

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書

毒性、薬効検証のための非臨床研究

a. 薬効薬理試験

担当責任者 金田安史（大阪大学大学院医学系研究科・教授）

研究要旨

HVJ-E は不活性化したセンダイウイルス粒子であるが、この粒子自体に多彩な抗腫瘍作用があることが明らかになり、メラノーマや前立腺癌に対する臨床試験が行われている。その作用の 1 つは、抗腫瘍免疫の活性化であり腫瘍細胞に対する CTL (cytotoxic T cell), NK (natural killer) cell の活性化や制御性 T 細胞の抑制を起すことができる。一方、前立腺癌やグリオブラストーマなどの腫瘍細胞に対しては腫瘍細胞選択的なアポトーシスを誘導するが、それは HVJ-E に含有されるウイルス RNA 断片が RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) によって認識され、それが MAVS (mitochondria anti-viral signaling protein) に伝えられて、アポトーシス誘導因子の TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) や NOXA (ラテン語で damage の意味) を癌細胞選択的に活性化することが原因であることが分かっている。様々なタイプ（上皮型、肉腫型、二相型）のヒト悪性胸膜中皮腫細胞 (malignant pleural mesothelioma; MPM) に対しても HVJ-E は細胞死を誘導し、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 と同等の細胞増殖抑制効果を有していた。実際に、EHMES 細胞に HVJ-E を作用させると Noxa, TRAIL の遺伝子発現がそれぞれ 8 倍、2 倍増強されることが明らかになった。PC3 細胞でみられるような Interferon- β に発現増強は起こらなかった。しかし RIG-I, MAVS の siRNA によりそれぞれの遺伝子発現を抑制しても、Noxa, TRAIL の発現は抑制されなかった。そこで、MPM 細胞における HVJ-E の感受性遺伝子を網羅的に調べるため、CRISPR/Cas9 系を利用して網羅的に遺伝子をノックアウトして HVJ-E 耐性細胞を分離し、責任遺伝子を明らかにする研究を開始した。もう 1 つの抗腫瘍作用は抗腫瘍免疫の活性化であり、腫瘍に対する CTL (cytotoxic T cell) や NK (natural killer) cell の活性化と制御性 T 細胞の抑制であることを既に報告している。その分子機構は、前者のエフェクター細胞の活性化については、virus RNA 断片が樹状細胞や腫瘍細胞に膜融合で導入され、RIG-I 経路を活性化して、IFN- β , IP-10, RANTES 等の産生を増強することによっており、後者の制御性 T 細胞の抑制は、F 蛋白質が直接樹状細胞を刺激して NF- κ B の経路を活性化して IL-6 産生を促進させることによることを明らかにしている。しかし腫瘍組織内の HVJ-E の標的細胞は腫瘍細胞自体と樹状細胞であることは既に報告しているが、HVJ-E を投与したメラノーマ患者の腫瘍組織ではマクロファージの浸潤が著明であることから、マクロファージも標的細胞になるのではないかと考えた。そこで骨髄や腫瘍組織からマクロファージを分離して、HVJ-E を作用させた結果、HVJ-E は M2 マクロファージを M1 型にシフトさせることにより T 細胞を Th1 型にシフトさせ、CTL 機能を増強させることが明らかになった。またその経路は、RIG-I を経由したものであること、また RIG-I 経路とは別に NF- κ B の経路が関与していることが示唆された。マウス中皮腫モデル治療実験で、HVJ-E の高い抗腫瘍効果を確認でき、抗癌剤との併用治療実験では相乗効果を認めた。

A 研究目的

本事業全体の目的は、大学発の知財権を国内外で確保した純国産医薬 HVJ-E を、標準的化学療法が奏効しなくなった化学療法抵抗性悪性胸膜中皮腫症例に対し投与する医師主導治験を行い、化学療法抵抗性悪性胸膜中皮腫に対する革新的がん治療薬の実用化を目指すものである。その中で本研究の目的は、悪性胸膜中皮腫に対する HVJ-E の抗腫瘍作用をさらに解明することにより、有効性の高い投与方法、投与計画を打ち立てて医師主導治験に貢献するとともに、HVJ-E の機能をさらに高めて治療効果を増強できる新規治療剤の開発に資することにある。

B 研究方法

HVJ は ATCC より購入した Sendai virus の Z 株 (VR-105 parainfluenza 1 Sendai/52) を用い、有精鶏卵で増殖させ、遠心法により生成した。LLCMK2 細胞に HVJ を感染させて 24 時間以降に培養液中に産生される HVJ は不活性型 F 蛋白質 (F0) を有し融合能を持たない。この HVJ を低濃度 (0.0004%) のトリプシンで処理すると F1、F2 に開裂し融合能を持つようになる。また LLCMK2 細胞中に HVJ の HN 遺伝子に対する siRNA を導入しておいて、24 時間後に HVJ を感染させると産生される HVJ は HN 蛋白質をほとんど有しないため、HVJ 受容体であるガングリオシドに結合できず融合能を欠失したウイルスとなる。また高濃度のトリプシンを HVJ に処理し膜蛋白質の F、HN を分解した融合能のない HVJ

も作成した。いずれの HVJ も紫外線 (99 mJoule/cm²) で不活性化し HVJ-E とした。ヒト MPM 細胞としては、上皮型の MPM 細胞株 (ACC-MESO-4)、二相型 (MSTO-H211, EHMES)、や肉腫型 (ACC-MESO-1, H2052) の細胞株を用いた。正常のヒト胸膜細胞株として Met-5A を用いた。マウス MPM 細胞として、AB22G2 を用いた。EHMES 細胞は愛媛大学より供与を受けた。その他は ATCC より購入した。HVJ 受容体の産生ガングリオシドの解析は、HPLC 法により行った。HVJ-E に対する感受性は、96well plate に 1 well あたり 5000 個の細胞を播き込み、HVJ-E を 1000, 2000 moi (multiplicity of infection) で培養液中に投与し、24 時間後の細胞生存を MTT 法で測定した。ポジティブコントロールとしては、すでに高感受性であることを報告しているヒト前立腺癌細胞 PC3, DU145 やヒトグリオブラストーマ細胞株 U251 を用いた。また癌細胞と HVJ-E の親和性を観察するため、PKH26 により標識した HVJ-E を培養液中に投与し、蛍光顕微鏡で観察した。

RIG-I, MAVS の siRNA (Sigma) については既に報告している配列 (Clinical Cancer Res. 2012) を lipofectamine RNAimax (Invitrogen) で導入した。Noxa, TRAIL, RIG-I, MAVS, MDA5, IFN- β の発現については q-PCR で行った。

マウス骨髄由来の初代培養マクロファージの調整、及び M1、M2 分極誘導は、以下のように行った。C57BL/6N (♀) 由来骨髄細胞を 10% L929 条件培地含有 RPMI 完全培地に 4.5×10^5 cells/mL で懸濁し、10 cm

培養皿に 10 mL (4.5×10^6 cells/dish) を播種・培養した。4 日後、培養培地 10% 量 (1 mL) の L929 条件培地を加え、更に 3 日間培養した。培養皿に接着している細胞を不活性型マクロファージとして回収した。不活性型マクロファージを RPMI 完全培地に 1×10^6 cells/mL で懸濁し、100 ng/mL LPS (Sigma-Aldrich Co., ST. Louis, USA) あるいは 10 ng/mL M-CSF (WAKO Junyaku Inc., Osaka, Japan) と 20 ng/mL IL-4 (WAKO) を加えて 6 穴プレートに 1 mL (1×10^6 個) 播種して、24 時間培養した。マウス骨髄由来 M2 マクロファージへの HVJ-E 刺激実験においては、6 穴プレートで培養したマウス骨髄由来 M2 マクロファージ (1×10^6 cells/well) の培地を除去し、700 μ L の HVJ-E 含有血清不含 RPMI 培地 (2,000 HAU/mL) 中で培養した。1 時間後、最終濃度が 10 ng/mL M-CSF と 20 ng/mL IL-4 なるように希釈した RPMI 完全培地を 300 μ L 加え、23 時間培養した。マクロファージ形質の変化は、IL-6、IL-12、TNF- α 、IFN- β 、IFN- γ 、NOS2、Arg1、Fizz1、Ym1、T-bet、Eomes、STAT1、Granzyme A、Granzyme B、18S の発現量をリアルタイム RT-PCR によって測定することにより検討した。また抗 NOS2、抗 NF- κ B p65 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA)、抗 Arg1、抗 β -actin (Sigma)、抗 Ym1 (Abcam, Cambridge, UK)、抗 RIG-I、抗 TBP (Cell Signaling., USA) 抗体を用いた Western blot によっても行った。さらにマクロファージ培養上清中の IL-6、TNF- α を ELISA 法で測定し、NO 濃度の測定を Griess Reagent System (Promega., Tokyo, Japan) を用いて行った。

