターの感染性はがん種での違いが大きいため、標的化腫瘍溶解ウイルスもがん種ごとにあるいは個別化して開発する必要がある。がんを標的するベクターの探索技術を、ベクター構造と生体反応の観点から開発する。ベクターの標的化に関して、独自技術である多種多様なペプチドをウイルスキャプシド上に提示するライブラリーを用いて、がん細胞等を標的するベクターを細胞株や生体内で網羅的に探索する技術

A. 研究目的

生体内でがん細胞を効率よく標的する遺伝子医薬の探索方法は、広く医学・医療に応用可能

を確立した。ついで、腫瘍特異的転写調節領域により増殖を制御する腫瘍溶解 Ad ウイルスに、標的化情報を組み込み、腫瘍の標的化と安全性向上に資することを確認する。生体反応の解析として、免疫応答が Ad 感染効率に及ぼす影響を明らかにし、ウイルス蛋白質発現を抑制することで組織障害性の低い Ad ベクターを開発する。さらに、目的に応じて生体反応を制御可能な新規ベクターの開発につなげる。これらの研究成果を統合し、組織障害性の低い Ad に腫瘍標的化探索技術や可視化技術を統合してベクターの基本骨格を基に、個々の症例に適した標的化腫瘍溶解ウイルスを探索するシステムを確立する。

2. 腫瘍標的ベクターの実際の探索

腫瘍標的ベクター探索の実例として、膵がんや中皮腫細胞に対する標的ベクターを探索し、同定した標的ベクターがヒト切除標本においても実際に標的性・感染性が上昇することを確認した。今後、生体標本等を用いた探索方法を確立する。また、2 種のがん腫の 2 つの病態（腹膜播種・胸腔内播種）の計 4 つのモデルを目標に、生体内スクリーニングにより標的ベクターを開発する。並行して、標的化に適した分子を腫瘍側から検討するために、Ad やイミュノトキシン探索系により、ウイルス感染に有用ながん細胞表面分子の探索を行い、特に有望な分子を標的するベクターの開発を行う。

3. 腫瘍標的ウイルスの臨床応用

本標的化技術の臨床応用の観点から、将来的な悪性中皮腫に対する標的化腫瘍溶解療法の開発を目指し、段階的プロトコールとして非増殖型 Ad ベクター胸腔内投与の臨床試験を開始する。これら Ad ベクターの仕様の決定、検定法、製造法等に関する基盤技術を確立、安全性や有効性を評価する技術やバイオマーカーに基づく評価法を開発するとともに、Proof of Mechanism (POM) の観点から検証を加える。

B. 研究方法

B-1. 腫瘍標的ベクターの探索技術の開発

B-1-1. 標的化リガンドによる腫瘍溶解ウイルスの腫瘍溶解効果と安全性の強化（青木、田川）

多くの固形がんで特徴的に発現が亢進している survivin の転写調節領域によりウイルスの増殖を制御する腫瘍溶解ウイルス (AdSur) のファイバーノブに、膵がん標的リガンド (SYENFSA) を提示する標的化腫瘍溶解ウイルス (AdSur-SYE) を構築した。これらのウイルスは、欠失した E3 領域に EGFP 発現カセットが挿入されており、感染した細胞は EGFP 陽性となる。ま

た、AdSur と AdSur-SYE では、ファイバーノブにおいて自然の感染受容体であるコクサッキーウイルス・アデノウイルス受容体 (CAR) との結合部に 4 か所の点突然変異が挿入され、CAR との結合は野生型と比べて抑制は 100 分の 1 以下に抑制されている。

ヒト膵がん (4 例) の外科切除標本を細切してシングルセル化した後、96 well dish で、 1×10^4 の膵がん細胞を 1×10^4 のマウス胎児性繊維芽細胞 (MEF: mouse embryonic fibroblasts) と共培養し、AdSur、AdSur-SYE、非自己増殖型 Ad ベクター Ad Δ E1-AP 及び野生型のファイバーと野生型の E1 領域をもつ Ad-EGFP を、それぞれ 1×10^3 , 3×10^3 , 1×10^4 , 3×10^4 vp/cell で感染させた。6 日後に、ArrayScan VTI HCS Reader により EGFP 陽性細胞や MUC-1 陽性細胞を観察するとともに、MTT アッセイにより細胞数を計測した。

B-1-2. Ad による自然免疫誘導を抑制する新規ベクターの開発（水口）

E4 遺伝子の 3' 非翻訳領域に肝臓特異的 miRNA である miR-122a を挿入した Ad-E4-122aT を構築した。57B16 マウスに Ad ベクターを 1×10^{11} vector particle (VP)/mouse の投与量で尾静脈内投与した。投与 2 日後に肝臓を回収し Ad ベクターによる肝障害レベルを評価した。さらに Ad ベクター投与後、経時的に血液を回収し、肝障害マーカーである血清中 Alanine aminotransferase (ALT) 値を測定した。

また、Ad ベクター投与後の炎症性サイトカインの発現誘導を検討するために、C57B16 マウスに Ad ベクターを 1×10^{11} vector particle (VP)/mouse の投与量で尾静脈内投与した。投与より 3 時間後、脾臓より全 RNA を回収し、定量的 RT-PCR により各種サイトカイン mRNA 量を定量した。

さらに、Ad ベクター投与後の遺伝子発現効率を検討するために、C57B16 マウスに Mouse secreted alkaline phosphatase (mSEAP) を発現する Ad ベクターを 1×10^{10} infectious titer unit (IFU)/mouse の投与量で尾静脈内投与した。なお、mSEAP 発現のプロモーターとしては、肝臓特異的プロモーターである AHA プロモーター (Apolipoprotein E enhancer + α 1-antitrypsin promoter) を用いた。投与後経時的に血清を回収し、血清中 mSEAP 発現量を定量した。

B-1-3. 腫瘍溶解ウイルスと Ad-p53 の併用効果の検討（田川）

膵がんや悪性中皮腫では p53 遺伝子を発現させると、細胞死が誘導される。本年度は、p53 経路の活性化が腫瘍溶解性ウイルスの細胞死誘

導にどのような影響を与えるか検討した。

本検討で用いるウイルスは、E1 領域の転写調節領域を、約 600bp のヒト遺伝子 midkine (MK) あるいは survivin (Sur) 由来の 5' 側転写調節領域で置換した腫瘍溶解性ウイルス (Ad-MK あるいは Ad-Sur) 及び p53 遺伝子や mda-7 遺伝子を発現する非増殖性アデノウイルスベクター (Ad-p53, Ad-mda-7) であり、タイプ 5 型である。併用実験においては、同じタイプ同士のウイルスでは受容体との結合をめぐって競合がおり、感染効率が低下するのを回避するためにタイプ 35 型ベクターとファイバー・ノブ領域を置換したベクターを使用した。

B-2. 腫瘍標的ベクターの実際の探索

B-2-1. 分子標的ベクターの実際の探索 (青木)

多種多様なリガンドをファイバーノブ上に提示する Ad ライブラリーを用いて、膵がんなどの消化器がんが特異的に発現する細胞表面分子 Trop2 (Tumor-associated calcium signal transducer 2) を標的する Ad ベクターの探索を試みた。まず、Trop2 を発現していないヒト膵がん細胞株 AsPC-1 に、レトロウイルスベクターを用いてヒト Trop2 cDNA を遺伝子導入したトランスフェクタント AT-5 細胞を作成した。AT-5 と AsPC-1 細胞に、それぞれ Ad ライブラリーを感染させ、数日後に cell lysate を回収して、同じ細胞に感染するといった過程を 3 回繰り返した。最終的に粗ウイルス液から DNA を抽出して、Ad のファイバー上に提示されている配列をシーケンス解析した。

B-2-2. がん細胞表面抗原の探索と抗体の樹立 (内田)

新規に抗体結合変異型単純ヘルペスウイルスベクターを探索プローブに用いた抗体スクリーニング法をデザインした。単純ヘルペスウイルス (HSV) の細胞侵入 (エンタリー) は、ウイルス外被の糖タンパク質 gD が宿主細胞表面の受容体に結合することにより成立する。gD 受容体としては HVEM および nectin-1 が報告されている。そこで gD が HVEM と nectin-1 に結合できなくなるよう gD 遺伝子に欠失および変異を施し、これに抗体の Fc 部分に結合するドメインを挿入することにより、抗体結合変異型 gD をデザインした。この変異 gD を組み込んだ変異 HSV を作製し、そのウイルス学的特性を評価した。

膵がん細胞株、グリオーマ細胞株、腎がん細胞株、骨肉腫細胞株、と多彩な種類のヒトがん細胞株を用いてマウスを免疫し、抗体結合変異型 HSV の標的細胞株への感染の程度を指標として、新規の標的化抗体のスクリーニングを施行した。

B-3. 腫瘍標的ウイルスの臨床応用腫瘍標的ウイルスの臨床応用

B-3-1. 悪性中皮腫に対する Ad ベクターの臨床試験

腫瘍標的ウイルスの実用化にむけた段階的臨床研究として、血管新生を阻害する非増殖型 Ad の悪性中皮腫に対する臨床試験を計画した。切除不能悪性中皮腫に対する非増殖性アデノウイルスベクターの胸腔内投与に関する臨床研究は、厚生省の当該委員会の審議を経てその実施が承認された (平成 25 年 8 月 22 日 厚生労働省発科 0822 第 1 号)。

