

201411044A

厚生労働科学研究費補助金

がん対策推進総合研究事業（革新的がん医療実用化研究事業）

癌治療用組換え麻疹ウイルスの開発
に関する研究

平成26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27（2015）年5月

厚生労働科学研究費補助金

がん対策推進総合研究事業（革新的がん医療実用化研究事業）

癌治療用組換え麻疹ウイルスの開発
に関する研究

平成26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27（2015）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		

II. 分担研究報告

1. 癌治療用組換え麻疹ウイルスの適用範囲、安全性および全般に関する研究	-	10
甲斐知恵子、米田美佐子		
2. 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	-----	15
藤堂具紀、稲生靖		
3. 癌治療用組換え麻疹ウイルスの安定性に関する研究	-----	19
古川洋一		
4. 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	-----	22
長村文孝		
5. 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	-----	25
松田浩珍、田中あかね		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	28
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	31
-----------------	-------	----

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

研究要旨

癌治療用組換え麻疹ウイルス rMV-SLAMblind を、作出した受容体恒常的発現 Vero 細胞で継代後、ウイルスゲノムの安定性を確認した。また、GMP 対応標準手順書にそって、ウイルス増殖用マスターセルバンクを作製し、バリデーションのために海外の専門試験機関へ送付した。適用範囲試験として、難治性乳癌、肺癌、大腸癌細胞株を試験した結果、抗腫瘍効果が認められた。さらに、自家腫瘍への有効性と免疫効果を調べるために、イヌの乳癌細胞への効果を検証したところ、有効性を確認した。イヌの乳癌検体での PVRL4 の発現の検出法も確立した。イヌの獣医臨床試験に向けた承認申請に必須の体制を整備し、申請手続きを進めている。

研究分担者

米田美佐子・東京大学医科学研究所
実験動物研究施設・准教授

藤堂具紀・東京大学医科学研究所
先端がん治療分野・教授

稲生 靖・東京大学医科学研究所
先端がん治療分野・准教授

古川洋一・東京大学医科学研究所
臨床ゲノム腫瘍学・教授

長村文孝・東京大学医科学研究所
先端医療開発推進分野・教授

松田浩珍・東京農工大学農学研究院
獣医分子病態治療学研究室・教授

田中あかね・東京農工大学農学研究院
比較動物医学研究室・教授

成体組織では胎盤以外では発現せず、癌細胞で発現上昇することが報告されている。rMV-SLAMblind について、サルでの安全性も確認し、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認めたことから、競争力の高い有望なシーズと考えた。本開発研究では、rMV-SLAMblind について、承認の得られる細胞で安定性の高いウイルス増殖法の確立、マスター/ワーキングセルおよび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。

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。PVRL4 は

B. 研究方法

[増殖用細胞の構築]

昨年度構築したPVRL4発現Vero細胞またはMDCK細胞をクローニングして

安定的に発現する細胞株 2 株を樹立した(Vero/PVRL4、MDCK/PVRL4)。各細胞株に rMV-SLAMblind を感染させて継代を繰り返し、研究代表・分担者の連携により各代数のウイルスゲノム配列を解析した。

[ウイルス遺伝子変異の解析]

増殖用細胞株で増殖させたウイルスについて、昨年度確立した次世代シーケンサを用いる迅速解析手法を用いて、継代によって遺伝子変異導入部位およびその他に変化が生ずるかを検討した。

[マスターセルバンクおよびワーキングセルバンクの作製]

cGMP 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製するために、装置や細胞培養用器具および標準作業手順書などの体制を整備した。原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し、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した。代表・分担研究者の連携により、作製する標準手順書に従って、GMP 準拠施設にてウイルス増殖用細胞の大量培養を行った。作製したマスターセルバンクの一部を専門の検査機関に送り、バリデーション試験が進行中である。

[適用範囲試験]

昨年度、難治性乳癌由来培養細胞株 (triple negative 乳癌細胞株) について、細胞表面での PVRL4 発現が認められ、rMV-SLAMblind の有効性を示唆する結果が得られた。本年度は、この triple negative 乳癌細胞株、肺癌および大腸癌細胞株について、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 発現型組換え麻疹ウイルス(rMV-EGFP-SLAMblind) 接種後の蛍光観察により検討した。PVRL4 とウイルス感染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。細胞傷害性が認められた細胞株については、免疫不全マウスへ皮下移植したモデルを作出し、ウイルス投与による抗腫瘍効果を検討した。

[イヌの腫瘍細胞への有効性試験]

研究代表者・分担者間の連携により収集または初代培養細胞株樹立により得られたイヌの癌細胞株 9 株について、

PVRL4 発現を FACS で解析し、ウイルス感染性および細胞傷害性を検討した。細胞傷害性が認められた細胞株については、免疫不全マウスへ皮下移植したモデルを作出し、ウイルス投与による抗腫瘍効果を検討した。

[イヌの乳腺腫瘍症例における PVRL4 陽性率の検討]

昨年度に作製したイヌ PVRL4 に対するポリクローナル抗体を用いて、PVRL4 を検出するための免疫組織化学的手法の条件検討を行った。この手法を用いて関東地域の動物病院で手術によって切除された腫瘍片を用い、PVRL4 発現の有無を検討した。

[規制対応]

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った。

(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) 増殖用細胞の決定とウイルスゲノムの安定性試験：昨年度構築した PVRL4 発現 Vero 細胞 (Vero/PVRL4) または MDCK 細胞 (MDCK/PVRL4) をクローニングして安定的に発現する細胞株 2 株を樹立した。いずれの細胞株も無血清培地で増殖させた。それぞれの細胞株で rMV-SLAMblind を継代し、ウイルスゲノムの安定性を検討した。各継代後の細胞から RNA を抽出し、ウイルスゲノム配列を解析した。その結果、rMV-SLAMblind 作製時に人為的に導入したコドン 533 の変異(p.R533A)は、Vero/PVRL4 細胞でウイルス継代を行った場合には、7 代継代後も安定に保持されていた。MDCK/PVRL4 細胞でも SLAMblind 変異は 3 代継代後まで保持されていたが、ウイルスの増殖効率が安