NF- κ B の阻害剤投与は、骨髄由来 M2 マクロファージを 700 μ L の 30 μ M NF- κ B p65 阻害剤 (JSH-23) (SYMANSIS., California, USA) 含有血清不含 RPMI 培地で 30 分間、37°C で培養した。

マウス中皮腫モデル治療実験として、ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株 MSTO211H (2×10^6 個) を CB-17/SCID マウスの壁側胸膜内へ接種して作製したヒト悪性胸膜中皮腫担癌マウスに対し、接種後 9 日目に HVJ-E の腫瘍内投与ならびに抗癌剤シスプラチンの投与を行った。また、その 7 日後より HVJ-E の皮下投与を 2 週毎に行い、マウスの生存率を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験についてはすでに大阪大学医学系研究科での審査を受けており、その安全委員会の指針に従って施行された。また組換え DNA の実験については、組換え DNA 実験計画の機関承認が得られており、大学等における組換え DNA 実験指針に従って行った。本計画においては、臨床研究データの使用や患者資料の使用、ヒト遺伝子解析などは含まれなかった。

C 研究結果

1. MPM 細胞の HVJ-E 感受性

MPM 細胞の HVJ 受容体である酸性ガングリオシドの HPLC での解析パターンを図 1 に示す。HVJ 受容体である GD1a, SPG の総酸性ガングリオシドに占める割合は、METO-H211; 3.3%, EHME5; 15.5%, MESO-1; 10.7%, MESO-4; 6.7%, H2452; 40.9%, Met5A; 10.2% であった。他の腫瘍細胞と大きな違いはなかった。ちなみにマウ

ス MPM 細胞の AB22G2 は 0%であった。PKH26 標識した HVJ-E を MPM 細胞の中で最も受容体の発現の低い METO-H211 に作用させると図 2 に示すように、前立腺癌細胞の DU145 と同様な染色パターンが得られ、同じような HVJ-E との親和性が示された。そこで HVJ-E を各 MPM 細胞に作用させ、生存率を MTS assay により測定した。図 3 のように、どのヒト MPM 細胞もヒト前立腺癌細胞 PC3 と同じような細胞死が誘導され、生存率の低下がひきこされた。また正常の Met-5A は受容体があるにもかかわらず、細胞死誘導は起こらなかった。なお受容体のないマウス MPM 細胞の AB22G2 は全く影響を受けなかった。

2. EHMES 細胞の HVJ-E 感受性機構

治療が難しい MPM の 1 つである二相型の EHMES に HVJ-E を作用させた時の、遺伝子発現パターンを定量 PCR によって解析した。すでに報告しているように HVJ-E による腫瘍細胞選択的なアポトーシスの経路は、RIG-I, MAVS によるシグナル伝達である (Clinical Cancer Res. 2012)。RIG-I は Type I, II の IFN による誘導が知られている。図 4 に示すように RIG-I は U251, PC3, DU145, PNT2 (正常前立腺上皮細胞株) で誘導されるが、EHMES ではほとんど誘導されなかった。MAVS の発現誘導はどの細胞においてもほとんど認められなかった。また HVJ ゲノムを認識しない RNA 受容体の MDA5 は、どの細胞においても HVJ-E の刺激でやや上昇した。細胞死に関連する TRAIL, Noxa および IFN- β の発現をみると、EHMES では他の腫瘍細胞と同じく HVJ-E による Noxa の発現誘導がお

こったが、TRAIL の発現は 2 倍程度しか誘導されなかった。また IFN- β は他の細胞とは異なり、全く誘導が見られなかった。そこで RIG-I, MAVS の siRNA を用いて TRAIL, Noxa の遺伝子発現を調べると、RIG-I (3 種類の siRNA はすべて抑制可能), MAVS (siMAVS-1 のみ抑制に成功) を抑制した状態であるにもかかわらず、TRAIL, Noxa とも HVJ-E による発現誘導は抑制されなかった。そこでアポトーシスの阻害剤として Pan-caspase inhibitor である z-VAD-fmk を用いて、HVJ-E による細胞死への影響を見たところ、z-VAD-fmk では抑制が全く見られなかった。

3. HVJ-E のマクロファージに与える影響

骨髄由来 M2 マクロファージに HVJ-E を投与した時の遺伝子発現の変化を mRNA 及びタンパク質レベルで検討した。その結果、図 7 のように、M2 マクロファージの HVJ-E 刺激による IL-6, NOS2, TNF- α の発現上昇と Arg1, Fizz1, Ym1 の発現低下がリアルタイム RT-PCR によって確認された。また HVJ-E 刺激による NOS2 発現増加と Ym1 発現減少がウエスタンブロットによって確認され、IL-6, TNF- α , NO の分泌促進が ELISA 及び NO 測定によって確認された。さらに、データは示さないが、M2 マクロファージの HVJ-E 刺激によって、NOS2+ 細胞が約 10 倍に増加することが FACS によって明らかになった。これらの結果から、HVJ-E 刺激によってマウス骨髄由来 M2 マクロファージが M2 表現型から M1 表現型にシフトしたことが明らかとなり、HVJ-E が M2 から M1 への再分極誘導能を有することが示唆された。

HVJ-E 刺激による M2 マクロファージの M1 分極誘導において RIG-I が関与するか検討した(図 8)。HVJ-E 刺激 M2 マクロファージにおける RIG-I 発現の変化をウエスタンブロットにより検討した結果、HVJ-E 刺激によって RIG-I 発現を増加させることが確認された。また、RIG-I をノックダウンすることで M2 マクロファージの HVJ-E 刺激による NOS2 発現上昇と Ym1 発現低下が抑制された。

一般的に、マクロファージの活性化には NF- κ B が重要であり、M1 マクロファージへの分極には NF- κ B の p65/p50 複合体が核内へ移行するのに対して、M2 マクロファージへの分極には NF- κ B の p50/p50 複合体が核内へ移行することが知られている。そこで HVJ-E 刺激による M2 マクロファージの M1 分極化において、NF- κ B p65/p50 の活性化が関与しているのかを検討した。まず M2 マクロファージの HVJ-E 刺激により濃度依存的に NF- κ B p65 の核内移行が促進することが確認したので、次に、NF- κ B p65 阻害剤 (JSH-23) によって HVJ-E 刺激による M2 マクロファージの M1 分極が抑制されるかを検討したところ、M2 マーカー遺伝子 (Arg1、Fizz1、Ym1) 発現には変化が無かったが、NOS2、IL-6、TNF- α といった M1 マーカー遺伝子の発現が抑制されることが明らかとなった (図 9)。これらの結果から、HVJ-E 刺激による M2 マクロファージの M1 分極には NF- κ B p65 の活性化が関与することが考えられる。