B-3-2. 当該ベクターの臨床応用に必要な評価項目の選定と、評価を効率よく進めるための新しい仕組みの構築 (水野)

当該ベクターの GMP 製造法を確立するため、非臨床試験の対象項目とその研究グレード (GLP or Non-GLP) を見極め、手順書や文書の策定を進めた。さらに試験デザインの具現化に向け、規制当局を念頭に入れた戦略的な開発を実施し、非臨床 POC 及び臨床試験実施の観点からそれぞれ検証を加えた。

(倫理面への配慮)

本研究は、各研究者が所属する研究施設の組織換え DNA 実験や動物実験に関わる各種委員会の承認を得た上で実施している。自己増殖型 Ad ライブラリーや制限増殖型 Ad ベクターを用いた研究は、拡散防止措置に関して大臣確認を得た上で実施している。

C. 研究結果

C-1. 腫瘍標的ベクターの探索技術の開発

C-1-1. 標的化リガンドによる腫瘍溶解ウイルスの抗腫瘍効果と安全性の強化 (青木)

ヒト膵がん外科切除標本 (4 例) をシングルセル化し MEF と共培養して、各種ウイルス (AdSur-SYE, AdSur, AdΔE1-AP, Ad-EGFP) を感染させて 6 日後に細胞数を検討した。まず、ウイルス非感染細胞の免疫染色により、MEF の周囲に MUC-1 陽性細胞が集簇しており、MEF との共培養でヒト膵がん細胞が 6 日以上生存することが分かった。また、ウイルス感染細胞では、EGFP 陽性細胞数は、AdSur-SYE のほうが AdSur よりも明らかに多く、AdSur-SYE の感染効率が高いことを確認した。多くの EGFP 陽性細胞は MUC-1 陽性であり、膵がん細胞に感染していた。細胞数に関しては、4 例とも AdSur-SYE のほうが AdSur よりも明らかに細胞数が少なかった。AdSur-SYE の腫瘍溶解効果は、野生型のファイ

パーと野生型のE1領域をもつAd-EGFPと比べても同等以上であり、膵がん標的リガンドを用いることにより腫瘍溶解効果を著しく増強できることを、実際にヒト膵がん組織でも示すことができた。

C-1-2. Adによる自然免疫誘導を抑制する新規ベクターの開発(水口)

これまで、Ad-E4-122aTは、投与後後期(6-10日後)の肝障害を大きく抑制することを明らかにした。本年度は、Ad-E4-122aTによる早期の肝障害について検討を行った。

まずAd-E4-122aT投与2日後の肝臓の組織切片を作製し、肝障害を評価した。その結果、従来型Adベクター投与群では、肝臓中に炎症細胞の浸潤や肝細胞のアポトーシスが観察された。一方でAd-E4-122aT投与群においては、そのような肝障害は大きく抑制されていた。また従来型Adベクター投与群では有意な血清中ALT値の上昇が観察されたのに対し、Ad-E4-122aT投与群ではPBS投与群と同程度のALT値のみしか観察されなかった。Ad-E4-122aT投与群では、後期の肝障害のみならず、早期の肝障害も抑制されることが示された。

Adベクター投与後の脾臓における炎症性サイトカインmRNA量(IL-6, IL-12, IFN- γ)を検討したところ、従来型Adベクター、Ad-E4-122aT投与群ともに同程度の炎症性サイトカインmRNA量を示した。以上の結果より、Ad-E4-122aTは従来型Adベクターと同程度の自然免疫活性化能を有することが示された。

次にAdベクター投与後の遺伝子発現効率について検討を行った。レポーター遺伝子としてmSEAP遺伝子を用いることで、経日的に遺伝子発現効率を評価した。投与後初期(～7日目)の遺伝子発現量に関しては、従来型AdベクターとAd-E4-122aTとで有意な差は観察されなかった。その後、従来型Adベクター投与群では徐々に遺伝子発現量が低下していったのに対し、Ad-E4-122aT投与群においては約1年にわたり高効率な遺伝子発現を示した。以上の結果より、Ad-E4-122aTは早期および後期の肝障害が抑制されることにより、長期にわたり高効率な遺伝子発現を示すことが明らかとなった。

従来型AdベクターとAd-E4-122aTは同程度の自然免疫活性化能を示したことから、従来型AdベクターとAd-E4-122aT投与群における早期の肝障害レベルの差は、誘導された炎症性サイトカイン量の差ではないことが示唆された。しかしこれまでにAdベクターによって誘導された炎症性サイトカインがAdベクターによる早期の肝障害に関与することが報告されていることから、炎症性サイトカインが従来型Adベクター

による肝障害を増強しているのではないかと考えた。そこで、マウス初代肝細胞にAdベクターを作用させたのち、IL-6を含む培地で培養した。その結果、炎症性サイトカイン非存在下では、Ad-E4-122aT作用群では有意な細胞障害は観察されなかったのに対し、従来型Adベクター作用群では有意な細胞障害が観察された。Adベクターによって誘導されたIL-6がAdベクターによる肝障害を増強していることが示唆された。

最後に、炎症性サイトカインがAd遺伝子のE1遺伝子非依存的な発現に及ぼす影響について検討した。HeLa細胞をヒトTNF- α で前処理したのち、Adベクターを作用させ、Ad遺伝子の発現を測定したところ、E2A遺伝子で約1.8倍、E4遺伝子で約3倍のmRNA量の上昇が観察された。以上の結果より、炎症性サイトカインがAd遺伝子のE1遺伝子非依存的な発現を活性化することが示唆された。

C-1-3. 腫瘍溶解ウイルスとAd-p53の併用効果の検討(田川)

ヒト膵がん細胞PANC-1のp53は変異型であり、AsPC-1のp53遺伝子は欠損型である。これらの細胞に腫瘍溶解アデノウイルスAd-MK、Ad-Surを感染させると、p53非依存的なアポトーシスが誘導された。

この時、p53遺伝子を発現させる非増殖型アデノウイルス(Ad-p53)の併用効果を検討した。Ad-p53単独でもPANC-1細胞、AsPC-1細胞に細胞障害活性は誘導されたが、腫瘍溶解性アデノウイルスと併用すると、その細胞障害活性は、細胞の種類、アデノウイルスの種類に関わらず相乗効果を示した。p53発現は、腫瘍溶解性ウイルスの細胞障害活性に対しては相乗効果を示すが、ウイルスの増殖はむしろ抑制した。MDM2抑制を介したp53の安定化がその相乗効果の原因と考えられ、ウイルス増殖による細胞死誘導よりも、p53経路の活性化によるアポトーシスの誘導が上回ると考えられた。

次に、p53変異型のヒト食道がん細胞を使用して同様な実験を行った。腫瘍溶解性アデノウイルス自体では、感染細胞のp53が変異型であるためp53経路の活性化が起こらないものの、外来性p53による同経路の活性化がより強く惹起されていた。またこの時、Ad-MK、Ad-Surのウイルス増殖能そのものはAd-p53感染によって低下していた。すなわち、p53経路が正常であること、あるいは同経路を正常化することによって、腫瘍溶解性ウイルスによる抗腫瘍効果を増強することが可能であった。

ついで、低分子化合物を使用してp53経路の活性化について検討した。p53分子の分解系を阻止するnutlin-3aやheat shock protein 90

阻害剤を用いて検討すると、両者は内因性の p53 分子の増加と活性化を誘導した。Ad-53 による外因性の p53 分子に関して検討すると、nutlin-3a との併用は細胞障害活性等において相乗効果を示したが、heat shock protein 90 阻害剤との併用によっては、むしろ拮抗作用が生じていた。これは heat shock protein 90 分子が有するシャペロン効果によるものかと推定された。

C-2. 腫瘍標的ベクターの実際の探索

C-2-1. 分子標的ベクターの実際の探索 (青木)

AT-5 細胞と親株の AsPC-1 細胞を用いて、Ad ライブラリーをスクリーニングし、アデノウイルスのファイバーノブ上に提示されている配列を解析した。AsPC-1 細胞表面分子に結合する配列は両細胞に共通に出現し、Trop2 細胞を認識する配列は AT-5 細胞にのみ検出されると考えられる。得られた配列を AT-5 と AsPC-1 細胞と比較したところ、AT-5 細胞にのみ認められる 1 種類の配列が同定できた。ついで、この配列をファイバー上に提示する Ad ベクターを構築して、AT-5 と AsPC-1 細胞に同量ずつ感染させて、ルシフェラーゼアッセイを行うと、AT-5 細胞のほうが、約 3 倍程度感染効率が上がっており、Trop2 を標的している可能性があると考えられた。

C-2-2. がん細胞表面抗原の探索と抗体の樹立 (内田)

HSV ゲノムに抗体結合変異型 gD 遺伝子配列を組み込むことにより抗体結合変異型 HSV を作製した。gD 受容体を発現しない CHO-K1 細胞およびこれに HVEM あるいは nectin-1 を発現させた亜株に野生型 gD をもつウイルスならびに変異ウイルスを感染させた結果、変異ウイルスの HVEM および nectin-1 を介したエントリーの効率は野生型 gD をもつウイルスと比較して著しく低下していることが示された。また、膵がん細胞などの表面に発現するがん抗原として知られる CEA-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) を発現させた CHO-K1 細胞亜株に抗 CEACAM6 抗体を結合させた変異ウイルスを感染させたところ、ウイルスのエントリーが検出された。抗体非存在下においては変異ウイルスの CEACAM6 発現 CHO-K1 細胞へのエントリーは認められなかった。以上の結果からこの抗体結合変異型 HSV は抗原および抗体の結合に依存してエントリーすることが示唆された。