定的ではなかった。この結果から、Vero/PVRL4 細胞を rMV-SLAMblind 増殖用細胞として決定した。他の変異についても全ゲノム領域について解析した結果、H 遺伝子で 1 カ所、F 遺伝子で 2 カ所においてゲノム変異が起きやすいことが示された。しかし、いずれも病原性関与の報告はない部位であり、低病原性は保たれていると考えられた。

2) セルバンクの製造：増殖用細胞株として決定した Vero/PVRL4 細胞を無血清培地(VP-SFM)で培養し、無菌試験とマイコプラズマ試験を実施し、凍結状態で治療ベクター開発室(cGMP 室)に搬入した。作成した標準作業手順書に従い細胞を解凍した後、最小限の継代数で培養規模を拡大し、マスターセルバンクを作製した。工程管理試験として培養上清の無菌試験とマイコプラズマ試験を継代ごとに実施したが、すべて陰性であった。バリデーション検査用に海外の専門試験機関への輸出手続きを行って搬出した。現在検査中である。マスターセルバンクとして約 200 本を保存し、1 本解凍して生存率と付着割合の確認を行った。さらに、マスターセルバンクから Vero/PVRL4 細胞を大量培養し、約 120 本をワーキングセルバンクとして保存した。

3) 適用範囲試験：昨年度難治性癌であるトリプルネガティブ乳癌への有効性が示唆された結果を受け、本年度は、まずトリプルネガティブ乳癌由来細胞株に対する rMV-SLAMblind の有効性を検討した。乳癌細胞株 2 株を用いて担癌マウスモデルを作出し、ウイルスを腫瘍内投与した結果、腫瘍増大抑制が観察された。難治性癌として肺癌細胞および大腸癌についても同様に検討した。その結果、ウイルス感受性株を複数見出した。肺癌細胞株および大腸癌細胞を用いて作出した担癌モデルマウスにおいて、ウイルスによる腫瘍増大抑制効果が認められた。肺癌細胞株については、肺定着モデルを作出し、rMV-SLAM blind の血管内投与試験を行ったところ、腫瘍に到達することが明らかとなった。

4) イヌ腫瘍細胞への有効性試験：昨年度に見出した乳癌細胞株 2 株に加え、新たに 7 株について、受容体発現およびウイルス感受性を検討した。その結果、計 4 株に PVRL4 発現を認め、いずれもウ

イルスに感染性を示した。担癌マウスモデルマウスで、rMV-SLAMblind の腫瘍内投与を行ったところ、顕著な腫瘍抑制効果が認められた。

5) イヌ乳癌症例における PVRL4 発現率の検討：昨年作製したイヌ PVRL4 に対する抗体を用いて、イヌの腫瘍片での PVRL4 発現を検出する手法を確立した。この手法を用いて、動物病院で乳腺腫瘍と診断され手術を受けたイヌの切除腫瘍片での、PVRL4 発現の有無を調べた結果、16 検体中 7 検体で PVRL4 の発現が認められた。

6) イヌの自家乳癌症例での非臨床試験にむけての準備：上記研究結果 4) 5)の結果を受けて、イヌ乳癌症例での非臨床試験は有望であると期待された。遺伝子組換えウイルスを用いた伴侶動物の獣医臨床試験を行うには、農林水産省の第一種使用規程の承認を受ける必要がある。本試験研究が我が国での最初の例となるため時間がかかっているが、官庁と相談しながら慎重に準備を進めている。この試験を行う獣医病院が所属する東京農工大学内に、本申請に必要な委員会の発足、委員会規則、様々な手順書などの制定を行った。また、イヌ症例にウイルスを接種する P2A 動物実験室も新たに整備し、ほとんどの申請準備を整え、現在手続きを進めている。また、イヌの乳癌症例を集めるための獣医病院のネットワークおよび連携体制も確立/維持も行っている。

7) 規制対応に関する情報収集：米国 FDA と EMA から、幾つかの重要なガイドラインが発出された。本年度米国 FDA から発出された「遺伝子治療薬、ベクターワクチン、遺伝子組換えウイルスまたは遺伝子組換え微生物を利用したその他の製剤に関する環境アセスメントの必要性および内容の判断について」のガイダンスには、環境リスクの軽減方法も示されていることから、今後の実際的な検討事項としてとりまとめることに有用であった。また、同じく米国 FDA から「ウイルスまたは細菌を利用した遺伝子治療薬と腫瘍溶解薬における排出試験のデザインと分析」が発出されている。この中にウイルス療法の前臨床試験段階での排出試験での確認事項が示されており、今後の治験での排出試験立案に有益な情報を

得ることができた。

D. 考察

ウイルス増殖用細胞の決定後、遺伝子変異が起こらない条件を検証し、またマスターセルバンク・ワーキングセルバンクの製造まで行えたことから、製造計画に関しては計画通り順調に進んでいる。ウイルス継代 7 代までは導入遺伝子部位に変異が起きないことから、今後のウイルス製造は少なくとも 7 代までは行える。今回全ゲノム配列解析を行った結果、H 遺伝子および F 遺伝子にわずかながら変異の起きやすい配列部位を見いだしたが、いずれも病原性に関与する報告のない部分であり、低病原性は維持されていると考えられる。増殖効率や細胞傷害性への影響は今後試験する必要がある。

適用範囲試験においては、難治性乳癌でも抗腫瘍効果が認められた結果は高く評価できる。移植肺癌細胞に対して静脈内投与方法でも到達したことから、転移癌への有効な治療法としても期待できる。今後は、転移モデルを作出して詳細な検討を行いたい。