次に HVJ-E 刺激後の M2 マクロファージが T 細胞を活性化するかどうかを調べるために、HVJ-E 刺激マクロファージと脾臓

T 細胞を共培養した。共培養 48 時間後に浮遊している T 細胞を回収し、リアルタイム RT-PCR で T 細胞活性化に関する遺伝子発現を調査した。その結果、HVJ-E 刺激 M2 マクロファージとの共培養群では活性化 Th1 マーカーである STAT1 と活性化 CD8⁺ T 細胞マーカーであるグランザイム A、B の発現上昇が確認された (図 10)。また、同様に処理した T 細胞における初期活性化リンパ球マーカーである CD69 の発現を FACS により解析した。その結果、HVJ-E 刺激 M2 マクロファージにおいて CD69⁺ T 細胞集団が約 2 倍増加していることも明らかとなった。これらの結果は HVJ-E 刺激 M2 マクロファージが脾臓 T 細胞を活性化し、Th1 反応を増強することを示唆している。

4. マウス中皮腫モデル治療実験

非臨床試験において悪性胸膜中皮腫 (MPM) は HVJ-E に対する高い感受性を有しており、MPM 担癌マウスへの治療実験において高い抗腫瘍効果が認められた (平均生存日数 39.5 日 vs コントロール群 27 日)。さらに、臨床で投与されている抗癌剤シスプラチン (5 mg/kg) 単回投与に HVJ-E 治療を上乗せした治療群では、シスプラチン単回投与群よりも有意な生存期間の延長を認め、HVJ-E とシスプラチンとの併用による相乗効果を認めた (平均 57 日以上 vs 42.6 日)。

D 考察

1. HVJ-E による MPM 細胞死誘導に関して

HVJ-E による腫瘍細胞死は、主として RIG-

I によってウイルス RNA 断片が認識され MAVS を活性化して、IRF(interferon regulatory factor)1,3,7 等の転写因子の核内移行を促進しアポトーシス関連遺伝子の TRAIL, Noxa 等の遺伝子発現を腫瘍細胞選択的に増強することによっている。その細胞死は、RIG-I, MAVS の siRNA で抑制される。MPM 細胞においても腫瘍細胞選択的な細胞死がおこり、Noxa の転写が増強された。しかし RIG-I, MAVS の siRNA では Noxa の転写活性化は抑制されなかった。pan-caspase inhibitor の z-VAD-fmk でも抑制されずアポトーシスの可能性は低くなった。今後さらに詳細な検証を他の中皮腫細胞も含めて行うことが必要である。顕微鏡下では、EHMES は HVJ-E により細胞の断片化が明瞭には観察できておらず、融合したような大きな細胞がそのまま浮き上がって死滅するような像が観察されている。我々は既に、Caspase 8 欠損の神経芽腫細胞において HVJ-E による細胞死がおこるが、それはアポトーシスではなくプログラム化されたネクローシス(ネクロトーシス)であることを報告している (Cancer Res. 2014)。そのときには virus RNA や RIG-I, MAVS の関与はなく、膜融合刺激が細胞質の calcium 濃度を高めて CaM-kinase を活性化して RIP-1 の活性化と RIP-1,-3 の複合体形成を起こす。同様なメカニズムが MPM 細胞でも機能している可能性がある。しかし Caspase-8 は発現しており、神経芽腫のような Caspase-8 欠損による Rip-1 の活性化ではなさそうである。プログラム化されたネクローシスの阻害剤である Necrostatin の影響、活性酸素の産生の確認などを計画している。

一方、もっと網羅的に細胞死に関与する遺伝子を探るために、CRISPR/Cas9 系を利用することにした。すでに CRISPR の guide RNA を搭載したレンチウイルスのライブラリーを入手している。これは 1 遺伝子に 6 つの guide RNA sequence を含むもので、Cas9 の発現細胞に、このレンチウイルスを感染させ、HVJ-E による細胞死からまぬがれる細胞を集めて、その guide RNA の配列を高速シーケンサーで解読すれば、標的遺伝子候補が得られるものである。すでに Cas9 を安定に発現する EHME5 細胞株を分離した。コントロールとして HVJ-E 高感受性のヒトグリオブラストーマ U251 細胞においても Cas9 発現株を分離した。

2. HVJ-E の抗腫瘍免疫活性化におけるマクロファージの関与について

HVJ-E の標的細胞として従来明らかになっていた腫瘍細胞と樹状細胞以外にマクロファージに注目したのは、メラノーマ患者の組織で HVJ-E 投与後にマクロファージの集積が顕著であることが 1 つである。その他に、ラットの皮下に HVJ-E を投与後の virus RNA の局在を検証した結果にもよっている。その場合、virus RNA は投与部位では 24 時間で消失するが所属リンパ節で 1 週間は安定に存在していた。これはコロイド粒子の皮下投与後と同じタイムコースであり、貪食細胞にトラップされて移動したことを示唆している。予想通り、HVJ-E によりマクロファージは M2 から M1 に分極し、これが T cell の腫瘍細胞の攻撃力を高める結果となった。今回は正常マウスから採取したマクロファージであるので、次は腫瘍関連マクロファージにも HVJ-E が作用して

M1 に分極できるかどうかを検証する必要がある。またクロドロネート含有リポソームを投与して腫瘍内のマクロファージを除去した時に、HVJ-E の抗腫瘍効果がどのように影響を受けるかを調べるのが重要である。従来報告では、腫瘍関連マクロファージを除去すると抗腫瘍効果が増強され、腫瘍が抑制される。しかし HVJ-E を用いた時の抗腫瘍効果は、マクロファージ除去により元弱されるのではないかと予想される。いずれにしても極めて重要な実験であると認識している。

一般的に、M1 マクロファージへの分極には NF- κ B p65/p50 がマスターレギュレーターとして機能していることが知られ、HVJ-E の M2 マクロファージ刺激による M1 分極誘導においても NF- κ B p65 の活性化が重要な役割を果たすことが確認された。しかし、NF- κ B p65 阻害剤投与によって、HVJ-E 刺激による M1 マーカー遺伝子 (IL-6, TNF- α , NOS2) の発現亢進は抑制されたが、M2 マーカー遺伝子 (Arg1, Fizz1, Ym1) の発現抑制を解除することはなかった。この結果は、HVJ-E 刺激による M2 マクロファージの M1 分極誘導には NF- κ B p65/p50 活性化だけでなく別のシグナルも寄与していることを示唆している。HVJ-E は RIG-I の活性化によって M2 マクロファージの M1 分極を誘導することが示されたが、RIG-I 活性化のシグナルは TRAF6 を介した NF- κ B 経路と TRAF3 を介した 1 型インターフェロン経路を活性化することが報告されている。実際に、HVJ-E 刺激後の M2 マクロファージ刺激では NF- κ B 経路非依存的な IFN- β 発現増加が確認された。1 型インターフェロン経路もまた

M1 分極に関与するという報告があることから、HVJ-E 刺激による M2 マクロファージの M1 分極誘導には NF- κ B p65/p50 活性化だけでなく 1 型インターフェロン刺激も寄与している可能性がある。

我々はすでに HVJ-E の F 蛋白質がマクロファージの膜蛋白質に作用して NF- κ B のシグナルを活性化して IL-18 の転写を増強するという結果を得ている。このことからマクロファージの膜表面に F 受容体があることが示唆されるが、今まで報告がない。F 蛋白質とマウスマクロファージ細胞株である P388D1(この細胞においても HVJ-E により IL-18 の転写が活性化される)の膜分画を作用させて、免疫沈降させた中から、複数の受容体候補が見つかっており、今後さらに解析を進める予定である。このレセプターを介したマクロファージの形質転換の可能性も十分あると考えられ、それを解明することは、抗腫瘍免疫の活性化機構に全く新しい知見を提供できるであろう。

4. マウス中皮腫治療実験

マウス中皮腫モデル治療実験において、HVJ-E の高い抗腫瘍効果を確認でき、抗癌剤との併用治療実験では相乗効果を認めた。これは従来の抗がん剤とは異なるメカニズムで治療効果が得られることを示している。今後ペメトレキセドとシスプラチンを用いた抗癌剤治療に HVJ-E を併用した治療実験を行う予定である。

E 結論

ヒト MPM 細胞は HVJ に親和性が高く、HVJ-E により細胞死が誘導される。しかしその経路は従来の RIG-I/MAVS 経路とは異なる可能性がある。一方、HVJ-E による抗