これらのウイルス学的解析の結果をふまえて、膵がん細胞株、グリオーマ細胞株、腎がん細胞株、骨肉腫細胞株を免疫原とした抗体スクリーニングを行った。その結果、抗体結合変異型 HSV

の細胞侵入をサポートしうるモノクローナル抗体を合計 30 クローン樹立することに成功した。

C-3. 腫瘍標的ウイルスの臨床応用

C-3-1. 悪性中皮腫に対する Ad ベクターの臨床試験

切除不能悪性中皮腫を対象にアデノウイルスの胸腔内投与を行う臨床研究を実施する。使用するベクターは非増殖性であるが、本邦においては胸腔内にアデノウイルスを投与した症例はないことから、まず安全性の高い非増殖性ベクターより実施する。ベクターは、hepatocyte growth factor (HGF) /c-Met 系を、競合的に阻害する NK4 分子の発現を可能にするアデノウイルス (Ad-NK4) で、NK4 分子による遺伝子治療は世界で最初である。既に、病棟における患者マネージメントの方法、薬剤部におけるベクターの廃棄処理、臨床試験部とのデータマネージメントの打合せと終了し、患者のリクルートに関して関連医療機関、ウェブサイトで募集しており、またその臨床研究の内容を公開している。本研究では基本的には第一相臨床試験に相当する容量増加試験であり、安全性の検討がその主たる目的である。

C-3-2. 当該ベクターの臨床応用に必要な評価項目の選定と、評価を効率よく進めるための新しい仕組みの構築 (水野)

当該ベクターを用いる臨床試験を実施するにあたり、求められる非臨床 POC はその基礎的な安全性と有用性のプロファイルである。そこで臨床試験実施にあたり、求められる手順書や文書、さらには業務のリスト化と文書化を進めた。

また、当該ベクター製造時に生じる余剰の当該ベクターや生物材料 (293 細胞など) の効率的な処理方法について大気圧プラズマが当該ベクター並びにその製造に関連した生物材料の処理に適しているか否かを検討した。その結果、10 分間の大気圧プラズマ照射により生物的活性を完全に抑えることがわかった。

D. 考察

D-1. 腫瘍標的ベクターの探索技術の開発

D-1-1. 標的化リガンドによる腫瘍溶解ウイルスの抗腫瘍効果と安全性の強化 (青木)

本研究により、ヒト膵がんサンプルにおいても、膵がん標的化腫瘍溶解ウイルス AdSur-SYE が、非標的化ウイルスと比較して、腫瘍溶解効果が強く増強されていることが確認でき、腫瘍溶解ウイルスに標的性を付加する有用性を明らかにすることができた。本 AdSur-SYE の臨床応用を図ることはじゅぶん妥当であると考えられ

た。

D-1-2. Ad による自然免疫誘導を抑制する新規ベクターの開発 (水口)

Ad ベクターによる肝障害は、投与後早期 (投与 1~3 日後) に起こる肝障害と後期 (投与 6~10 日後) に起こる肝障害とに大別される。後期の肝障害は、Ad タンパク質に対する細胞性免疫によって惹起されが、早期の肝障害機序は明らかでない。

Ad-E4-122aT は、後期の肝障害のみならず早期の肝障害も軽減していた。そこで Ad-E4-122aT による炎症性サイトカインの誘導について検討したところ、従来型 Ad ベクターと比較し有意な差は観察されなかった。Ad ベクターによる炎症性サイトカインの誘導メカニズムについては様々な機構が報告されているが、主には Ad ゲノムが Toll-like receptor 9 (TLR9) をはじめとするパターン認識受容体に認識されることで誘導されると考えられている。Ad-E4-122aT も従来型 Ad ベクターも、miR-122a 標的配列以外は違いがないことから、両ベクター間に炎症性サイトカイン発現誘導に差がないと考えられる。

しかし、炎症性サイトカインは、Ad 遺伝子の発現を活性化させることで、肝障害を促進させていることが示唆された。Ad 遺伝子のうち、一部の Ad 遺伝子のプロモーター領域には NF- κ B の結合領域が存在することが報告されている。従って炎症性サイトカインにより活性化した NF- κ B が Ad 遺伝子の転写を活性化したものと考えられる。

D-1-3. 腫瘍溶解ウイルスと Ad-p53 の併用効果の検討 (田川)

腫瘍溶解性アデノウイルスの細胞障害活性は、アデノウイルスの増殖によるものと考えられるが、実際には感染する細胞の遺伝的背景によって異なる。変異型 p53 遺伝子を有する膵がんで検討するとオートファジーの関与は少なく、非 p53 経路によるアポトーシスと考えられた。一方、機能的に p53 経路が失活している悪性中皮腫では、p53 遺伝子そのものが野生型であることが多いため、腫瘍溶解性アデノウイルス感染によって E1A を介して p53 経路が活性化され、アポトーシスが誘導された。p53 を発現させ、腫瘍溶解性ウイルスとの併用効果を検討すると、相乗効果を示した。しかも、p53 経路の活性化からアポトーシスに至る経路が、増殖性ウイルスによって活性化されており、これは同ウイルスの増殖による E1A 発現が寄与したと考えられる。すなわち E1A は p53 分子の分解に関与する MDM2 分子の発現を低下させ、結果的に p53 経路が賦活化する作用があり、p53 経路は増殖性ウ

イルスによる細胞死に影響を与えていた。しかし、p53 経路の活性化は、増殖性ウイルスによる細胞死を増強し、感染細胞がより早期に死滅するため、結果的に産生されるウイルス量は低下した。

低分子化合物による p53 経路の活性化方法は、主に MDM2 と p53 分子の結合阻害によるものが多く、nutlin-3a などの化合物が検討されている。HSP90 阻害剤は、oncogenic 変異型 p53 蛋白質を減少させるため、その抗腫瘍効果に与える影響は複雑である。HSP90 は AKT のみならず MDM2 分子もクライアント蛋白であり、野生型の p53 分子に関してはその発現は増加させると考えられているが、変異型 p53 の発現減少の理由は明確ではない。また、p53 および AKT 非依存的に p21 分子の発現誘導を HSP90 阻害剤は誘導するため、増殖性アデノウイルスに与える影響は、一概には言えない。

Nutlin-3a 類似体をはじめ、p53 経路の作用する薬剤、また HSP90 阻害剤類似体は、医薬品として開発が進んでいる。これらは単独治療においてその効果を検討されており、膵がんや悪性中皮腫のように p53 経路が欠損した症例が多い場合は、比較的効果が高いと考えられている。本研究で示されたように、当該遺伝子医薬の効果に p53 経路が一定の役割を果たすことは、標的細胞の遺伝的背景から当該ウイルスの効果をj知る上で、p53 分子が一つのバイオマーカーになりうる。また、上記低分子化合物と併用は治療効果の面から有望な組み合わせと考えられる。

D-2. 腫瘍標的ベクターの実際の探索

D-2-1. 分子標的ベクターの実際の探索 (青木)

分子標的ベクターを開発するために、Trop2 標的 Ad ベクターの探索を行ったところ、Trop2 発現トランスフェクタントに特異的な配列が認められた。この配列をファイバー上に提示する Ad ベクターは、親株と比較して感染効率も上昇していたことより、Trop2 標的ベクターが同定できたものと考えられた。細胞株や実験動物で感染効率や標的性の検討をさらに進め、臨床応用が可能かどうかヒト臨床検体での検証も行う。今後、種々のがん特異的抗原を標的するベクターの開発に役立てることができる。

D-2-2. がん細胞表面抗原の探索と抗体の樹立 (内田)

HSV の細胞侵入のメカニズムはアデノウイルスとは異なることから、これまで用いてきた Adv-FZ33 系の抗体スクリーニングで選別された抗原・抗体セットのレパートリーとは異なる新たながん標的化抗原・抗体セットの樹立が期待される。

また、抗体結合変異型 HSV のウイルス学的解析の結果、このウイルスは抗体非依存的な細胞侵入能が極めて低いレベルに抑えられていることが判明した。このことは、抗体スクリーニングを施行する際のバックグラウンドのレベルが低いということの意味する。したがって、Adv-FZ33 系ではその高いバックグラウンドに埋没してしまい偽陰性の判定をされてしまっていたような比較的発現量の低いがん抗原を認識する抗体も選別することが可能となる。

今後も様々なタイプのがん細胞を免疫原として、これら複数の独自のスクリーニング系で抗体を選抜・樹立してゆくことにより、新たなターゲット分子を同定する。

D-3. 腫瘍標的ウイルスの臨床応用

D-3-1. 悪性中皮腫に対する Ad ベクターの臨床試験

悪性中皮腫を対象に非増殖性アデノウイルスによる臨床研究を計画し、現在実施に向けてすべての準備を終えて、患者のリクルートに入った。悪性中皮腫の臨床試験は、3 段階の容量増加試験で各ウイルス量につき 3 症例で実施し、有害事象の有無、ウイルス排泄の検討等を検討し、閉鎖体腔に投与されたウイルスの生体内分布の解析に役立てる。