計画しているイヌ自家乳癌症例での非臨床試験に向けた準備で、イヌ乳癌細胞株に対して抗腫瘍効果が認められ、さらにイヌ症例からの腫瘍片で PVRL4 の発現が認められた。この結果から、イヌ自家乳癌症例での非臨床試験が有意義であると期待される。遺伝子組換えウイルスを用いた伴侶動物の治療研究に対しては、事前に農水省の第一種使用規程の承認を得なければならない。我々の申請が我が国での第一例になるとのことで、昨年度中かけて官庁と密接に相談しながら進めてきたが、申請には至れなかった。平成 26 年度は申請に必要な機関内の委員会/規則および施設/設備の整備を全て整えるのに終始した。現在最終段階であり、平成 27 年度は速やかに申請に至る予定であるが、申請書受理後、審査におよそ半年ほどかかると言われていた。癌の治療用製剤を試験する動物モデルとしては、現在、免疫不全マウスへの異種移植モデルやマウスへの同種癌細胞移植モデル等が用いられているが、免疫不全マウスでは免疫の影響および動態が解析できず、マウス同種移植モデルでは、腫瘍細胞種が限られていることや治療用製剤のヒト癌細胞への影響は

検証できない等の欠点がある。イヌの自家腫瘍で効果を解析する非臨床試験は、免疫の影響や自然発生部位の環境での効果/影響が評価できる優れた動物モデル系として、米国等では積極的に進められているが、我が国での試験例は極めて少なく、組換えウイルスでは我々が初である。今回の我々の非臨床試験で得られる成果は、我が国での癌治療製剤等における自家腫瘍での動物検証モデルの有用性を計るための優れた例となると期待される。これらのことから、本計画期間中に開始できるよう引き続き鋭意努力する予定である。

E. 結論

ウイルス製造用の候補細胞株を 2 種作製し、7 代までのウイルス継代でもウイルスゲノムに変化の起きない細胞株として Vero/ PVRL4 細胞をウイルス製造用細胞株として決定することができた。この細胞株で、マスターセルバンクおよびワーキングセルバンクの製造を行った。適用範囲試験では難治性乳癌、肺癌、大腸癌細胞株で高い効果が認められた。イヌ乳癌症例での非臨床試験の計画のために、イヌ乳癌細胞株に対する rMV-SLAMblind の有効性を検証した結果、in vitro, in vivo とともに抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。乳癌症例からの腫瘍片で PVRL4 の発現も認めた。非臨床試験に向けての準備は整えた。さらに、規制対応のための情報収集も行った。以上のことから、平成 26 年度計画は順調に進んだと考える。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 1. The FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (Kai, C., Nakamura, T., Sato, H., Sugiyama, T., Yoneda, M. in 101 authors). A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature*, 50(7493):462-70, 2014.
 2. Andersson, R., The FANTOM Consortium et al. (Kai, C., Nakamura, T., Sato, H., Sugiyama, T., Yoneda, M. in 261 authors). An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature*, 507(7493): 455-61,

- 2014.
3. Imamura K, Imamachi N, Akizuki G, Kumakura M, Kawaguchi A, Nagata K, Kato A, Kawaguchi Y, Sato H, Yoneda M, Kai C, Yada T, Suzuki Y, Yamada T, Ozawa T, Kaneki K, Inoue T, Kobayashi M, Kodama T, Wada Y, Sekimizu K, Akimitsu N. Long Noncoding RNA NEAT1-Dependent SFPQ Relocation from Promoter Region to Paraspeckle Mediates IL8 Expression upon Immune Stimuli. *Mol Cell*. 53(3):393-406, 2014.
 4. Liu, Y., Sato, H., Hamana, M., Moonan, N. A., Yoneda, M. and Kai, C. Construction of an expression system for bioactive IL-18 and generation of recombinant canine distemper virus expressing IL-18. *J Vet Med Sci*, 76(9):1241-8, 2014.
 5. Takenaka, A., Yoneda, M., Seki, T., Uema, M., Kooriyama, T., Nishi, T., Fujita, K., Miura, R., Tsukiyama-Kohara, K., Sato, H. and Kai, C. Characterization of two recent Japanese field isolates of canine distemper virus and examination of the avirulent strain utility as an attenuated vaccine. *Vet. Microbiol*, 174(3-4): 372-8, 2014.
 6. Koyama-Nasu R, Haruta 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*, 33(17): 2236-2244, 2014.
 7. 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.
 8. Takai H, Masuda K, Hiraoka K, Echizen K, Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Ogawa H, Kozuka-Hata H, Oyama M, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Toyoshima C, Shirahige K, Akiyama T: 5-Hydroxymethylcytosine plays a critical role in glioblastomagenesis by recruiting the methylosome. *Cell Reports*, 9(1): 48-60, 2014.
 9. Tanaka S, Nakada M, Yamada D, Nakano I, Todo T, Ino Y, Hoshii T, Tadokoro Y, Ohta K, Ali MAE, Hayashi Y, Hamada JI, Hirao A. Strong therapeutic potential of γ -secretase inhibitor MRK003 for CD44-high and CD133-low glioblastoma initiating cells. *J Neurooncol*, 121(2): 239-50, 2014.
 10. Yamaguchi K, Komura M, Yamaguchi R, Imoto S, Shimizu E, Kasuya S, Shibuya T, Hatakeyama S, Takahashi N, Ikenoue T, Hata K, Tsurita G, Shinozaki M, Suzuki Y, Sugano S, Miyano S, Furukawa Y. Detection of APC mosaicism by next-generation sequencing in an FAP patient. *J Hum Genet*, 2015, in press.
 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. Ohashi K, Nagamura-Inoue T, Nagamura F, Tojo A, Miyamura K, Mori T, Kurokawa M, Taniguchi S, Ishikawa J, Morishima Y, Atsuta Y, Sakamaki H. Effect of graft sources on allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcome in adults with chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitors: a Japanese Society of Hematopoietic Cell Transplantation retrospective analysis. *Int J Hematol*, 100 296-306 2014.
 13. 長村文孝。トランスレーショナルリサーチの重要性。病院 73(7), 540-4, 2014.
 14. Amagai Y, Matsuda A, Jung K, Oida K, Jang H, Ishizaka S, Matsuda H, Tanaka A. A point mutation in the extracellular domain of KIT promotes tumorigenesis of mast cells via ligand-independent auto-dimerization. *Sci. Rep.*, 5, 9775, 2015.
 15. Jensen-Jarolim E, Fazekas J, Singer J, Hofstetter G, Oida K, Matsuda H, Tanaka A. Crosstalk of