腫瘍免疫の活性化、特に CTL 活性の増強に
はマクロファージが大きく関与している可
能性があり、そのシグナル伝達経路として、
RIG-I を刺激する経路と、それとは別に NF-
κB の活性化を介する経路があることが示
唆された。マウス中皮腫モデル治療実験に
おいて、HVJ-E の高い抗腫瘍効果を確認で
き、抗癌剤との併用治療実験では相乗効果
を認めた。

なし

F 健康危険情報

異常なし

G 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第 11 回日本中性子捕捉療法学会 教育講
演 Kaneda, Y. “ウイルスに学ぶ癌治療
戦略” 2014/7/6 大阪

第 20 回日本遺伝子治療学会 理事長講演
Kaneda, Y. “Development of anti-cancer
strategies using Sendai virus envelope
(HVJ-E) and current status of clinical
applications to treat cancer patients

“2014/8/7 東京

第 8 回韓国遺伝子細胞治療学会 招待講演
Kaneda, Y. “Virus-mediated cancer
treatment ~from basic to clinic~” 2014/10/11
Osong (Korea)

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

図1: 各種細胞株におけるHVJ受容体の発現パターン

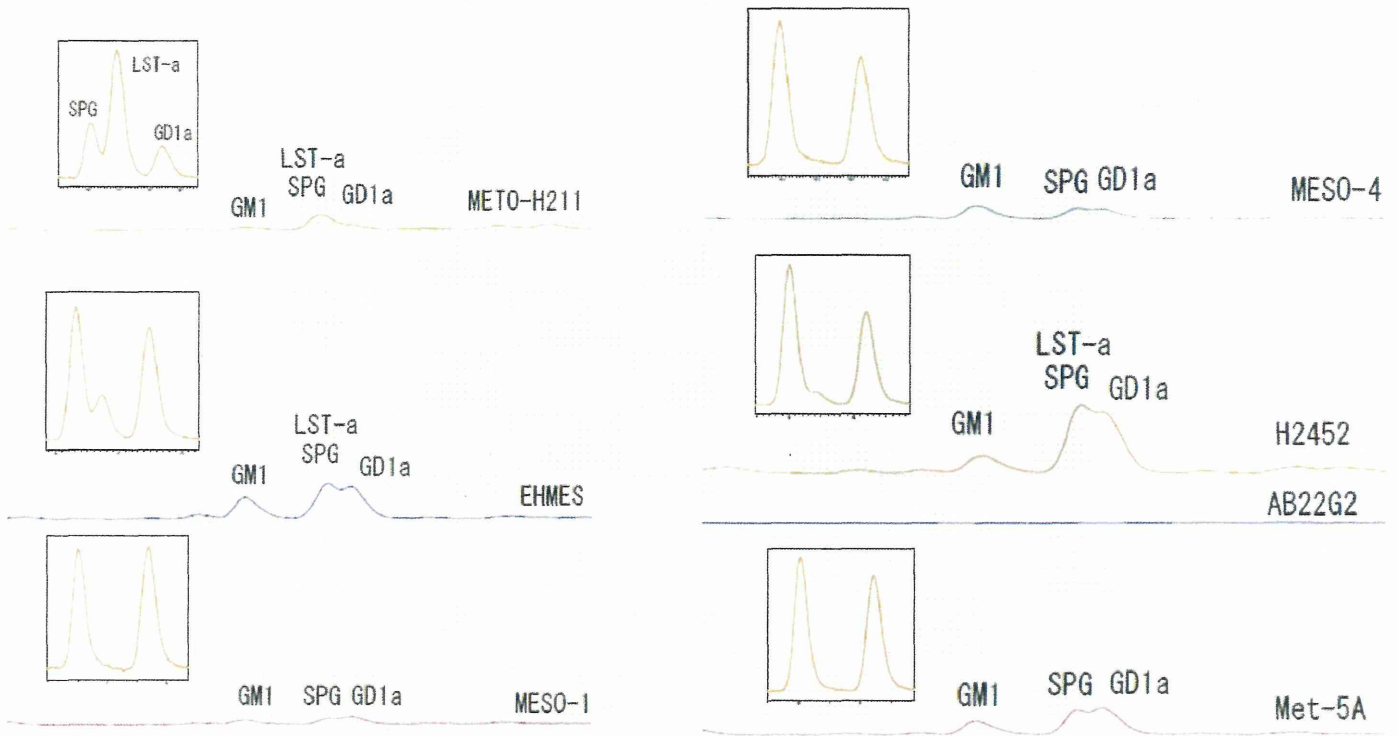


図2: HVJ-Eのヒト胸膜中皮との親和性

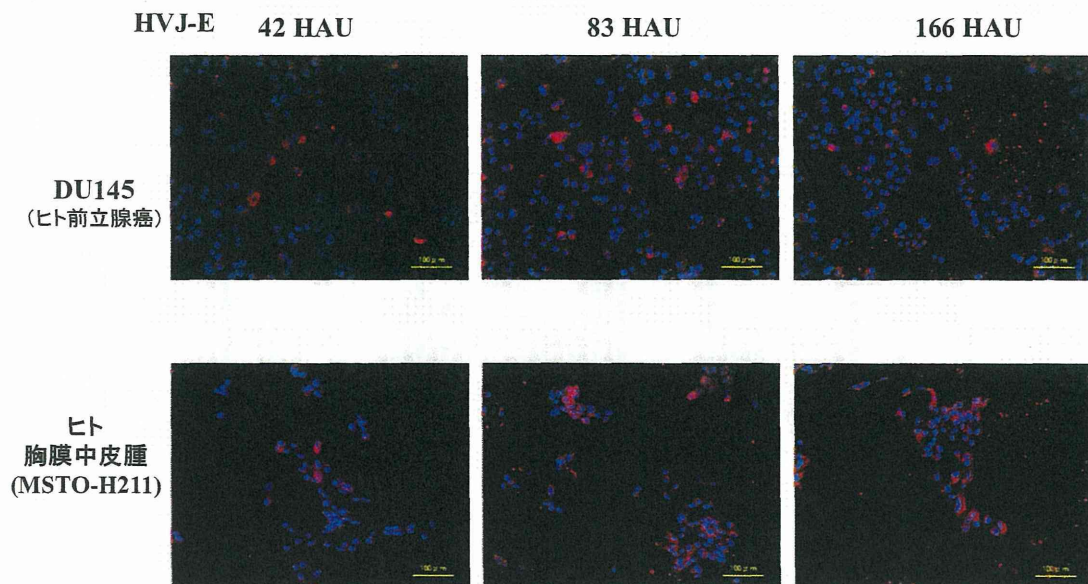
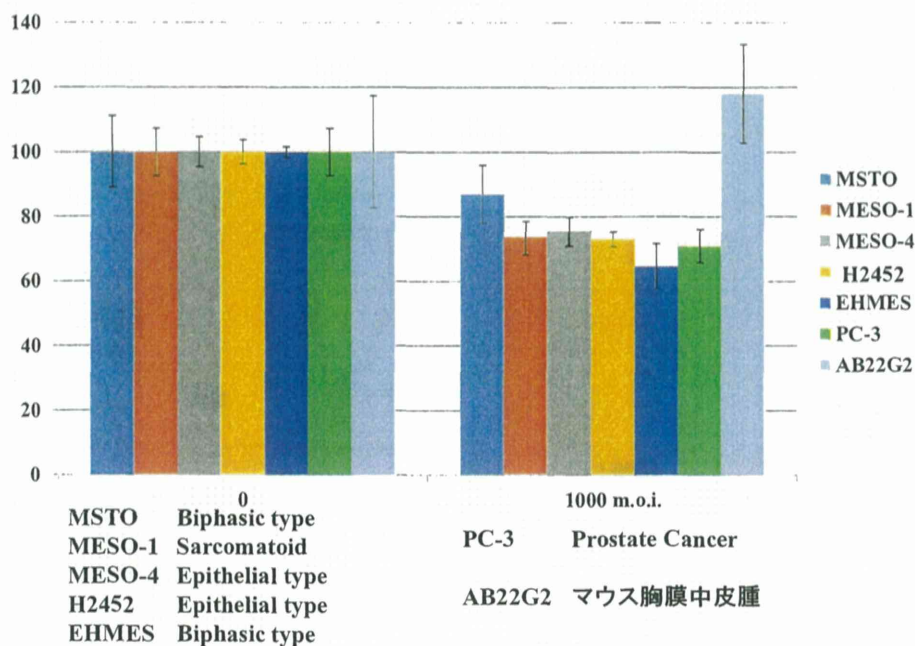