D-3-2. 当該ベクターの臨床応用に必要な評価項目の選定と、評価を効率よく進めるための新しい仕組みの構築 (水野)

当該ベクターを用いる臨床試験の実施にあたり、規制当局が求める前臨床試験項目や臨床試験概要について研究当初から念頭に入れておくことは極めて重要である。

昨年度までに、前臨床試験項目や臨床試験実施の際の人的支援体制、臨床試験の計画から報告までの過程を整理した。これを受け、本年度は実施に必要な手順書や文書の策定を行い、ほぼ完了した。事業性を重視した本取り組みは本研究が単なる基盤研究に留まらず、独立行政法人日本医療研究開発機構が目指す医療の産業化にも直結する成果と考えている。

一方、臨床試験用の当該ベクター製造においては、最終試験物の品質管理(QC)と品質保証(QA)が必要である。その際、製造の過程ででてくる不要な生物材料の処理は重要なポイントとなる。本年度は大気圧プラズマが当該ベクター並びにその製造に関連した生物材料の処理に適しているか否かを検討し、期待されたデータを得ることができた。本技術は今後、当該ベクター製造法において閉鎖系ユニットを活用する際に有用であると思われた。

E. 結論

- 1) Survivin の転写調節領域で増殖を制御する腫瘍溶解ウイルスに、膵がん標的リガンドを組み合わせることで、腫瘍溶解 Ad ベクターの腫瘍溶解効果の強化が可能であることを、ヒト膵がん切除標本で示した。
- 2) Ad-E4-122aT では、後期の肝障害のみならず早期の肝障害も軽減され、従来型 Ad ベクターよりも長期間にわたり高効率な遺伝子発現を示した。また、炎症性サイトカインが Ad 遺伝子の E1 遺伝子非依存的な発現を促進しており、それによって早期の肝障害が誘導されている可能性を示した。
- 3) p53 経路の活性化によって腫瘍溶解ウイルスによるアポトーシスが增強し、細胞障害活性においては相乗効果が得られた。MDM2 分子と p53 分子の結合を阻害する nutlin-3a を併用すると、相乗効果を示した。
- 4) Ad ライブラリーのスクリーニングにより、膵がん等の消化器がん特異的に発現する Trop2 を標的するベクターを同定した。今後、種々のがん特異的抗原を標的するベクターの開発に役立てることができると期待される。
- 5) 新規に抗体結合変異型 HSV を探索プローブとしたがん標的化抗体のスクリーニング系を樹立した。
- 6) 悪性中皮腫に対するアデノウイルスの胸腔内投与による臨床研究を計画し、症例登録を開始する段階となった。
- 7) 難治がんに対する標的バイオ医薬の一つである腫瘍標的型アデノウイルスベクターの臨床試験実施に必要な品質、非臨床 POC、手順書並びに文書、さらには業務について考察を加え、リスト化並びに文書化を行った。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

●論文発表

- 1) Terracina KP, Aoyagi T, Huang W, Nagahashi M, Yamada A, Aoki K, Takabe K. Development of a metastatic murine colon cancer model. **J Surg Res** (in press)
- 2) Narumi K, Miyakawa R, Ueda R, Hashimoto H, Yamamoto Y, Yoshida T, Aoki K. Pro-inflammatory proteins

- S100A8/S100A9 activate natural killer cells via Interaction with a receptor of advanced glycation endproduct. **J Immunol** 194: 5539-48, 2015.
- 3) Hashimoto H, Ueda R, Narumi K, Heike Y, Yoshida T, Aoki K. Type I IFN gene delivery suppresses regulatory T cells within tumors. **Cancer Gene Ther** 21:532-41, 2014.
 - 4) Yamamoto Y, Hiraoka N, Goto N, Rin Y, Miura K, Narumi K, Uchida H, Tagawa M, Aoki K. A targeting ligand enhances infectivity and cytotoxicity of an oncolytic adenovirus in human pancreatic cancer tissues. **J Control Release** 192, 284-93, 2014.
 - 5) Inagawa Y, Yamada K, Yūgawa Y, Ohno S, Hiraoka N, Esaki M, Shibata T, Aoki K, Saya Y, Kiyono T. A human cancer xenograft model utilizing normal pancreatic duct epithelial cells conditionally transformed with defined oncogenes. **Carcinogenesis** 35; 1840-1835, 2014.
 - 6) Yamamoto Y, Goto N, Miura K, Narumi K, Ohnami S, Ushida H, Miura Y, Yamamoto M, Aoki K. Development of a novel efficient method to construct an adenovirus library displaying random peptides on the fiber knob. **Mol Pharmaceutics** 11; 1069-1074, 2014.
 - 7) Aida K, Miyakawa R, Suzuki K, Narumi K, Udagawa T, Yamamoto Y, Chikaraishi T, Yoshida T, Aoki K. Suppression of Tregs by anti-GITR antibody enhances the antitumor immunity of IFN- α gene therapy for pancreatic cancer. **Cancer Sci** 105; 159-167, 2014.
 - 8) Wu D, Hiroshima K, Matsumoto S, Takagi-Kimura M, Yamano T, Tagawa M, Kubo S. Oncolytic virotherapy for osteosarcoma using midkine promoter-regulated adenoviruses. **Cancer Gene Ther** 21: 126-132, 2014.
 - 9) Tagawa M, Shirane K, Yu L, Sato T, Furukawa S, Mizuguchi H, Kuji R, Kawamura K, Takahashi N, Kato K, Hayakawa S, Sawada S, Furukawa K. Enhanced expression of the β 4-galactosyltransferase 2 gene impairs the mammalian tumor growth. **Cancer Gene Ther** 21: 219-227, 2014.
 - 10) Fukamachi T, Ikeda S, Saito H, Tagawa M, Kobayashi H. Expression of acidosis-dependent genes in human cancer nests. **Mol. Clin. Oncol.** 2: 1160-1166, 2014.
 - 11) Suzuki T, Kawamura K, Li Q, Okamoto S, Tada Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Yamaguchi N, Tagawa M. Mesenchymal stem cells are efficiently transduced with adenoviruses bearing type 35-derived fibers and the transduced cells with the IL-28A gene produces cytotoxicity to lung carcinoma cells co-cultured. **BMC Cancer** 14: 713, 2014.
 - 12) Okamoto S, Jiang Y, Kawamura K, Shingyoji M, Tada Y, Sekine I, Takiguchi Y, Tatsumi K, Kobayashi H, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M. Zoledronic acid induces apoptosis and S-phase arrest in mesothelioma through inhibiting Rab family proteins and topoisomerase II actions. **Cell Death Dis.** 2014 Nov 13;5:e1517.
 - 13) Zhong B, Ma G., Sato A, Shimozato O, Liu H, Li Q, Shingyoji M, Tada Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M. Fas ligand DNA enhances a vaccination effect by coadministered DNA encoding a tumor antigen through augmenting production of antibody against the tumor antigen. **J Immunol Res.** Volume 2015, Article ID 743828,
 - 14) Li, Q., Sato, A., Shimozato, O., Shingyoji, M., Tada, Y., Tatsumi, K., Shimada, H., Hiroshima, K. and Tagawa, M.: Administration of DNA encoding the interleukin-27 gene augments anti-tumor responses through non-adaptive immunity. **Scand J Immunol.** (in press).
 - 15) Ma G, Zhong B, Okamoto S, Jiang Y, Kawamura K, Liu H, Li Q, Shingyoji M., Sekine I, Tada Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M. A combinatory use of adenoviruses expressing melanoma differentiation-associated gene-7 and replication-competent adenoviruses produces synergistic effects on pancreatic carcinoma cells. **Tumor Biol** (in press).
 - 16) Shimizu K, Sakurai F, Tomita K, Nagamoto Y, Nakamura SI, Katayama K, Tachibana M, Kawabata K, Mizuguchi H. Suppression of leaky expression of adenovirus genes by insertion of microRNA-targeted sequences in the replication-incompetent adenovirus vector genome. **Mol. Ther. Methods Clin. Dev.** 1:14035. 2014.
 - 17) Hemmi M, Tachibana M, Tsuzuki S, Shoji M, Sakurai F, Kawabata K, Kobiyama K, Ishii KJ, Akira S, Mizuguchi H. The early activation of CD8⁺ T cells is dependent on type I IFN signaling following intramuscular vaccination of adenovirus vector. **Biomed Res Int.** 158:128, 2014.
 - 18) Miyagawa Y, Marino P, Verlengia G, Uchida H, Goins WF, Yokota S, Geller DA, Yoshida O, Mester J, Cohen JB, Glorioso JC. Herpes simplex viral-vector design for efficient transduction of nonneuronal cells without