- carcinoembryonic antigen and transforming growth factor- β via their receptors: comparing human and canine cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 64(5):531-537, 2015. 16. Furusaka T, Tanaka A, Matsuda H, Hasegawa H, Asakawa T, Shigihara S. A new combined therapy for functional organ preservation and survival in lateral oropharyngeal wall cancer. *Acta Otolaryngol*, 134(8): 872-80, 2014.
2. 学会発表
1. Kai C, Sugiyama T, Fujiyuki T, Yoneda M. A Novel strategy of oncotherapy using a recombinant oncolytic measles virus. 19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine. Athens, Greece, October 9-11, 2014. 招待講演。
 2. Fujiyuki T, Yoneda M, Obayashi K, Amagai Y, Ikeda F, Shoji K, Murakami Y, Sato H, Kai C. A measles virus blind to signaling lymphocytic activation molecule is an oncolytic agent for lung cancer treatment. XVIth International Congress of Virology. Montreal, Canada, Jul 27-Aug 1, 2014.
 3. Sugai A, Sato H, Hagiwara K, Kozuka-Hata H, Oyama M, Yoneda M, Kai C. Nucleocapsid assembly of measles virus requires a phosphorylation modification on the core domain of nucleoprotein. XVIth International Congress of Virology. Montreal, Canada, Jul 27-Aug 1, 2014.
 4. Fujiyuki T, Horie R, Yoneda M, Kuraishi T, Yasui F, Munekata K, Hattori S, Kida H, Kohara M, Kai C. Attenuated recombinant measles virus expressing highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) antigen is protective against HPAIV challenge in cynomolgus monkeys. XVIth International Congress of Virology. Montreal, Canada, Jul 27-Aug 1, 2014.
 5. Sato H, Yoneda M, Nakamura T, Ikeda F, Kawai J, Hayashizaki Y, Kai C. Transcription regulatory network atlas for comprehensive downregulation of housekeeping genes induced by morbillivirus infection. XVIth International Congress of Virology. Montreal, Canada, Jul 27-Aug 1, 2014.
 6. Sato H, Yoneda M, Nakamura T, Ikeda F, Sugai A, Kawai J, Hayashizaki Y, Kai C. Transcription regulatory network in morbillivirus-infected cells. The 15th IUBMB 24th FAOBMB-TSBMB Conference, Taipei, Taiwan, October 21-26, 2014.
 7. 藤幸知子、堀江亮、米田美佐子、倉石武、安井文彦、宗片圭祐、池田房子、木曾有里、権賢貞、石井美穂、佐藤宏樹、服部正策、喜田宏、小原道法、甲斐知恵子。霊長類感染モデルを用いた高病原性鳥インフルエンザウイルス抗原発現組換え麻疹ウイルスの防御効果の解析。第61回日本実験動物学会、2014年5月15-17日、札幌。
 8. 権賢貞、本田知之、佐藤宏樹、中江進、米田美佐子、甲斐知恵子。麻疹ウイルス N タンパク質発現マウスに生じた筋肉病変の解析。第61回日本実験動物学会、2014年5月15-17日、札幌。
 9. Amagai Y, Fujiyuki T, Furukawa Y, Yoneda M, Kai C. The antitumor activity of oncolytic recombinant measles virus on human colorectal cancer cells. 腫瘍溶解性組換え麻疹ウイルスによるヒト大腸癌細胞株への抗腫瘍効果の検討。第73回日本癌学会、2014年9月25-27日、横浜。
 10. Fujiyuki T, Yoneda M, Amagai Y, Shoji K, Murakami Y, Kai C. Oncolytic effect of measles virus blind to signaling lymphocytic activation molecule against human lung cancer. 免疫系細胞表面受容体との結合能を欠いた組換え麻疹ウイルスの肺癌細胞に対する増殖抑制効果。第73回日本癌学会、2014年9月25-27日、横浜。
 11. 庄司紘一郎、米田美佐子、藤幸知子、雨貝陽介、佐藤宏樹、甲斐知恵子。イヌ乳がんに対する組換え麻疹ウイルスを用いた新規治療法の開発。第157回日本獣医学会学術集会、2014、9月9-12日、札幌、北海道。
 12. 藤幸知子、米田美佐子、雨貝陽介、大林邦衣、池田房子、庄司紘一郎、村上善則、佐藤宏樹、甲斐知恵子。組換え麻疹ウイルスの肺癌細胞株に対する抗腫瘍効果。第62回日本ウイルス学会、2014年11月10日、横浜。