図3: HVJ-Eの細胞増殖抑制効果



HVJ-Eは、ヒト前立腺癌と同様に、ヒト胸膜中皮腫のどのタイプにも細胞増殖抑制効果を示すが、一方マウス胸膜中皮腫細胞への増殖抑制効果を示さなかった。

図4: HVJ-E 1000MOI 24時間後における、EHMESと他の細胞群との発現比較

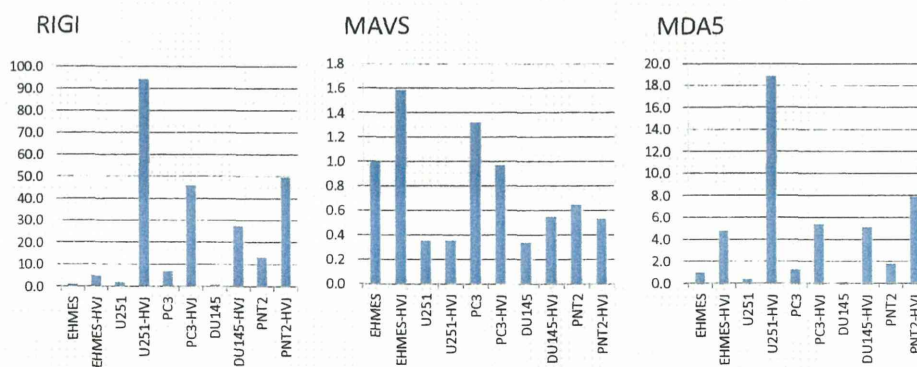


図5:HVJ-Eによるアポトーシス関連遺伝子とインターフェロンの発現比較

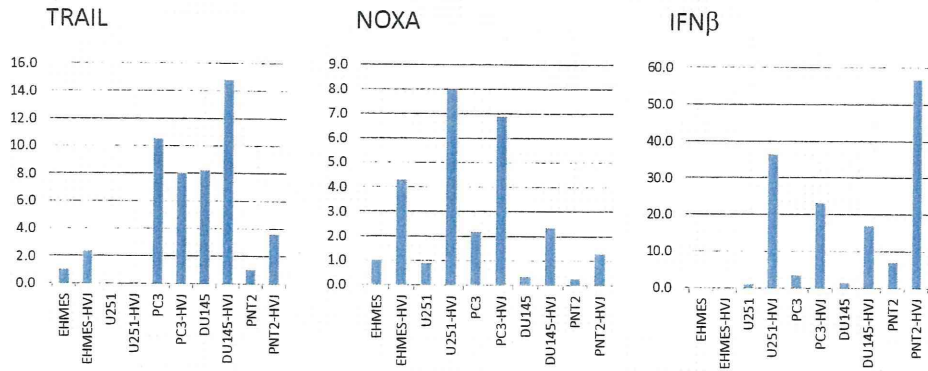


図6: EHMESをRIGI、MAVSノックダウン時のTRAIL、NOXAの発現解析
HVJ-E 1000MOI 24時間後