- cytotoxicity. *PNAS*. 112:E1632-41, 2015.
- 19) Nishii Y, Yamaguchi M, Kimura Y, Hasegawa T, Aburatani H, Uchida H, Hirata K, Sakuma Y. A newly developed anti-Mucin 13 monoclonal antibody targets pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Int J Oncol* 46:1781-7, 2015.
 - 20) Mazzacurati L, Marzulli M, Reinhart B, Miyagawa Y, Uchida H, Goins WF, Li A, Kaur B, Caligiuri M, Cripe T, Chiocca N, Amankulor N, Cohen JB, Glorioso JC, Grandi P. Use of miRNA response sequences to block off-target replication and increase the safety of an unattenuated, glioblastoma-targeted oncolytic HSV. *Mol Ther* 23:99-107, 2014.
 - 21) Yamaguchi M, Nishii Y, Nakamura K, Aoki H, Hirai S, Uchida H, Sakuma Y, Hamada H. Development of a sensitive screening method for selecting monoclonal antibodies to be internalized by cells. *Biochem Biophys Res Commun* 454:600-603, 2014.
 - 22) Okazaki Y, Wang Y, Tanaka H, Mizuno M, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Uchida K, Kikkawa F, Horii M, Toyokuni S. Direct exposure of non-equilibrium atmospheric pressure plasma confers simultaneous oxidative and ultraviolet modifications in biomolecules. *J Clin Biochem Nutr*. 55:207-15, 2014.
 - 23) Torii K, Yamada S, Nakamura K, Tanaka H, Kajiyama H, Tanahashi K, Iwata N, Kanda M, Kobayashi D, Tanaka C, Fujii T, Nakayama G, Koike M, Sugimoto H, Nomoto S, Natsume A, Fujiwara M, Mizuno M, Horii M, Saya H, Kodera Y. Effectiveness of plasma treatment on gastric cancer cells. *Gastric Cancer* Jul 6, 2014.
 - 24) Cao D, Kishida S, Huang P, Mu P, Tsubota S, Mizuno M, Kadomatsu K. A new tumorsphere culture condition restores potentials of self-renewal and metastasis of primary neuroblastoma in a mouse neuroblastoma model. *PLoS One* 22:e86813, 2014.
- 学会発表
- 1) Yamamoto Y, Hiraoka N, Rin Y, Miura K, Narumi K, Tagawa M, Aoki K. A targeting ligand enhances infectivity and cytotoxicity of an oncolytic adenovirus in human pancreatic cancer specimens. 第19回日本遺伝子治療学会学術集会. August 6-8, 2014.
 - 2) Yamamoto Y, Rin Y, Goto N, Miura K, Hiraoka N, Tagawa M, Aoki K. A cancer-targeting ligand strongly enhances cytotoxic activity of oncolytic adenovirus in human pancreatic cancer tissues. 第73回日本癌学会学術総会、横浜、9月25-27日、2014年.
 - 3) Rin Y, Yamamoto Y, Goto N, Hiraoka N, Aoki K. Pancreatic cancer-targeting ligands isolated by a peptide-displaying library enhance adenoviral infectivity in human pancreatic cancer tissues. 第73回日本癌学会学術総会、横浜、9月25-27日、2014年.
 - 4) Narumi K, Ueda R, Hashimoto H, Yoshida T, Aoki K. Pro-inflammatory proteins S100A8/A9 activate NK cells via interaction with RAGE. 第73回日本癌学会学術総会、横浜、9月25-27日、2014年.
 - 5) Hashimoto H, Ueda R, Rin Y, Narumi K, Yoshida T, Aoki K. Intratumoral type I IFN gene transfer decreases regulatory T cells. 第73回日本癌学会学術総会、横浜、9月25-27日、2014年.
 - 6) Miyakawa R, Narumi K, Ueda R, Hashimoto H, Aoki K. Intratumoral delivery of GITR antibody induces a stronger antitumor immunity than systemic injection. 第73回日本癌学会学術総会、横浜、9月25-27日、2014年.
 - 7) Ikegami D, Tasaki Y, Suzuki M, Uezono Y, Aoki K, Narita M. Changes in the anti-tumor immune response by controlling the hypothalamic POMC neuron activity using optogenetic techniques. 第73回日本癌学会学術総会、横浜、9月25-27日、2014年.
 - 8) Ueda R, Narumi K, Miyakawa R, Hashimoto H, Aoki K. Natural killer cell-mediated antitumor effect of syngeneic hematopoietic stem cell transplantation. American Society of Hematology Annual Meeting. December 5-9, 2014 (San Francisco).
 - 9) Masatoshi Tagawa, Kiyoko Kawamura, Shinya Okamoto, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Kenzo Hiroshima, Hideaki Shimada: A new therapeutic strategy for cancer with replication-competent adenoviruses powered by the midkine promoter. Third Midkine Symposium, April 21-23, 2014, Kyoto. (April 21, 2014)
 - 10) Masatoshi Tagawa, Kiyoko Kawamura, Shinya Okamoto, Yuanyuan Jiang, Zhihan Li, Shuji Kubo, Masato Shingyoji, Yuji Tada, Yuichi Takiguchi, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima: A small molecule that inhibits p53 degradation influences cytotoxicity of Ad-p53 in INK4A/ARF-defective mesothelioma with wild-type p53 gene. 17th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy,

- May 21-24, 2014, Washington DC. (May 22, 2014)
- 11) Masatoshi Tagawa, Kuan Chai, Shinya Okamoto, Kiyoko Kawamura, Zhihan Li, Yuanyuan Jiang, Naoto Yamaguchi, Masato Shingyoji, Yuji Tada, Ikuo Sekine, Yuichi Takiguchi, Koichiro Tatsumi, Shuji Kubo, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima: An agent influencing p53 metabolism modulates Ad-p53-mediated cytotoxicity in mesothelioma bearing the wild-type p53 gene. 20th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, August 6-8, 2014, Tokyo. (August 7, 2014)
 - 12) Masatoshi Tagawa, Kiyoko Kawamura, Shinya Okamoto, Masato Shingyoji, Ikuo Sekine, Yuichi Takiguchi, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima: Restoration of p53 functions is a key element in gene therapy of malignant mesothelioma. Internatinal Society for Cell and Gene Therapy of Cancer 14, September 25-27, 2014, Amsterdam. (September 25, 2014)
 - 13) Masatoshi Tagawa, Kiyoko Kawamura, Shinya Okamoto, Masato Shingyoji, Ikuo Sekine, Yuichi Takiguchi, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima: Restoration of p53 functions is a key element in gene therapy of malignant mesothelioma. The 12th international conference of the international mesothelioma interested group, October 21-24, 2014, Cape Town. (October 23, 2014)
 - 14) Yuji Tada, Shinya Okamoto, Kengo Shimazu, Takaaki Kozono, Masato Shingyoji, Yuichi Takiguchi, Koichiro Tatsumi, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima, Masatoshi Tagawa: Zoledronic acid induces apoptosis and S-phase arrest in mesothelioma through inhibiting Rab and topoisomerase II actions. The 12th international conference of the international mesothelioma interested group, October 21-24, 2014, Cape Town. (October 23, 2014)
 - 15) Shuji Kubo, Misato Takagi-Kimura, Masatoshi Tagawa: Enhanced transduction and antitumor efficiency of fiber-modified midkine promoter-regulated oncolytic adenovirus in human malignant mesothelioma. The 12th international conference of the international mesothelioma interested group, October 21-24, 2014, Cape Town. (October 22, 2014)
 - 16) Guntulu Ak, Selma Metintas, Yuji Tada, Hideaki Shimada, Kenzo Hiroshima, Masatoshi Tagawa, Muzaffer Metintas: Relationship of serum mesothelin and midkine levels in the diagnosis and prognosis in patients with malignant mesothelioma. The 12th international conference of the international mesothelioma interested group, October 21-24, 2014, Cape Town. (October 22, 2014)
 - 17) 江媛媛、岡本慎也、李知瀚、久保秀司、関根郁夫、滝口裕一、多田祐司、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三、田川雅敏: 制限増殖型ウイルスによる肺がんに対する細胞傷害活性は、p53 発現型アデノウイルスによって増強する。Transduced p53 enhances cytotoxic effects achieved with oncolytic adenoviruses on pancreatic carcinoma cells. 第 73 回日本癌学会学術総会 平成 26 年 9 月 25-27 日 (横浜市) (9 月 27 日)
 - 18) 竹信尚典、下里修、藤村雄一、秋田直洋、山口陽子、力石浩志、池田英里子、田川雅敏、中川原章、古関明彦、上條岳彦: 神経芽腫スフェア特異的に発現する転写因子 CDX1 は細胞の幹細胞性を制御する。Tumor sphere specific expression of transcription factor CDX1 regulates stem cell-related genes in neuroblastoma. 第 73 回日本癌学会学術総会 平成 26 年 9 月 25-27 日 (横浜市) (9 月 25 日)
 - 19) 岡本慎也、江媛媛、李知瀚、久保秀司、関根郁夫、滝口裕一、多田祐司、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三、田川雅敏: Nutlin-3a と Hsp90 阻害剤による併用投与はヒト悪性中皮腫細胞に対して p53 依存的な相乗効果を示す。Combination of nutlin-3a and Hsp90 inhibitors produces p53-dependent synergism on human mesothelioma cells. 第 73 回日本癌学会学術総会 平成 26 年 9 月 25-27 日 (横浜市) (9 月 25 日)
 - 20) 島田英昭、谷島聡、小池淳一、松下一之、野村文夫、日和佐隆樹、田川雅敏: 消化管癌患者における RalA 抗原に対する免疫反応。Immune response to tumor antigen, RalA, in patients with gastrointestinal cancers. 第 73 回日本癌学会学術総会 平成 26 年 9 月 25-27 日 (横浜市) (9 月 25 日)
 - 21) 西山夏織、田川雅敏、長谷川慶、沼崎宗夫: IL-17A は臓器に特異的な異なった effector cell により腫瘍の転移を抑制する。IL-17A inhibits tumor metastasis using organ-specific distinct effector cells. 第 73 回日本癌学会学術総会 平成 26 年 9 月 25-27 日 (横浜市) (9 月 25 日)
 - 22) 長谷川慶、田川雅敏、西山夏織、沼崎宗夫: Type III interferon 発現アデノウイルスの腫瘍組織への投与は interferon-gamma および CD8 T cell 依存