13. 雨貝陽介、藤幸知子、古川洋一、米田美佐子、甲斐知恵子。腫瘍溶解性組換え麻疹ウイルスの大腸癌細胞株に対する抗腫瘍効果および腫瘍内持続感染の検討。第 62 回日本ウイルス学会、2014 年 11 月 10 日、横浜。
14. 庄司紘一郎、米田美佐子、藤幸知子、雨貝陽介、松田浩珍、田中あかね、松田彬、佐藤宏樹、甲斐知恵子。腫瘍溶解性組換え麻疹ウイルスのイヌ乳がん細胞に対する有効性。第 62 回日本ウイルス学会、2014 年 11 月 10 日、横浜。
15. 菅井亮宏、佐藤宏樹、萩原恭二、秦裕子、尾山大明、米田美佐子、甲斐知恵子。麻疹ウイルスのヌクレオカプシド形成における N 蛋白質リン酸化修飾の役割。第 62 回日本ウイルス学会、2014 年 11 月 10 日、横浜。
16. 土井知光、権賢貞、本田知之、佐藤宏樹、米田美佐子、甲斐知恵子。麻疹ウイルス持続感染における感染様式のスイッチ。第 62 回日本ウイルス学会、2014 年 11 月 10 日、横浜。
17. 権賢貞、佐藤宏樹、米田美佐子、甲斐知恵子。MV-N によるオートファジー活性増加の解析。第 62 回日本ウイルス学会、2014 年 11 月 10 日、横浜。
18. Doi T, Sato H, Yoneda M, Kai C. An invasion system of measles virus from immune system and establishment of the persistent infection. 第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 10-12 日、京都。
19. 土井知光、権賢貞、本田知之、佐藤宏樹、米田美佐子、甲斐知恵子。麻疹ウイルス持続感染における感染形態の切り替え。第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25-27 日、横浜。
20. Uchihashi T, Nakahara H, Ino Y, Kogo M, Todo T: Therapeutic Efficacy of Oncolytic HSV-1 G47Δ for Lymph Node Metastases in Orthotopic Tongue Tumor Models. American Society of Gene & Cell Therapy 17th Annual Meeting, Washington DC, USA. May 21-24, 2014.
21. Todo T, Tanaka M, Ito M, Ito H, Ino Y: Clinical Trials of a third-generation recombinant oncolytic HSV-1 in recurrent glioblastoma and olfactory neuroblastoma patients. The 20th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, Lake Tahoe, CA, USA. July 20-23, 2014.
22. 福原浩、竹島雄太、本間之夫、稲生靖、藤堂具紀: An ongoing clinical trial of a third-generation oncolytic HSV-1 G47Δ for patients with castration resistant prostate cancer. 第 20 回日本遺伝子治療学会 (東京)、2014 年 8 月 6-8 日。
23. 伊藤博崇、岩井美和子、稲生靖、藤堂具紀: Generation of an oncolytic herpes simplex virus expressing an antibody as a therapeutic molecule. 第 20 回日本遺伝子治療学会 (東京)、2014 年 8 月 6-8 日。
24. 帰山ともみ、稲生靖、福原浩、中坪拓也、岩井美和子、藤堂具紀: Arming oncolytic HSV-1 (G47Δ) with anti-VEGF factors confers additional therapeutic benefits. 第 20 回日本遺伝子治療学会 (東京)、2014 年 8 月 6-8 日。
25. 内橋俊大、中原寛和、稲生靖、福原浩、岩井美和子、古郷幹彦、藤堂具紀: Intratumoral inoculation with oncolytic HSV-1 G47Δ suppresses lymph node metastases in orthotopic tongue cancer models. 第 20 回日本遺伝子治療学会 (東京)、2014 年 8 月 6-8 日。
26. 阿部真也、稲生靖、福原浩、岩井美和子、渡邊聡明、藤堂具紀: Effect of virus therapy for colorectal cancer with genetically engineered herpes simplex virus type 1. 第 20 回日本遺伝子治療学会 (東京)、2014 年 8 月 6-8 日。
27. 谷島翔、稲生靖、福原浩、岩井美和子、瀬戸泰之、藤堂具紀: 第 3 世代癌治療用ヘルペスウイルス、G47Δ を用いた食道癌への新しい治療法。第 20 回日本遺伝子治療学会 (東京)、2014 年 8 月 6-8 日。
28. 樋口明子、稲生靖、福原浩、岩井美和子、藤堂具紀: Oncolytic virus therapy for malignant melanoma using interleukin-12 expressing herpes simplex virus type 1. 第 20 回日本遺伝子治療学会 (東京)、2014 年 8 月 6-8 日。
29. 角谷成紀、福原浩、田口慧、竹島雄太、本間之夫、稲生靖、藤堂具紀: Oncolytic virus therapy using recombinant HSV-1 for non-seminoma germ cell tumors. 第 20 回日本遺伝子

- 治療学会（東京）、2014年8月6-8日。
第73回日本癌学会学術総会（横浜）、
2014年9月25-27日。
30. 谷島翔、稲生靖、岩井美和子、福原浩、瀬戸泰之、藤堂具紀：第3世代癌治療用ヘルペスウイルス、G47Δを用いた食道癌への新しい治療戦略。第73回日本癌学会学術総会（横浜）、2014年9月25-27日。
31. 伊藤博崇、稲生靖、田中実、藤堂具紀：Generation of a therapeutic antibody-expressing oncolytic herpes simplex virus. 第73回日本癌学会学術総会（横浜）、2014年9月25-27日。）
32. 阿部真也、稲生靖、福原浩、岩井美和子、渡邊聡明、藤堂具紀：Therapeutic efficacy of genetically engineered oncolytic herpes simplex virus type 1 (G47Δ) in colorectal cancer. 第73回日本癌学会学術総会（横浜）、2014年9月25-27日。
33. 坂田義詞、稲生靖、岩井美和子、池田徳彦、藤堂具紀：Oncolytic virus therapy for lung cancers using a third generation oncolytic herpes simplex virus type 1 G47Δ. 第73回日本癌学会学術総会（横浜）、2014年9月25-27日。
34. 岩井美和子、稲生靖、内橋俊大、赤津裕一、渡部徹朗、宮園浩平、藤堂具紀：がん幹細胞が豊富な腫瘍に対するTGF-β阻害分子発現型HSV-1の治療効果。第73回日本癌学会学術総会（横浜）、2014年9月25-27日。
35. 古川洋一。家族性腫瘍分野におけるNGSの活用。日本遺伝子診療学会 遺伝子診断・検査技術推進フォーラム（東京）、2014年12月12日。
36. 大杉友之、山口貴世志、朱朱赤、黄雨晴、池上恒雄、古川洋一。WNTシグナル経路を介して発現抑制されるインターフェロン誘導タンパク質ファミリーの同定。第73回日本癌学会学術総会（横浜）、2014年9月27日。
37. Fujiwara N, Nagamura F, Matsumoto K, Yamashita N, Takemura, Kamibeppu K. Nursing Education Program on Translational Research as a Master's Course. International Association of Clinical Research Nurse. Boston, USA, November 5-7, 2014.
38. Tanaka A, Oida K, Amagai Y, Matsuda H. Role of nuclear factor-κB in both intrinsic and acquired resistance against endocrine therapy in breast cancer. 19th World Congress on Advances in Oncology. Athens, Greece, October 9-11, 2014.39. Nishikawa S, Tanaka A, Oida K, Matsuda H. Effects of thermo-therapy on malignant mesothelioma. 19th World Congress on Advances in Oncology. Athens, Greece, October 9-11, 2014.
- 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