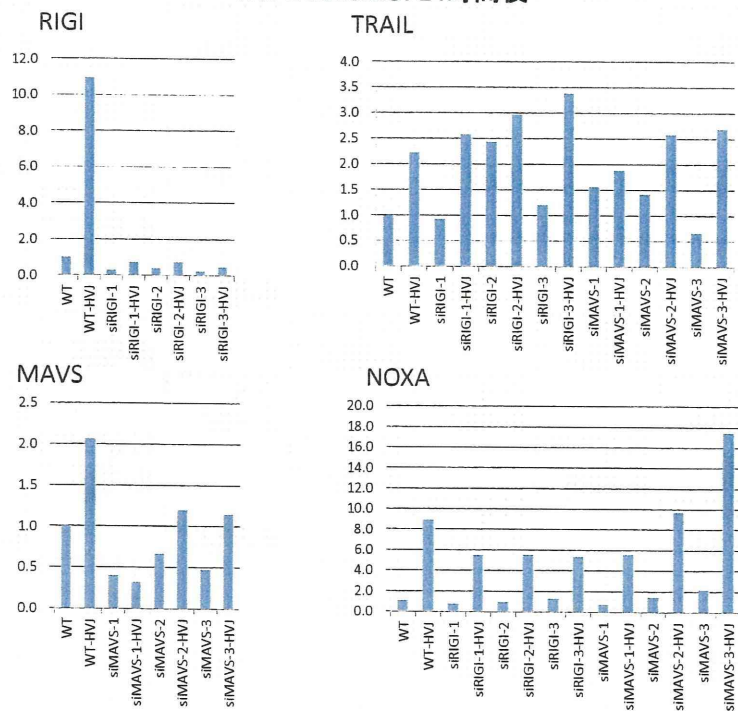


図7: HVJ-Eによるマウスマクロファージの形質変化

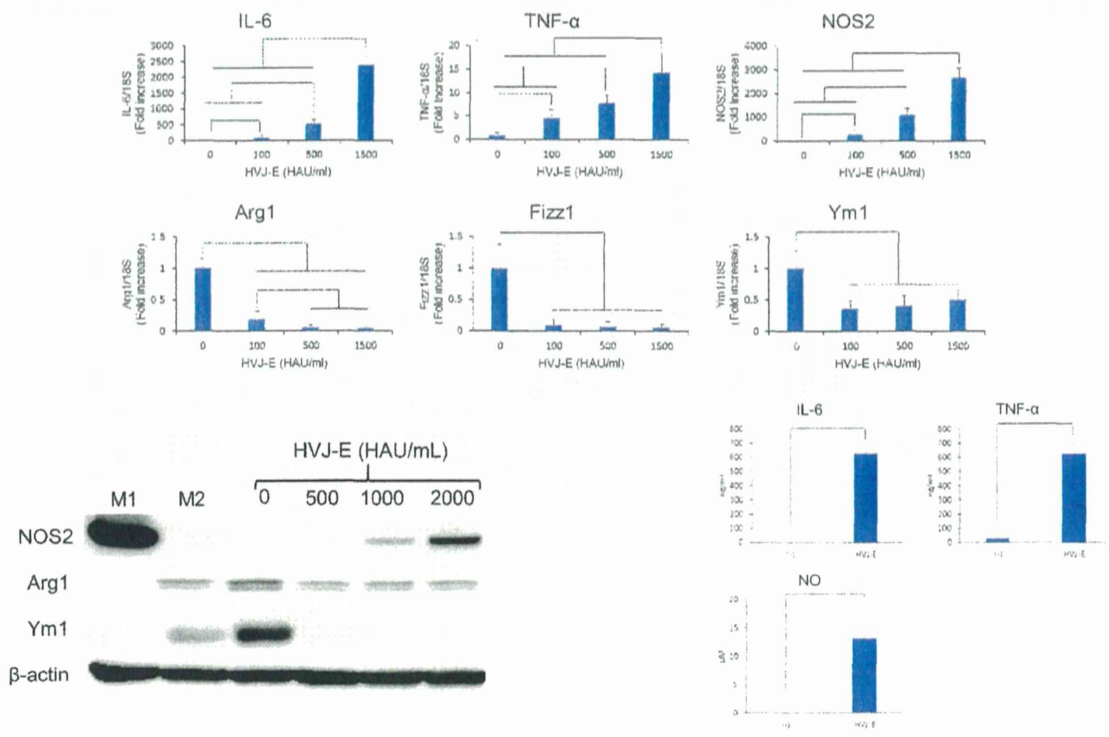


図8: HVJ-Eによるマクロファージの形質変化に及ぼすRIG-Iの関与

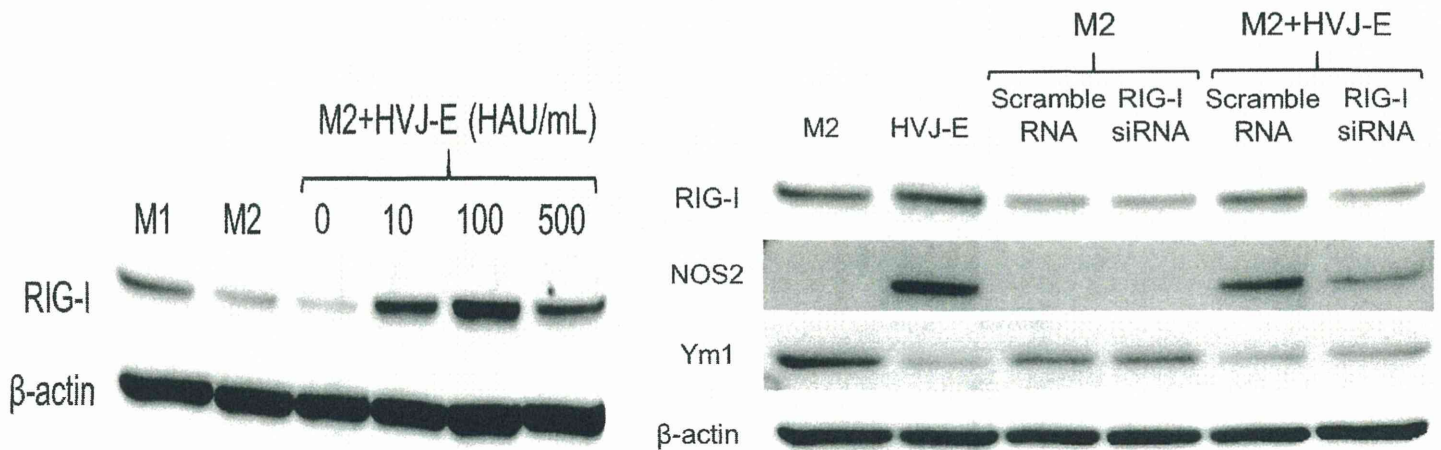


図9: HVJ-Eによるマクロファージの形質変化に及ぼすNF-kappa B (p65)の関与

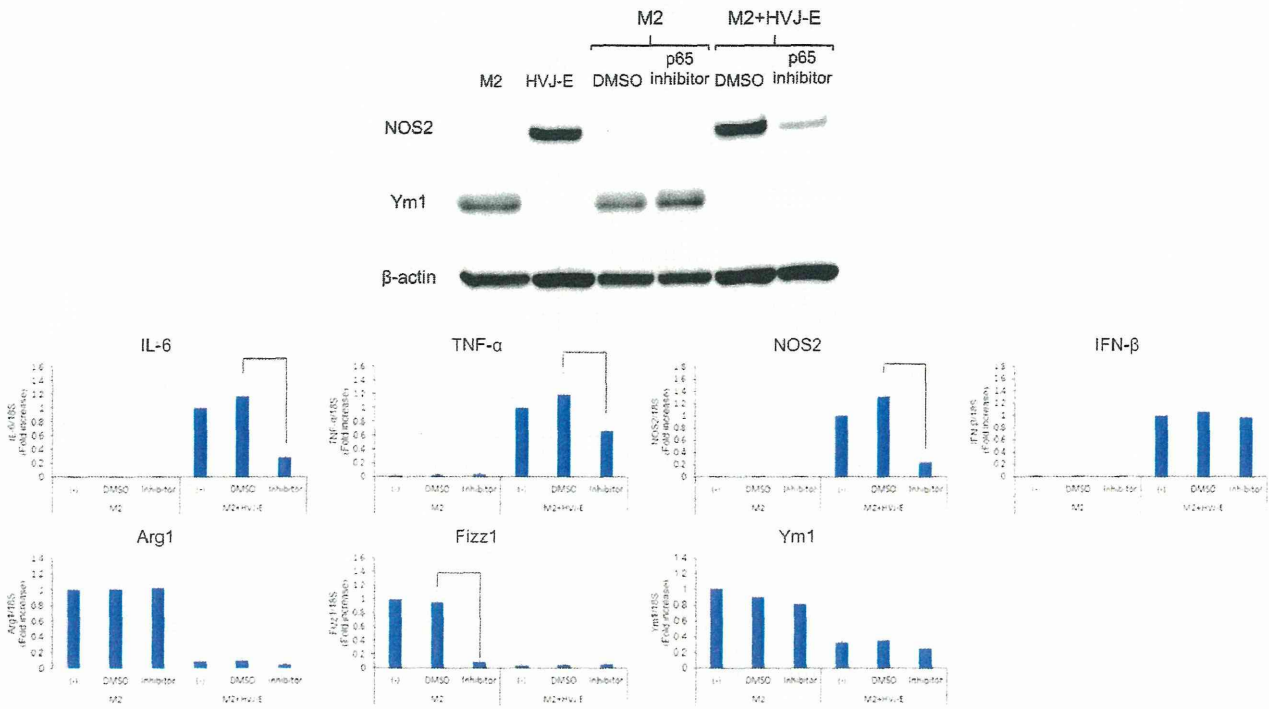
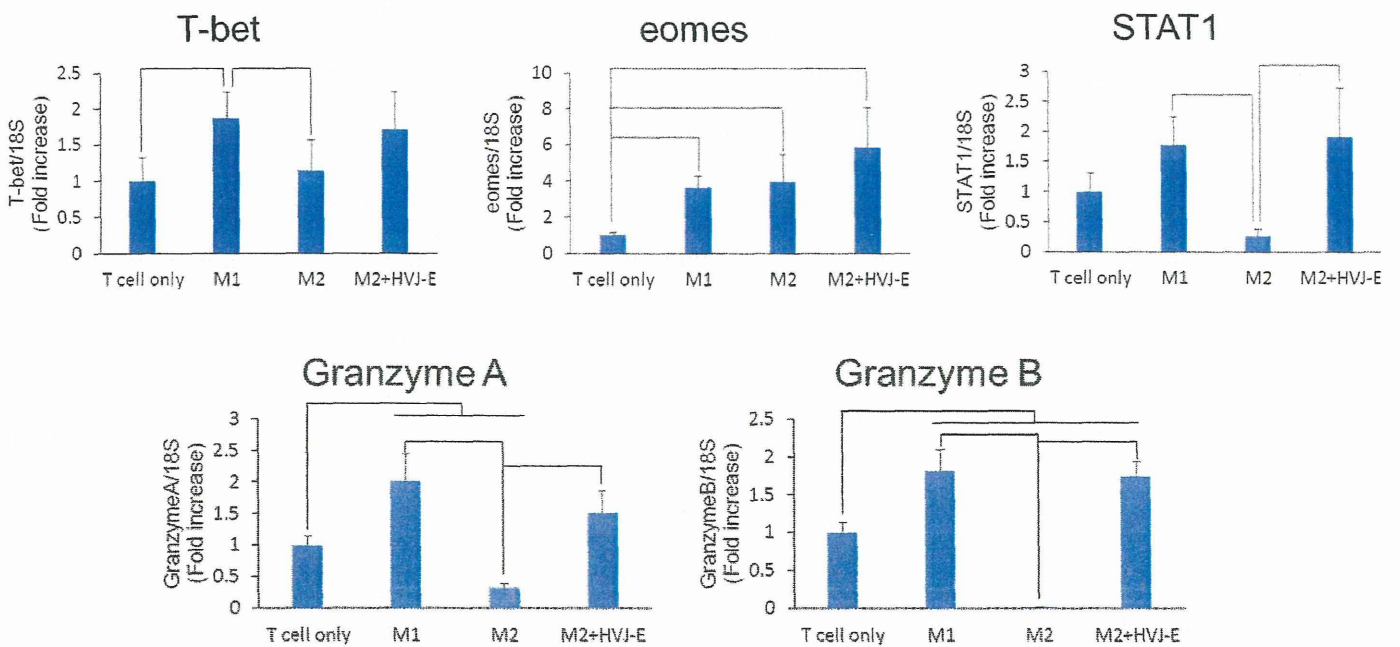