- 性の抗癌作用を示す。Adenoviral transduction of type III interferons inhibits the tumor growth depending on the interferon- γ and CD8 T cells. 第 73 回日本癌学会学術総会 平成 26 年 9 月 25-27 日 (横浜市) (9 月 27 日)
- 23) 田川雅敏, 多田裕司, 新行内雅斗, 由佐俊和, 島田英昭, 廣島健三, 巽浩一郎: アデノウイルス製剤を用いた悪性中皮腫に対する遺伝子治療の実施にむけて。第 21 回石綿・中皮腫研究会 平成 26 年 10 月 11 日 (名古屋市) (10 月 11 日)
- 24) 多田裕司, 岡本慎也, 由佐俊和, 巽浩一郎, 島田英昭, 廣島健三, 田川雅敏: ビスフォスフォネートによる悪性中皮腫に対する抗腫瘍効果。第 21 回石綿・中皮腫研究会 平成 26 年 10 月 11 日 (名古屋市) (10 月 11 日)
- 25) 櫻井文教, 水口裕之. Post-transcriptional Gene Silencing 機構を利用した高機能型遺伝子組換えアデノウイルスの開発。日本薬学会第 135 年会(神戸)2015 年 3 月.
- 26) 清水 かほり, 櫻井 文教, 飯塚 俊輔, 立花 雅史, 西中 徹, 寺田 知行, 水口 裕之. アデノウイルスベクター投与後早期の肝障害は、アデノウイルス遺伝子の発現抑制により軽減される。日本薬学会第 135 年会(神戸) 2015 年 3 月.
- 27) 町谷充洋, 櫻井文教, 清水かほり, 立花雅史, 水口裕之. NF- κ B がアデノウイルスの増殖に及ぼす影響に関する検討, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会(横浜)2014 年 11 月.
- 28) 清水かほり, 櫻井文教, 飯塚俊輔, 富田恭子, 長基康人, 立花雅史, 水口裕之. マイクロ RNA を利用してウイルス遺伝子の発現を抑制可能な新規アデノウイルスベクターの開発と機能評価. 第 64 回 日本薬学会近畿支部総会・大会(京都) 2014 年 10 月.
- 29) 清水 かほり, 櫻井 文教, 飯塚 俊輔, 富田 恭子, 長基 康人, 立花 雅史, 西中 徹, 寺田 知行, 水口 裕之. ウイルス遺伝子の発現抑制により高効率な導入遺伝子の発現と低い肝障害を示すアデノウイルスベクターの開発. アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014 (東京)2014 年 9 月.
- 30) Kahori Shimizu, Fuminori Sakurai, Shin-ichiro Nakamura, Masashi Tachibana, Hiroyuki Mizuguchi. Suppression of leaky expression of Ad genes leads to the reduction in the adenovirus vector-mediated hepatotoxicity at the not only late phase but also early phase. 第 20 回日本遺伝子治療学会年次学術集会(東京)2014 年 8 月.
- 31) Fuminori Sakurai, Kahori Shimizu, Kyoko Tomita, Yasuhito Nagamoto, Masashi Tachibana, Hiroyuki Mizuguchi. EFFICIENT AND LONG-TERM TRANSGENE EXPRESSION BY A NOVEL ADENOVIRUS VECTOR EXHIBITING MICRORNA-MEDIATED SUPPRESSION OF VIRAL GENE EXPRESSION. 第 20 回日本遺伝子治療学会年次学術集会(東京) 2014 年 8 月.
- 32) 櫻井 文教, 清水 かほり, 富田 恭子, 長基康人, 立花 雅史, 水口 裕之. microRNA 依存的にウイルス遺伝子の発現を抑制可能な新規アデノウイルスベクターの開発. 第 30 回日本 DDS 学会学術集会(東京)2014 年 7 月.
- 33) Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F, Hori M. Plasma-activated medium induced apoptosis on glioblastoma brain tumor cells by inhibiting growth/survival signaling. The 21st International Symposium on Plasma Chemistry Cairns, Australia, Aug. 4-9, 2013
- 34) Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F, Hori M. Plasma-activated medium downregulated a survival and proliferation signaling molecule, AKT kinase in glioma brain tumor cells. 2013 Japan Society of Applied Physics – Material Research Society Joint Symposia. Kyoto, Japan, Sep. 16-20, 2013
- 35) Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Takeda K, Nakamura K, Utsumi F, Kajiyama H, Kano H, Maruyama S, Kikkawa F, Hori M. Survival and proliferation signaling pathways are downregulated by plasma-activated medium in glioblastoma brain tumor cells. 8th International Conference on Reactive Plasmas 31st Symposium on Plasma Processing. Fukuoka, Japan, Feb. 3-7, 2014
- 36) 田中 宏昌, 水野 正明, 石川 健治, 竹田 圭吾, 中村 香江, 梶山 広明, 加納 浩之, 吉川 史隆, 堀 勝. がん治療に向けたプラズマ装置及びプラズマ照射溶液の研究開発. テクノ・フェア名大 2013, 名古屋大学 豊田講堂, シンポジオンホール, 2013 年 9 月 6 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得状況
1. 腫瘍溶解性ウイルスベクター及びがん治療剤
- 出願番号: 2014-101280
- 出願日: 平成 26 年 5 月 15 日

発明人：青木一教

出願人：独立行政法人国立がん研究センター

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

がんに対する標的ベクターの網羅的探索

研究分担者 青木 一教 国立がん研究センター研究所遺伝子免疫細胞医学研究分野・分野長

研究要旨

腫瘍溶解アデノウイルスの効果と安全性を強化するためには、腫瘍標的化能を強化する必要がある。我々は、膵がん標的リガンド (SYENFSA) を、サバイビンプロモーターにより増殖を制御する腫瘍溶解アデノウイルス (AdSur) に組み合わせた膵がん標的腫瘍溶解ウイルス (AdSur-SYE) を開発し、その腫瘍溶解効果をヒト膵がん切除標本を用いて検討した。ヒト外科切除標本を細切しシングルセル化した膵がん細胞とマウス胎児繊維芽細胞を共培養して AdSur-SYE を感染すると、腫瘍溶解効果は AdSur と比較して著明に増強しており、臨床応用に資するベクターであることを示した。また、特定の腫瘍細胞表面に発現する分子特異的に感染するベクターを開発するモデルケースとして、“Trop2 (Tumor-associated calcium signal transducer2)” を標的とする Ad ベクターの開発を行った。Trop2 発現細胞で多種多様なリガンドをファイバー上に提示する Ad ライブラリーをスクリーニングすることにより、Trop2 発現細胞に対して 3 倍程度感染効率を上げる配列を同定することに成功した。

A. 研究目的

革新的がん治療薬として大きな期待が寄せられている腫瘍溶解ウイルス療法には、効果と安全性を高めるために、ウイルスの自然の感染域を抑制し、一方で、溶解効果は腫瘍への感染力に依存するので、腫瘍に対する標的特異性を高める技術の開発が必要である。

そこで、我々は、特異的に感染する腫瘍標的化リガンドの探索を目指し、多種多様なペプチドをキャプシド蛋白質上に提示するアデノウイルス (Ad) ライブラリーを用いて、膵がん細胞をスクリーニングし、膵がん標的リガンド (SYENFSA) を同定することに成功した。ついで、サバイビンプロモーターにより増殖を制御する腫瘍溶解アデノウイルス (AdSur) に、この膵がん標的配列を組み合わせた膵がん標的腫瘍溶解ウイルス (AdSur-SYE) を構築した。これまで検討では、動物モデルにおいて、この AdSur-SYE を腫瘍内に注入した場合に腫瘍溶解効果が増強することと、各種臓器へのウイルスの異所性感染が抑制されることを明らかとした。また、ヒト膵がん外科切除標本を用いて、AdSur-SYE がヒト膵がん組織においても感染効率を 6 倍程度向上させることを示した。本年度は、さらに、このヒト膵がん検体を用いて AdSur-SYE が実際に腫瘍溶解効果を増強できるのかどうか検討した。

膵がん標的リガンド (SYENFSA) は、ヒト膵がん細胞株 AsPC-1 に対して Ad ライブラリーをスクリーニングして同定した配列であり、その感染

受容体は明らかとなっていない。一方、標的する細胞表面分子あらかじめを決めておき、その標的ベクターを探索・同定するスクリーニング系の開発は重要である。そこで、特定の腫瘍細胞表面に発現する分子特異的に感染するベクターを開発するモデルケースとして、分担研究者の内田宏昭博士らに提示された、膵がんなど消化器がんで特異的に発現が増強している分子 Trop2 に対する標的 Ad ベクターの開発を試みた。