癌治療用組換え麻疹ウイルスの適用範囲、安全性および全般に関する研究

研究分担者 甲斐知恵子 東京大学医科学研究所実験動物研究施設・教授
研究分担者 米田美佐子 東京大学医科学研究所実験動物研究施設・准教授

研究要旨

癌治療用組換え麻疹ウイルスの適用範囲試験として、難治性のトリプルネガティブ乳癌、肺癌、大腸癌に対する有効性を示唆した。また、転移癌モデルに遠隔投与試験を行い、転移癌に対する有効性も示唆する結果を得た。ウイルスの安定性試験のために、rMV-SLAMblind の増殖用細胞候補株を用いてウイルス継代を行って7代継代し、他の分担研究者との連携により安定性を確認した。GMP 準拠施設でのマスターセルバンクおよびワーキングセルバンクも他の分担研究者と連携して作製した。イヌを用いた獣医臨床試験用に、イヌ乳癌細胞株を分担研究者との連携で収集あるいは作製して、本ウイルスの有効性を確認した。さらにイヌ乳癌臨床検体において PVRL4 が高率に発現することを確認した。

A. 研究目的

rMV-SLAMblind の適用範囲試験、安全性試験、GMP 準拠細胞およびウイルスのバリデーションを行う。また、研究班全体の中核として他の分担研究者が担当する研究課題に対しても密接な連携研究を行って全体を推進する。その概要はウイルスの安定性試験のためのウイルス準備、GMP 準拠の細胞およびウイルスの製造のための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、イヌでの獣医臨床試験のための rMV-SLAMblind のイヌ癌細胞に対する有効性試験やイヌ PVRL4 診断法の樹立である。

B. 研究方法

1) 難治性癌に対する適用範囲拡大試験：

難治性癌（トリプルネガティブ乳癌、肺癌、大腸癌）由来培養細胞株について、細胞表面における PVRL4 の発現を抗 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。細胞傷害性が認められた細胞株については、免疫不全マウスへ皮下移植したモデルを作成し、ウイルス投与による抗腫瘍効果を検討した。

2) 増殖用細胞の決定：

昨年度に構築途中であった PVRL4 発現 Vero 細胞(Vero/PVRL4)および PVRL4 発現 MDCK 細胞(MDCK /PVRL4)をクローニングし、2種類の PVRL4 発現細胞を構築した。各細胞株に rMV-SLAMblind を感染させて継代を繰り返す、古川分担研究者との連携により各代数のウイルスゲノム配列を解析した。

3) マスターセルバンクおよびワーキングセルバンクの製造：

藤堂・稲生分担研究者と連携して、マスターセルバンクおよびワーキングセルバンク製造の標準手順書を準備し、GMP 準拠施設にて Vero/ PVRL4 細胞の大量培養を行った。マスターセルバンクの一部を専門の検査機関（イギリス）に送り、バリデーション試験を進めている。

4) イヌの腫瘍細胞への有効性試験：

松田・田中分担研究者と連携して収集、または得られた癌組織から初代培養細胞株を樹立したイヌ乳癌細胞計9株において、PVRL4発現をFACSで解析し、ウイルス感染性および細胞傷害性を検討した。細胞傷害性が認められた細胞株については、免疫不全マウスへ皮下移植したモデルを作出し、ウイルス投与による抗腫瘍効果を検討した。

5) イヌの乳腺腫瘍症例におけるPVRL4陽性率の検討：

昨年度に作製したイヌ PVRL4 に対するポリクローナル抗体を用いて、PVRL4を検出するための免疫組織化学的手法の条件検討を行った。この手法を用いて関東地域の動物病院で手術によって切除された腫瘍片を用い、PVRL4発現の有無を検討した。

(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性に行った。遺伝子組換え実験は、東京大学遺伝子組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) 難治性癌に対する適用範囲拡大：

難治性乳癌細胞株に対するrMV-SLAMblindの抗腫瘍効果を検討するため、昨年度に見出したrMV-SLAMblind感受性難治性 triple negative 乳癌細胞株を用いて担癌マウスモデルを作出し、ウイルスを腫瘍内投与した。その結果、調べた2種の細胞株に対していずれも腫瘍増大抑制が観察された。そのうち1種については、ウイルスの最終投与から約2ヶ月を経ても腫瘍増大が抑制されたままであった。

難治性癌として肺癌細胞および大腸癌についても同様に検討した。その結果、ウイルス感受性株を複数見出した。肺癌細胞株1株および大腸癌細胞2株を用いて作出した担癌モデルマウスにおいて、ウイルスの抗腫瘍効果が認められた。肺癌細胞株については、皮下移植モデルだけでなく、肺定着モデルを作出でき、血管内投与によってウイルスが腫瘍に到達することが明らかとなった。

2) 増殖用細胞の決定：

クローニング後のVero/PVRL4細胞およびMDCK/PVRL4細胞を無血清培地で増殖させた。各細胞を用いてrMV-SLAMblindを継代し、ウイルスゲノム配列を解析した結果、Vero/PVRL4細胞については、SLAMblind変異は7代継代後も保持されていた。MDCK/PVRL4細胞でもSLAMblind変異は3代継代後まで保持されていたが、ウイルスの増殖が安定的ではなかった。これらの結果から、Vero/PVRL4細胞をrMV-SLAMblind増殖用細胞として決定した。

3) セルバンクの製造：

Vero/PVRL4細胞を無血清培地(VP-SFM)で大量培養し、マスターセルバンクとして約200本を保存した。マスターセルバンクからさらにVero/PVRL4細胞を大量培養し、約120本をワーキングセルバンクとして保存した。

4) イヌ腫瘍細胞への有効性試験：

昨年度に見出した乳癌細胞株に加え、新たに7株を入手して、受容体発現およびウイルス感受性を検討した。その結果、計4株がPVRL4を発現しており、いずれもウイルスに感染性を示した。3株については、ウイルス感染後の高率な細胞傷害性が認められた。担癌マウスモデルの作出に成功した1株について、rMV-SLAMblindの腫瘍内投与を行ったところ、顕著な腫瘍抑制効果を認めた。

5) イヌ乳癌症例におけるPVRL4発現率の検討：

動物病院で乳腺腫瘍と診断され手術を受けたイヌの切除腫瘍片を用い、PVRL4発現の有無を調べた。16検体を調べた結果、7検体(43%)でPVRL4の発現が見られた。