図10: HVJ-Eで刺激したM2マクロファージのT細胞機能に与える影響



厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書

毒性、薬効検証のための非臨床試験 b.安全性試験
治験薬 GMP 製造

担当責任者 金田安史（大阪大学大学院医学系研究科・教授）

李千萬（大阪大学医学部附属病院未来医療開発部 特任准教授）

研究要旨

本研究で開発しているHVJ-Eを早期に上市するために必要な安全性試験と治験薬製造準備をジェノメディア株式会社の協力を得て行った。策定中の治験実施計画書の内容から、今後必要となる安全性試験の項目と、治験薬の必要本数の予測値を求めて試験計画と製造計画を策定し、それに従って研究開発を実施した。安全性試験については、計画している胸膜腫瘍内投与における安全性を確保するための試験のバリデーション試験を実施した結果、目的とする試験で採用する測定方法の妥当性を確認出来た。一方、製造については治験薬製造に必要な原料（原薬）について、必要量の50%の製造を完了した。また、医薬品GMP製造も想定し、無菌注射剤製造のための技術確立と、スケールアップ技術の検討を行った。製造技術の開発の骨子について検討した結果、培養工程、精製工程、製剤化工程の3種類の工程毎に開発する事とした。平成26年度は、精製工程のスケールアップ検討を実施した結果、精製用カラムクロマトグラフィーの仕様検討からIQ：Installation Qualification（据付時適格性確認）、及びOQ：Operational Qualification（稼働性能適格性確認）までの作業を完了した。

A. 研究目的

本研究で計画している医師主導治験では、胸膜に発生する腫瘍内への投与を予定しているため、その安全性を確保する必要がある。当初の計画では安全性試験について以下のように記載したので、それを達成させることが今年度の目標である。

“安全性については、抗腫瘍効果の維持により再発や転移の拡大を抑制できるよう、長期的に反復投与を進める事を想定し、3ヶ月間から6ヶ月間の長期毒性を検証するための予備試験を行い、本試験の実施に必要な検証系（試験系のバリデーション等を含む）を確立する。”

また、医師主導治験を早期に完遂するには症例のエントリーを速やかに進める必

要があり、特に本研究で計画している治験のように、対象疾患が胸膜悪性中皮腫のように症例数の少ない稀少疾患である場合には症例のエントリーを適切に進めるようにする事が重要である。そこで、治験に必要な被験物質（治験薬）を治験開始までに十分量確保する事が必要で、さらに開発を進めている治療薬に関して早期に承認申請を実施するには、次相の治験薬GMP製造と、上市後の医薬品GMP製造を適切に実施できるよう、製造技術のスケールアップとレベルアップが必要である。治験薬GMP製造については、当初の計画では、以下のように記載しているため、それを達成し開発の迅速化を図ることを目指して製造技術の開発を実施した。

“医師主導治験の実施に必要な治験薬

を十分量確保するために必要な治験薬製造計画を策定し、治験薬GMPレベルの製造のための準備を整える。また、第2相治験へ速やかに移行できるよう、医薬品GMP製造も想定した製造技術の確立、スケールアップを想定した製造技術の開発の骨子を策定し、開発の方向性を策定する。”

B. 研究方法

臨床治験における胸膜腫瘍内投与の安全性を確保するための試験として、トキシコキネティクス試験（TK試験）を実施するために必要な測定法のバリデーション試験を実施した。ガイドラインを参考にして、検量線の妥当性、再現性、力価との相関性などの項目について予備検討試験を実施し、その結果から採用基準の範囲を設定した。各項目について、予備試験の結果から設定した内容に従ってバリデーション試験を実施し、設定した試験法が定量試験として妥当であるかを確認した。

医師主導治験の実施に必要な治験薬を十分な本数確保するために、治験薬の製造計画を策定した。まず、策定中の治験実施計画書の内容を精査し、治験を速やかに進めるために必要な治験薬の必要量について算定を行った。その結果に基づいて、治験開始までに必要な最低の本数、症例数が最大となった際に必要となる本数を求め、治験薬の保存安定期間（21ヶ月～24ヶ月）を考慮して製造計画の策定を行った。平成26年度は、この計画に基づいて、最低限必要な治験薬の本数を製造するために必要な原料（原薬）を治験薬GMP体制化で製造した。

第2相治験へ早期に進めために必要な治験薬GMP製造のスケールアップと、その後の医薬品GMP製造へのレベルアップについては、開発の進捗に応じて段階的に進める事が適切であると考えられた。そのため、スケールアップについては現行の5倍のスケールへの移行を、レベルアップについてはバイオ医薬で主流になることが見込まれるシングルユーステクノ

ロジーを利用した製造技術確立を目標にして計画の策定を行った。現行の製造工程の内容を精査し、適切なスケールアップを可能とする仕様の検討を行い、培養工程、攪拌工程、精製工程、製剤化（凍結乾燥）工程の仕様・スケールを決定し、計画の骨子を策定した。その内容に従って、平成26年度は攪拌工程と精製工程のスケールアップ検討を開始し、攪拌用のバックと精製用カラムについて、IQ：Installation Qualification（据付時適格性確認）、及びOQ：Operational Qualification（稼働性能適格性確認）までを実施した。

（倫理面への配慮）

治験薬GMP製造については、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（医薬品医療機器等法、旧薬事法）と関連する法令、ガイドラインに従って実施すると共に、規制当局である医薬品医療機器総合機構（PMDA）との薬事戦略相談・事前面談と対面助言を適宜実施して適切に実施した。

C. 研究結果

医師主導治験で計画している胸膜腫瘍内投与の安全性を確保するため、トキシコキネティクス試験（TK試験）として実施予定の試験法の妥当性についてバリデーション試験を行った。バリデーション試験における規定値の範囲を設定するために予備試験を実施し、検量線の妥当性、再現性、力価との相関性などの項目の、それぞれについて妥当性を確認するための範囲を規定した。その結果に基づいて、バリデーション試験を実施した結果、いずれの評価項目についても設定した規格値の範囲内となる事が明らかとなり、確立した試験法が、定量試験として妥当である事が確認された。

本研究で計画している胸膜悪性中皮腫を対象とする医師主導治験の実施に必要な治験薬の本数を算出した（表1）。策定中の実施計画書の内容から、症例あたりで必要な本数を算出し、症例数の最小（各用

量3例、計6例)と最大(各用量6例、計12例)から、最小と最大の本数の見込みを求めた結果、最小で222本、最大で444本。現行の治験薬製造では、1バッチあたりの最大製造本数は222本であるため、本治験の実施には最小と最大で、それぞれ治験薬を1バッチと2バッチ分製造する必要がある事が明らかとなった。現行で治験薬を製造するための原料(原薬)は、治験薬1バッチあたり4バッチ~5バッチ程度必要であるため、目的とする治験薬製造を達成するには、原薬製造を最小と最大で、それぞれ5バッチと10バッチ分の製造が必要である事が明らかとなった(表1)。治験の開始を早期に実現するためには、最低限必要な本数である222本の治験薬を早期に製造できるよう、原料である原薬の製造を進めておく必要があるため、平成26年度は製剤1バッチ分の製造に必要な原薬について5バッチ分の製造を行った。治験薬GMP体制下で製造を完了した原薬について、規格値に適合するかどうかを確認するために品質管理試験を実施した結果、設定した規格の範囲内である事が明らかとなり、目的とする治験薬の製造用原料までの製造を完了した。これまでに実施した長期安定性試験の結果から、治験薬の保存安定性が21ヶ月から24ヶ月であるため、今後治験準備の進捗状況を考慮して治験薬の製造と、追加5バッチ分の原薬製造を進める計画である。