B. 研究方法

B-1. 膵がん標的腫瘍溶解 Ad ベクターの構築

分担研究者である田川雅敏博士との連携のもと、Survivin の転写調節領域により、ウイルスの増殖を制御する腫瘍溶解ウイルス (AdSur) のファイバーノブに、膵がん標的化リガンド (SYENFSA) を提示する標的化腫瘍溶解ウイルス (AdSur-SYE) を構築した。これらのウイルスは、欠失した E3 領域に EGFP 発現カセットが挿入されており、感染した細胞は EGFP 陽性となる。また、AdSur と AdSur-SYE では、ファイバーノブにおいて自然の感染受容体であるコクサッキーウイルス・アデノウイルス受容体 (CAR) との結合部に 4 か所の点突然変異が挿入され、CAR との結合は野生型と比べて抑制は 100 分の 1 以下に抑制されている。

B-2. ヒト膵がん外科切除標本での膵がん標的化腫瘍溶解アデノウイルスの腫瘍溶解効果の検討

ヒト膵膵がん(4例)の外科切除標本を細切してシングルセル化した後、96well dishで、 1×10^4 の膵膵がん細胞を 1×10^4 のマウス胎児性繊維芽細胞(MEF:mouse embryonic fibroblasts)と共培養し、AdSur、AdSur-SYE、非自己増殖型AdベクターAd Δ E1-AP及び野生型のファイバーと野生型のE1領域をもつAd-EGFPを、それぞれ 1×10^3 、 3×10^3 、 1×10^4 、 3×10^4 vp/cellで感染させた。6日後に、ArrayScan VTI HCS ReaderによりEGFP陽性細胞やMUC-1陽性細胞を観察するとともに、MTTアッセイにより細胞数を計測した。

B-3. Trop2 標的化アデノウイルスの探索

多種多様なリガンドをファイバーノブ上に提示するAdライブラリーを用いて、膵膵がんなどの消化器がんにて特異的に発現する細胞表面分子Trop2(Tumor-associated calcium signal transducer 2)を標的するAdベクターの探索を試みた。Trop2は、膵膵がんなどが特異的に発現する膜一回貫通型の糖タンパク質で、腫瘍細胞の増殖を促進する機能があり、過剰発現症例は予後が不良であることが報告されている。まず、Trop2を発現していないヒト膵膵がん細胞株AsPC-1に、レトロウイルスベクターを用いてヒトTrop2 cDNAを遺伝子導入したトランスフェクタントAT-5細胞を作成した。AT-5とAsPC-1細胞に、それぞれAdライブラリーを感染させ、数日後にcell lysateを回収して、同じ細胞に感染するといった過程を3回行った。最終的に粗ウイルス液からDNAを抽出して、Adのファイバー上に提示されている配列をシーケンズ解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、所属する研究施設の遺伝子組み換え実験や動物実験に関わる各種委員会の審査を受け理事長の承認を得た上で実施した。ヒト外科切除標本の利用にあたっては、「疫学研究に関する倫理指針」を遵守し試料等提供者の人権とプライバシーを保障しつつ研究を進めた。自己増殖型Adライブラリーを用いた実験は、拡散防止措置に関して大臣確認を得た上で実施した。

C. 研究結果

C-1. 標的化腫瘍溶解ウイルスの腫瘍溶解効果の増強

ヒト膵膵がん外科切除標本4例をシングルセル化しMEFと共培養して、各種ウイルス(AdSur-SYE, AdSur, Ad Δ E1-AP, Ad-EGFP)を感染させて6日後に細胞数を検討した。まず、ウイルス非感染細胞の免疫染色により、MEFの周囲

にMUC-1陽性細胞が集簇して増殖しており、MEFとの共培養でヒト膵膵がん細胞が6日以上生存することが分かった(図1A)。また、ウイルス感染細胞では、EGFP陽性細胞数は、AdSur-SYEのほうがAdSurよりも明らかに多く、Ad-Sur-SYEの感染効率が高いことが明らかとなった(図1B)。また多くのEGFP陽性細胞はMUC-1陽性であり、膵膵がん細胞に感染していることが明らかとなった(図1C)。細胞数に関しては、4例ともAdSur-SYEのほうがAdSurよりも明らかに細胞数が少なく、腫瘍溶解効果が著明に増強されていることが明らかとなった。AdSur-SYEの腫瘍溶解効果は、野生型のファイバーと野生型のE1領域をもつAd-EGFPと比べても同等以上であった(図1D)。

C-2. Trop2 標的アデノウイルスの同定

AT-5細胞と親株のAsPC-1細胞を用いて、Adライブラリーをスクリーニングし、アデノウイルスのファイバーノブ上に提示されている配列を解析した。AsPC-1細胞に感染する配列は両細胞に共通に出現し、Trop2細胞を認識する配列はAT-5細胞にのみ検出されると考えられた。得られた配列についてAT-5とAsPC-1細胞を比較したところ、AT-5細胞にのみ認められる1種類の配列が同定できた。ついで、この配列をファイバー上に提示するAdベクターを構築して、AT-5とAsPC-1細胞に同量ずつ感染させて、ルシフェラーゼアッセイを行うと、AT-5細胞のほうが、約3倍程度感染効率が上がっており、Trop2を標的していると考えられた。

D. 考察

本研究により、ヒト膵膵がんサンプルにおいても、膵膵がん標的化腫瘍溶解ウイルスAdSur-SYEが、非標的化ウイルスと比較して、腫瘍溶解効果が強く増強されること、が確認でき、腫瘍溶解ウイルスに標的性を付加する有用性を明らかにすることができた。本AdSur-SYEの臨床応用を図る上での根拠を得ることができたものと考えられる。

また、分子標的ベクターを開発するために、Trop2標的Adベクターの探索を行ったところ、Trop2発現トランスフェクタント特異的な配列が認められ、親株と比較して感染効率も上昇していたことより、Trop2標的ベクターが同定できたものと考えられた。感染効率や標的性の検討をさらに進め、臨床応用が可能であるかヒト臨床検体での検証も行う予定である。

今後は、他のがん腫、特に悪性中皮腫などに対する腫瘍標的ベクターを探索・開発し、分担

研究者田川雅敏博士が臨床試験を開始しようとしている悪性中皮腫に対する Ad-NK4 による遺伝子治療に組み合わせて、標的ベクターによる中皮腫に対する新たな治療戦略の開発に発展させる。

E. 結論

- 1) Survivin の転写調節領域で増殖を制御する腫瘍溶解ウイルスに、膵がん標的リガンドを組み合わせることで、腫瘍溶解 Ad ベクターの腫瘍溶解効果の強化が可能であることを、ヒト膵がん切除標本で示した。
- 2) Ad ライブラリーのスクリーニングにより、膵がん等の消化器がん特異的に発現する Trop2 を標的するベクターを同定した。今後、種々のがん特異的抗原を標的するベクターの開発に役立てることができる。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

●論文発表

- 1) Terracina KP, Aoyagi T, Huang W, Nagahashi M, Yamada A, Aoki K, Takabe K. Development of a metastatic murine colon cancer model. **J Surg Res** (in press)
- 2) Narumi K, Miyakawa R, Ueda R, Hashimoto H, Yamamoto Y, Yoshida T, Aoki K. Pro-inflammatory proteins S100A8/S100A9 activate natural killer cells via Interaction with a receptor of advanced glycation endproduct. **J Immunol** (in press)
- 3) Hashimoto H, Ueda R, Narumi K, Heike Y, Yoshida T, Aoki K. Type I IFN gene delivery suppresses regulatory T cells within tumors. **Cancer Gene Ther** 21:532-41, 2014.
- 4) Yamamoto Y, Hiraoka N, Goto N, Rin Y, Miura K, Narumi K, Uchida H, Tagawa M, Aoki K. A targeting ligand enhances infectivity and cytotoxicity of an oncolytic adenovirus in human pancreatic cancer tissues. **J Control Release** 192, 284-93, 2014.
- 5) Inagawa Y, Yamada K, Yugawa Y, Ohno S, Hiraoka N, Esaki M, Shibata T, Aoki K, Saya Y, Kiyono T. A human cancer xenograft model utilizing normal pancreatic duct epithelial cells conditionally transformed with defined oncogenes. **Carcinogenesis** 35; 1840-1846, 2014.
- 6) Yamamoto Y, Goto N, Miura K, Narumi K, Ohnami S, Ushida H, Miura Y, Yamamoto M, Aoki K. Development of a novel efficient method to construct an adenovirus library

displaying random peptides on the fiber knob. **Mol Pharmaceutics** 11; 1069-1074, 2014.

- 7) Aida K, Miyakawa R, Suzuki K, Narumi K, Udagawa T, Yamamoto Y, Chikaraishi T, Yoshida T, Aoki K. Suppression of Tregs by anti-GITR antibody enhances the antitumor immunity of IFN- α gene therapy for pancreatic cancer. **Cancer Sci** 105; 159-167, 2014.