D. 考察

適用範囲試験では難治性乳癌について、2種の異なる細胞株を用いた担癌モデルにおいてrMV-SLAMblindの腫瘍抑制効果が認められた。また、肺癌・大腸癌でも有効性が認められた。さらに、血管内投与によってウイルスが到達することが判明したことから、転移癌への有効性が期待できると考えられた。来年度は、転移癌モデルを作出して、

より詳細な解析を行う予定である。

ウイルス製造用細胞株の決定およびマスターセルバンク・ワーキングセルバンクの製造が進行した。平成 27 年度はこの細胞株を用いてウイルス増殖の条件検討を行った後、実際に製造を行う予定である。

イヌ乳癌細胞株を用いた解析の結果、イヌ PVRL4 発現癌細胞に対して、rMV-SLAMblind は抗腫瘍効果を示す可能性が高いことが明らかとなった。イヌ PVRL4 とヒト PVRL4 は相同性が非常に高く、またウイルスとの相互作用に必要なアミノ酸が両方で保存されている。このことから、麻疹ウイルスはイヌ PVRL4 とも相互作用が可能であろうと予想したが、実際にそれが示された。さらに、実際のイヌ臨床検体において高頻度で PVRL4 陽性検体が見出されたことから、イヌにおいても PVRL4 が腫瘍において発現増強すると考えられた。PVRL4 とイヌ乳腺腫瘍の悪性度との関連性については今後検討を行う必要がある。以上の結果から、イヌ自家乳癌症例での非臨床試験は可能であり、有用な成果が期待できると考える。

E. 結論

本年度に計画したウイルス製造用細胞株の決定およびマスターセルバンク・ワーキングセルバンクの製造は予定通りに進んだ。また、適用範囲試験の結果から、難治性乳癌および他の難治性癌（肺癌・大腸癌）、また転移癌への有用性が示唆されたことから、さらなる有効性も期待できる。イヌ乳癌に関しても、本ウイルスを用いた療法の有用性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. The FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (Kai, C., Nakamura, T., Sato, H., Sugiyama, T., Yoneda, M. in 101 authors). A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature*, 50(7493):462-70, 2014.
2. Andersson, R., The FANTOM Consortium et al. (Kai, C., Nakamura, T., Sato, H., Sugiyama, T., Yoneda, M.

in 261 authors). An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature*, 507(7493): 455-61, 2014.

3. Imamura K, Imamachi N, Akizuki G, Kumakura M, Kawaguchi A, Nagata K, Kato A, Kawaguchi Y, Sato H, Yoneda M, Kai C, Yada T, Suzuki Y, Yamada T, Ozawa T, Kaneki K, Inoue T, Kobayashi M, Kodama T, Wada Y, Sekimizu K, Akimitsu N. Long Noncoding RNA NEAT1-Dependent SFPQ Relocation from Promoter Region to Paraspeckle Mediates IL8 Expression upon Immune Stimuli. *Mol Cell*. 53(3):393-406, 2014.
 4. Liu, Y., Sato, H., Hamana, M., Moonan, N. A., Yoneda, M. and Kai, C. Construction of an expression system for bioactive IL-18 and generation of recombinant canine distemper virus expressing IL-18. *J Vet Med Sci*, 76(9):1241-8, 2014.
 5. Takenaka, A., Yoneda, M., Seki, T., Uema, M., Kooriyama, T., Nishi, T., Fujita, K., Miura, R., Tsukiyama-Kohara, K., Sato, H. and Kai, C. Characterization of two recent Japanese field isolates of canine distemper virus and examination of the avirulent strain utility as an attenuated vaccine. *Vet. Microbiol*, 174(3-4): 372-8, 2014.
- #### 2. 学会発表
1. Kai C, Sugiyama T, Fujiyuki T, Yoneda M. A Novel strategy of oncotherapy using a recombinant oncolytic measles virus. 19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine. Athens, Greece, October 9-11, 2014. 招待講演。
 2. Fujiyuki T, Yoneda M, Obayashi K, Amagai Y, Ikeda F, Shoji K, Murakami Y, Sato H, Kai C. A measles virus blind to signaling lymphocytic activation molecule is an oncolytic agent for lung cancer treatment. XVIth International Congress of Virology. Montreal, Canada, Jul 27-Aug 1, 2014.
 3. Sugai A, Sato H, Hagiwara K, Kozuka-Hata H, Oyama M, Yoneda M, Kai C. Nucleocapsid assembly of measles