次に第2相治験へ早期に進めために必要である、製造スケールの拡大と、医薬品GMP製造への移行に必要なレベルアップについて研究開発を実施した。現行では10Lスケールでの治験薬の製造を実施しているが、第2相では目標症例数が30例から50例程度になると予測されるため、計画している医師主導治験(目標症例数6例から12例)に対して4倍から5倍量の治験薬が必要になると予測された。そのため、現行の5倍スケール(50L)への拡大を目標としてスケールアップの検討を実施した。現行のスケールの製造工程との同等性の確保と、将来医薬品GMPへのレベルアップを想定して、スケールアップの方向性を検討した。医薬レベルのHVJ-

Eの製造工程は、培養工程、攪拌工程、精製工程、製剤化工程の4種類に分類される。培養工程と攪拌工程については、今後のバイオ医薬で主流になると考えられるシングルユーステクノロジーを採用し、スケールを5倍の範囲(10Lから50L)で適宜設定できる仕様で進める事とした。精製工程についてはカラム高を一定にしてカラム径の拡大で対応することとし、医薬品レベルへの移行を考慮して、カラムと樹脂の選択を行う事とした。製剤化工程については精製工程までの確立を達成した時点で件津を進める事とした。平成26年度は、攪拌工程と精製工程のスケールアップを実施した。攪拌工程については、樹脂性のバックに目的の溶液を充填して攪拌した際の温度分布と均一性を、精製工程については精製用樹脂を充填したカラムの理論段数を、それぞれ指標としてIQ: Installation Qualification(据付時適格性確認)、及びOQ: Operational Qualification(稼働性能適格性確認)を実施した結果、いずれの指標についても目標とする規定値の範囲内である事が明らかとなり、スケールアップの妥当性が検証された。

D. 考察

本研究では、胸膜内に発生した悪性腫瘍内に被験物質であるHVJ-Eを投与する計画であるため、投与の安全性を確保する必要がある。実施計画では、血液中の酸素分圧を測定して機能的な異常の発生をリアルタイムでモニタリング予定である。更に、血中の被験物質の濃度をモニタリングする事で、より確実に投与の安全性を確保する計画である。平成26年度の試験により、試験法の妥当性が実証されたことから、臨床における安全性の確保するため、今後の実施計画書策定の際に、全血を採取するタイムポイントの設定を進める計画である。また、3ヶ月から6ヶ月の反復投与安全性試験の実施も計画しており、評価項目としてトキシコキネティクス試験(TK試験)の組み込みを計画している。本年度のバリデーション試験の結果から試験法の妥当性が確認されたことから、より長期間、高用量の投与を実施

した場合の安全性についても検証を進めていく計画である。

現在までに策定している実施計画書の内容に従って、医師主導治験を早期に完結するために必要な治験薬製造の準備を実施した。治験実施計画書では、目標症例数の範囲に幅が設定されており、最低で6症例、最大で12症例の登録が計画されている。そのため、治験開始までには少なくとも最少の症例数で実施した場合に必要な治験薬が必要であると考えられた。実施計画書の内容に従って本数の算出を行った結果222本以上のバイアル数が必要である事が明らかとなったため、今年度はその製造に必要な原料(原薬)を治験薬GMP製造レベルで実施し、治験薬製造に最低限必要な原料を確保した。治験薬の長期保存安定性試験の結果から、製剤化を行った治験薬については有効期間を21ヶ月から24ヶ月で設定するため、今後治験の準備状況を確認して治験薬としての製剤化(凍結乾燥)と、追加バッチの製造時期を調節しながら治験薬の製造を実施する予定である。

本研究で開発しているHVJ-Eを、医療用医薬品として上市するには、第2相治験と承認申請を実施する必要がある。対象疾患である悪性胸膜中皮腫は、現在のところ標準治療がペメトレキセド(アリムタ)とシスプラチンの併用療法のみであり、新規治療法の早期確立が切望されている。そのため、開発の迅速化を目的として治験薬GMP製造のスケールアップと、承認申請までに必要となる製造技術のレベルアップ(医薬品GMPレベル)を実施した。スケールアップについては、培養工程と攪拌工程でシングルユーステクノロジーを採用し、必要な製造スケールに適宜調整できる製造技術の開発を実施した。精製工程については現行工程との連続性を

重視し、カラム高を一定にしたスケールアップを実施した。今年度はそれぞれの工程についてガイドラインに従ってIQ: Installation Qualification (据付時適格性確認)と、OQ: Operational Qualification (稼働性能適格性確認)までの段階までの検証作業を完了した。そのため、今後は実際に製造用原料を使用して実施するPQ(Process Qualification)の段階を経て、治験薬GMP製造へと製造技術の確立を進める予定である。

E. 結論

平成26年度は医師主導治験の実施に必要な安全性試験の実施に必要なバリデーション試験を実施し、設定した測定法が定量試験として妥当である事が実証された。この結果は、投与法の安全性確保に必要である上、長期間かつ高用量の投与を実施する場合の安全性を確認する試験の基盤となる成果である。

平成26年度は治験薬の製造も実施し、目標となる治験実施に最低限必要なバイアル数を確保できる原薬製造まで完了した。また、治験薬GMP製造のスケールアップと、医薬品GMP製造へのレベルアップのために新規製造技術の確立を実施し、目標とする計画策定とガイドラインに準拠したIQ/OQを完了した。このように、治験薬製造については目標としていた計画策定、製造準備を計画の通り達成した。

F. 研究発表

特になし。

G. 研究発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

今年度の新たな出願はない。

表 1. 医師主導治験の実施に必要な治験薬の必要本数の計算

用量	治験薬	予定症例数		治験薬の本数		治験薬（製剤） バッチ数		原料（原薬） バッチ数	
	（本/症 例）	最低	最高	最低	最高	最低	最高	最低	最高
低用量	25	3	6	75	150				
高用量	49	3	6	147	294				
合計		6	12	222	444	1	2	5	10

Ⅲ. 学会など発表実績

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「化学療法に対する抵抗性を克服することを目的とした希少がん(悪性胸膜中皮腫)治療薬開発のための医師主導治験の実施」

機関名 大阪大学大学院医学系研究科
大阪大学医学部附属病院

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果(発表題目、口頭・ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所(学会等名)	発表した時期	国内・外の別
ウィルスに学ぶ癌治療戦略(口頭、教育講演)	金田安史	第11回日本中性子捕捉療法学会	2014/7/6	国内
Development of anti-cancer strategies using Sendai virus envelope (HVJ-E) and current status of clinical applications to treat cancer patients(口頭、理事長講演)	Kneda, Y	第20回日本遺伝子治療学会	2014/8/7	国内
Virosome-mediated cancer treatment from basic to clinic (口頭、招待講演)	Kneda, Y	第8回韓国遺伝子細胞治療学会	2014/10/11	国外
Toward a clinical application of pseudovirion to cancer therapy. Novel therapy of hemagglutinating virus of Japan Envelope (HVJ-E) for intractable cancer. (ポスター発表)	Lee CM, Saito A, Tanemura A, Nonomura N, Kaneda Y.	サンフランシスコ (Molecular Medicine Tri-Conference (Cancer Immunotherapy 2015))	2015/2/19-20	国外

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文(発表題目)	発表者氏名	発表した場所(学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Clinical predictor of pre- or minimally invasive pulmonary adenocarcinoma: possibility of sub-classification of clinical T1a.	Sawabata N, Kanzaki R, Sakamoto T, Kusumoto H, Kimura T, Nojiri T, Kawamura T, Susaki Y, Funaki S, Nakagiri T, Shintani Y, Inoue M, Minami M, Okumura M.	Eur J Cardiothorac Surg	2014; 45(2):256-2	国外