●学会発表

- 1) Yamamoto Y, Hiraoka N, Rin Y, Miura K, Narumi K, Tagawa M, Aoki K. A targeting ligand enhances infectivity and cytotoxicity of an oncolytic adenovirus in human pancreatic cancer specimens. 第 19 回日本遺伝子治療学会学術集会. August 6-8, 2014.
- 2) Yamamoto Y, Rin Y, Goto N, Miura K, Hiraoka N, Tagawa M, Aoki K. A cancer-targeting ligand strongly enhances cytotoxic activity of oncolytic adenovirus in human pancreatic cancer tissues. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、9 月 25-27 日、2014 年.
- 3) Rin Y, Yamamoto Y, Goto N, Hiraoka N, Aoki K. Pancreatic cancer-targeting ligands isolated by a peptide-displaying library enhance adenoviral infectivity in human pancreatic cancer tissues. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、9 月 25-27 日、2014 年.
- 4) Narumi K, Ueda R, Hashimoto H, Yoshida T, Aoki K. Pro-inflammatory proteins S100A8/A9 activate NK cells via interaction with RAGE. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、9 月 25-27 日、2014 年.
- 5) Hashimoto H, Ueda R, Rin Y, Narumi K, Yoshida T, Aoki K. Intratumoral type I IFN gene transfer decreases regulatory T cells. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、9 月 25-27 日、2014 年.
- 6) Miyakawa R, Narumi K, Ueda R, Hashimoto H, Aoki K. Intratumoral delivery of GITR antibody induces a stronger antitumor immunity than systemic injection. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、9 月 25-27 日、2014 年.
- 7) Ikegami D, Tasaki Y, Suzuki M, Uezono Y, Aoki K, Narita M. Changes in the anti-tumor immune response by controlling the hypothalamic POMC neuron activity using optogenetic techniques. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、9 月 25-27 日、2014 年.
- 8) Ueda R, Narumi K, Miyakawa R, Hashimoto H, Aoki K. Natural killer cell-mediated antitumor effect of syngeneic hematopoietic stem cell transplantation. American Society of Hematology Annual Meeting. December 5-9,

2014 (San Francisco).

H. 知的財産権の出願・登録状況

●特許取得状況

特になし

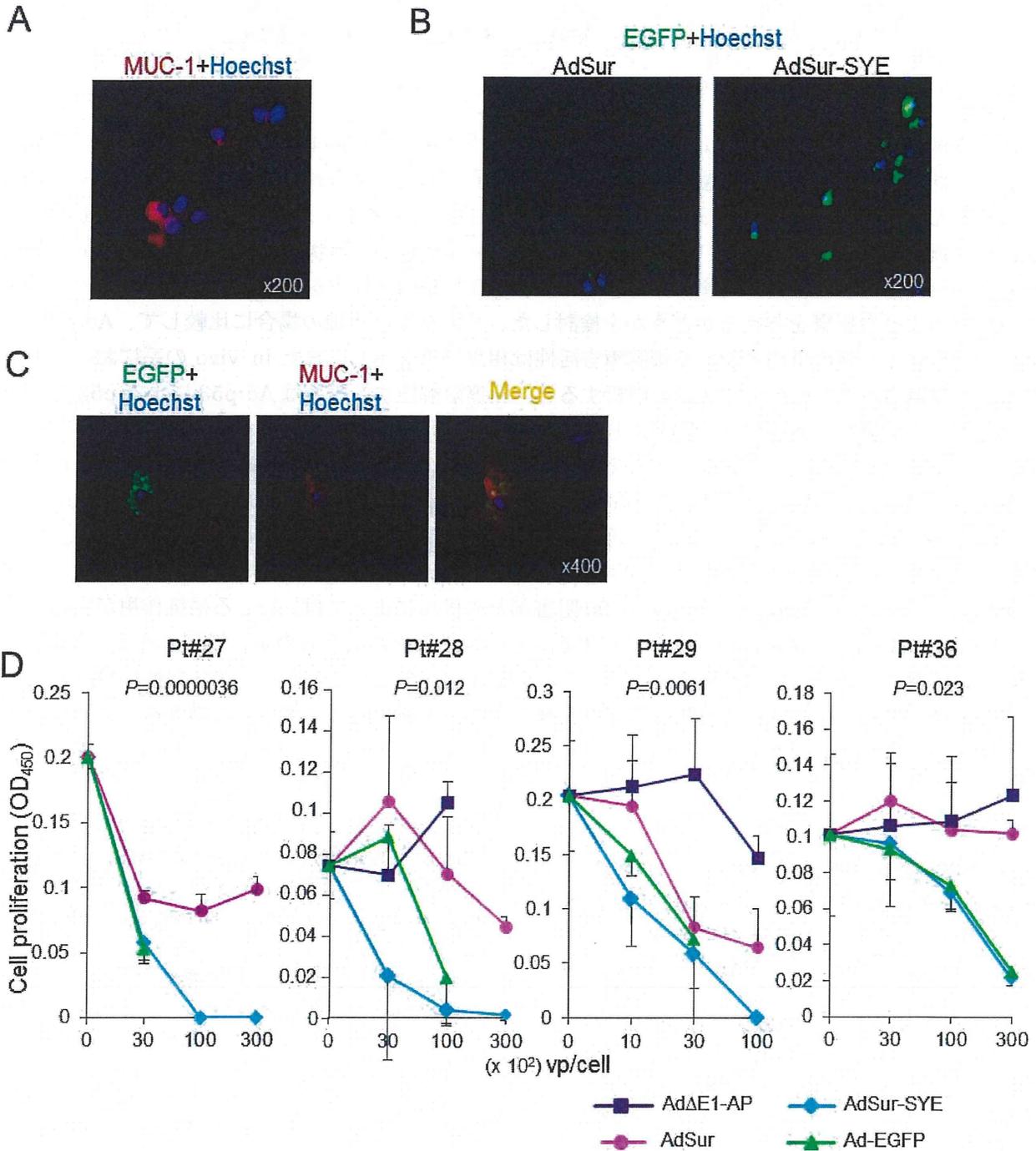


図1 ヒト膀胱がん切除標本におけるAdSur-SYEの腫瘍溶解効果

転写制御等を利用した腫瘍標的ベクターの構築と それによる抗腫瘍効果の検討

研究分担者 田川 雅敏 千葉県がんセンター・部長

研究要旨

腫瘍溶解性アデノウイルスによる細胞障害活性は、ウイルス増殖によるものであるが、その詳細についてはあまり明確ではなく、感染した細胞によって異なると考えられる。本研究の標的である難治性の膵がんは多くの症例で、p53 遺伝子が変異または欠損していることが多く、また悪性中皮腫は p53 経路の上流が 70–80%欠損しているため、機能的に p53 経路が失活状態にある。ともに、p53 遺伝子を発現させると、細胞死が誘導されることから、p53 経路の活性化が腫瘍溶解性ウイルスの細胞死誘導にどのような影響を与えるかどうかを検討した。その結果、単独の場合に比較して、Ad-p53 と腫瘍溶解性ウイルスの併用における細胞障害活性は相乗効果を示し、また *in vivo* の系においても併用効果が確認された。その分子機構を解析すると、腫瘍溶解性ウイルスは Ad-p53 による p53 発現のみならず、その経路の活性化を MDM2 分子の発現低下を介して増強し、アポトーシスを誘導する一方でオートファジーの関与は少ないと考えられた。しかし、p53 の発現自体はウイルス増殖そのものを低下させることが判明した。そこで、p53 分子の分解系を阻止する nutlin-3a や heat shock protein 90 阻害剤を用いて検討すると、確かに両者は内因性の p53 分子の増加と活性化を誘導した。次に Ad-53 による外因性の p53 分子に関して検討すると、nutlin-3a との併用は細胞障害活性等において相乗効果を示したが、heat shock protein 90 阻害剤との併用によっては、むしろ拮抗作用が生じていた。これは heat shock protein 90 分子が有するシャペロン効果によるものと推定される。本邦における腫瘍溶解性ウイルスによる臨床研究は、その実施症例が少ないことから、まず悪性中皮腫を対象に非増殖性アデノウイルスによる臨床研究を企画し、現在実施に向けてすべての準備を終えて、患者のリクルートに入っている。

A. 研究目的

現在の薬物治療の治療成績の向上のために、各腫瘍の特性を個別化し、それに応じて標的化医薬を使用することが大きな方向性の一つになっている。したがって、各腫瘍における主たるシグナル異常をバイオマーカーとして用い、この経路を制御することに研究の主眼が置かれている。遺伝子医薬の作用機構も上記の分子標的医薬となら変わる点がなく、特定の標的分子の発現を制御することによって、直接的な細胞死を誘導しようとするものである。とりわけ、ウイルス増殖によって腫瘍の細胞死を惹起する腫瘍溶解性アデノウイルスでは、その直接的細胞死のみならず、細胞シグナル系も活性化できることから、他の阻害剤との併用も可能であり、さらにはウイルスが有するアジュバンド効果によって、抗腫瘍免疫応答も促進することが可能である。すなわち、細胞死を起こした腫瘍より漏出する腫瘍抗原分子を、抗原提示細胞が効率

的に取り込む一方、同細胞が活性化によって二次的な抗腫瘍免疫応答の誘導が可能となる。この免疫応答の活性化は、従来の抗がん剤や放射線治療などが有する免疫抑制作用と一線を画し、当該ウイルスによる治療の優れた点である。さらに遺伝子医薬は従来の医薬品とは異なる細胞死の機構を有していることから、従来の抗がん剤等の併用や、他の治療法の補完作用を有すると考えられる。

腫瘍溶解性ウイルスは、中国市場において医薬品として上市され、欧米を中心に臨床試験が実施されてきている。これらの臨床試験の成績は、単独使用で抗がん剤耐性となった患者を対象にしているため、特段の治療効果を示してはいない。しかし、当該患者に対してすべての症例ではないにしても、他の抗がん剤と比較してもある一定レベル以上の抗腫瘍効果を示している例がある。最近では免疫抑制状態を解除するため、制御性 T 細胞等をはじめとする細胞集団の