- virus requires a phosphorylation modification on the core domain of nucleoprotein. XVIth International Congress of Virology. Montreal, Canada, Jul 27-Aug 1, 2014.
4. Fujiyuki T, Horie R, Yoneda M, Kuraishi T, Yasui F, Munekata K, Hattori S, Kida H, Kohara M, Kai C. Attenuated recombinant measles virus expressing highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) antigen is protective against HPAIV challenge in cynomolgus monkeys. XVIth International Congress of Virology. Montreal, Canada, Jul 27-Aug 1, 2014.
 5. Sato H, Yoneda M, Nakamura T, Ikeda F, Kawai J, Hayashizaki Y, Kai C. Transcription regulatory network atlas for comprehensive downregulation of housekeeping genes induced by morbillivirus infection. XVIth International Congress of Virology. Montreal, Canada, Jul 27-Aug 1, 2014.
 6. Sato H, Yoneda M, Nakamura T, Ikeda F, Sugai A, Kawai J, Hayashizaki Y, Kai C. Transcription regulatory network in morbillivirus-infected cells. The 15th IUBMB 24th FAOBMB-TSBMB Conference, Taipei, Taiwan, October 21-26, 2014.
 7. 藤幸知子、堀江亮、米田美佐子、倉石武、安井文彦、宗片圭祐、池田房子、木曾有里、権賢貞、石井美穂、佐藤宏樹、服部正策、喜田宏、小原道法、甲斐知恵子。霊長類感染モデルを用いた高病原性鳥インフルエンザウイルス抗原発現組換え麻疹ウイルスの防御効果の解析。第61回日本実験動物学会、2014年5月15-17日、札幌。
 8. 権賢貞、本田知之、佐藤宏樹、中江進、米田美佐子、甲斐知恵子。麻疹ウイルスNタンパク質発現マウスに生じた筋肉病変の解析。第61回日本実験動物学会、2014年5月15-17日、札幌。
 9. Amagai Y, Fujiyuki T, Furukawa Y, Yoneda M, Kai C. The antitumor activity of oncolytic recombinant measles virus on human colorectal cancer cells. 腫瘍溶解性組換え麻疹ウイルスによるヒト大腸癌細胞株への抗腫瘍効果の検討。第73回日本癌学会、2014年9月25-27日、横浜。
 10. Fujiyuki T, Yoneda M, Amagai Y, Shoji K, Murakami Y, Kai C. Oncolytic effect of measles virus blind to signaling lymphocytic activation molecule against human lung cancer. 免疫系細胞表面受容体との結合能を欠いた組換え麻疹ウイルスの肺癌細胞に対する増殖抑制効果。第73回日本癌学会、2014年9月25-27日、横浜。
 11. 庄司紘一郎、米田美佐子、藤幸知子、雨貝陽介、佐藤宏樹、甲斐知恵子。イヌ乳がんに対する組換え麻疹ウイルスを用いた新規治療法の開発。第157回日本獣医学会学術集会、2014、9月9-12日、札幌、北海道。
 12. 藤幸知子、米田美佐子、雨貝陽介、大林邦衣、池田房子、庄司紘一郎、村上善則、佐藤宏樹、甲斐知恵子。組換え麻疹ウイルスの肺癌細胞株に対する抗腫瘍効果。第62回日本ウイルス学会、2014年11月10日、横浜。
 13. 雨貝陽介、藤幸知子、古川洋一、米田美佐子、甲斐知恵子。腫瘍溶解性組換え麻疹ウイルスの大腸癌細胞株に対する抗腫瘍効果および腫瘍内持続感染の検討。第62回日本ウイルス学会、2014年11月10日、横浜。
 14. 庄司紘一郎、米田美佐子、藤幸知子、雨貝陽介、松田浩珍、田中あかね、松田彬、佐藤宏樹、甲斐知恵子。腫瘍溶解性組換え麻疹ウイルスのイヌ乳がん細胞に対する有効性。第62回日本ウイルス学会、2014年11月10日、横浜。
 15. 菅井亮宏、佐藤宏樹、萩原恭二、秦裕子、尾山大明、米田美佐子、甲斐知恵子。麻疹ウイルスのヌクレオカプシド形成におけるN蛋白質リン酸化修飾の役割。第62回日本ウイルス学会、2014年11月10日、横浜。
 16. 土井知光、権賢貞、本田知之、佐藤宏樹、米田美佐子、甲斐知恵子。麻疹ウイルス持続感染における感染様式のスイッチ。第62回日本ウイルス学会、2014年11月10日、横浜。
 17. 権賢貞、佐藤宏樹、米田美佐子、甲斐知恵子。MV-Nによるオートファジー活性増加の解析。第62回日本ウイルス学会、2014年11月10日、横浜。
 18. Doi T, Sato H, Yoneda M, Kai C. An invasion system of measles virus from immune system and establishment of the

persistent infection. 第43回日本免疫学会学術集会、2014年12月10-12日、京都。

19. 土井知光、権賢貞、本田知之、佐藤宏樹、米田美佐子、甲斐知恵子。麻疹ウイルス持続感染における感染形態の切り替え。第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25-27日、横浜。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願・取得

特願 2014-193156

提出日 平成26年9月22日

発明の名称：腫瘍治療用遺伝子改変麻疹ウイルス

発明者：甲斐知恵子、米田美佐子

出願人：国立大学東京大学

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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
（非臨床試験計画、製剤製造）

研究分担者 藤堂 具紀 東京大学医科学研究所先端がん治療分野・教授
研究分担者 稲生 靖 東京大学医科学研究所先端がん治療分野・准教授

研究要旨

医科学研究所附属病院治療ベクター開発室において癌治療用組換え麻疹ウイルスの製造を行うための体制を整備し、製造工程を開始した。すなわち、ウイルス製造用のマスターセルバンク構築のための標準作業手順書の整備の支援を行った。また、製造作業従事者の教育訓練を実施した。施設使用の現地訓練の後、マスターセルバンクの調製、海外の専門機関への依頼手続きと送付、そしてワーキングセルバンクの調製作業を分担した。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は最新の記載内容を確認し、今回の試験項目を選定した。

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を行うことを分担研究の目的とする。

B. 研究方法

cGMP 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製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し、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。製造担当者を雇用し、製造のための教育訓練の実施の後、製造作業を開始する。

（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用に関す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 cGMP 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。過去の医薬品製造に使用された実績も確認のうえ、今回は ATCC から分譲されている Vero 細胞(CCL-81) を材料として使用した。研究代表者のもとで Vero 細胞に PVRL4 遺伝子の導入を行い、恒常的発現の確認の後に無菌試験とマイコプラズマ試験を実施し、凍結状態で治療ベクター開発室に搬入した。標準作業手順書に従い細胞を解凍した後、最小限の継代数で培養規模を拡大し、マスターセルバンクを作成した。工程管理試験として培養上清の無菌試験とマイコプラズマ試験を継代ごとに実施したが、すべて陰性であった。海外の専門試験機関への輸出手続きの後、検査用チューブを送付した。マスターセルバンクを 1 本解凍し、生存率と付着割合の確認を行った。

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情報を参考にすることが可能であった。今回の製造工程とベクター調製施設の過去の実績とは多少相違点があるが、細胞の増殖速度等は同様であった。今回、開始原料として WHO-Vero 細胞ではなく ATCC CCL-81 を使用しており、また GMP 施設への搬入に先立ち遺伝子導入等の製造工程が実施されているため、混入する可能性のある病原体の想定など慎重に検討のうえ外部への試験委託項目を選定した。

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、標準作業手順書の整備の後、マスターセルバンクおよびワーキングセルバンクの調製をおこなった。製造記録の確定および承認の後、マスターウイルスバンク、ワーキングウイルスバンク、そして臨床用ウイルス調製を行うべく準備を進める予定である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Koyama-Nasu R, Haruta 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*, 33(17): 2236-2244, 2014.
- ② 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.