

氏名（本籍）	柴田 智子（東京都）
学位の種類	博士(生命科学)
学位記番号	博 第109号
学位授与の日付	平成30年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Epithelial cell adhesion molecule を介して感染する 受容体標的化腫瘍溶解性HSV の開発
論文審査委員	(主査) 深見 希代子 教授 原田 浩徳 教授 田中 弘文 教授 松下 暢子 教授

論文内容の要旨

【背景】

腫瘍溶解性ウイルス療法とはがん細胞に選択的に感染し、殺傷効果を示すウイルスを用いたがんに対する治療法のことである。中でも変異の導入や遺伝子工学的な改変を施された単純ヘルペスウイルス（HSV）が利用されており、がんに対する新規治療法として注目されている。臨床試験に進んでいる多くの腫瘍溶解性 HSV（oncolytic HSV; oHSV）は正常細胞での複製に必要である infected cell polypeptide（ICP）34.5 や ICP6 を不活化あるいは欠失させている。しかしながら、臨床試験において、正常細胞での複製を制御した oHSV はヒトに対する安全性は確保されていたものの、治療効果に改善の余地が見られた。その原因として複製能を改変したことによる抗腫瘍効果の低下が考えられる。また HSV の細胞内侵入の受容体の1つである nectin-1 の発現が低いことががん細胞において HSV の感染に抵抗性を示すことが報告されている。したがって、複製に関する遺伝子を改変せずに、がん細胞特異的に細胞内侵入する oHSV の開発が可能となれば大きな意義を有すると考えられる。

本研究グループの内田らは細胞内侵入に必須の gD を遺伝子工学的に改変することにより gD 受容体である HVEM、nectin-1 を介しては侵入せず、epidermal growth factor receptor（EGFR）や carcinoembryonic antigen（CEA）といった、がん関連抗原を介してのみ感染する HSV の作製に成功した。gD の 2-24 番目のアミノ酸を欠失することにより HVEM との、38 番目のアミノ酸をチロシンからシステインに変異させることにより nectin-1 との結合能を不能とした。その上で 1 番目と 25 番目の間に EGFR や CEA に対する抗体に由来する単鎖抗体（scFv）を

挿入することによって標的分子特異的な細胞内侵入を実現している。さらに gB:D285N/A549T (gB:N/T) 変異を HSV に導入することにより、非特異的な感染を増加させることなく、標的細胞へ約 100 倍、細胞内侵入の効率を増強した。このように EGFR や CEA などを標的化する HSV を受容体標的化 HSV と呼ぶ。

【目的】

本研究では受容体標的化 oHSV のさらなる適用拡大を目指し、これまでのがん細胞に対する治療法の研究が進められてきた EpCAM を標的とした受容体標的化 oHSV を作製し、その標的特異性および抗腫瘍効果を評価する。

【結果】

1. EpCAM 標的化 oHSV の細胞内侵入は EpCAM 特異的であった

細胞内侵入の特異性を検討するために gD 受容体、EGFR、EpCAM のいずれも発現していない CHO-K1 細胞とその亜株である CHO-nectin-1、CHO-HVEM、CHO-EGFR、CHO-EpCAM 細胞に非標的化 HSV、EGFR 標的化 oHSV あるいは EpCAM 標的化 oHSV を感染させた。

非標的化 HSV は gD 受容体を発現していない CHO-K1、CHO-EGFR、CHO-EpCAM 細胞に細胞内侵入を示さなかったが、gD 受容体を発現した CHO-HVEM、CHO-nectin-1 細胞に細胞内侵入を示した。また、EGFR 標的化 oHSV は CHO-K1、CHO-HVEM、CHO-nectin-1 細胞に細胞内侵入を示さなかったが、EGFR を発現した CHO-EGFR 細胞には細胞内侵入を示した。それに対して、EpCAM 標的化 oHSV は CHO-K1、CHO-HVEM、CHO-nectin-1、CHO-EGFR 細胞に細胞内侵入を示さなかったが、EpCAM を発現した CHO-EpCAM には細胞内侵入を示した。

またマウスメラノーマ細胞株 B78H1 とその亜株を用いて同様の実験を行ったところ EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM を発現した B78-EpCAM にのみ細胞内侵入を示した。

以上の結果から EpCAM 標的化 oHSV は本来の gD 受容体である HVEM ならびに nectin-1 を介した細胞内侵入が不能となっており、EpCAM 標的化 gD により EpCAM 特異的に細胞内侵入がもたらされることが明らかとなった。

2. EpCAM 標的化 oHSV の細胞間伝播は EpCAM 特異的であった

細胞間伝播の特異性を評価するため、非標的化 HSV、EpCAM 標的化 oHSV をそれぞれ細胞に侵入させ、細胞外に娘ウイルスが放出される前に gD 受容体あるいは EpCAM のみを発現している細胞に重層した後のプラーク形成能を検討した。

非標的化 HSV は gD 受容体を発現しない B78H1、B78-EpCAM 細胞にプラーク形成を示さず、重層したドナー細胞に由来すると思われる EGFP のシグナルのみが観察された。一方、gD 受容体を発現する B78-HVEM、B78-nectin-1 にはプラーク形成を示した。

EpCAM 標的化 oHSV は B78H1、B78-HVEM、B78-nectin-1 細胞にプラーク形成を示さず、

重層したドナー細胞に由来すると思われる EGFP のシグナルのみが観察された。それに対し、EpCAM を発現する B78-EpCAM にはプラーク形成を示した。

以上の結果から EpCAM 標的化 oHSV の細胞間伝播は EpCAM 特異的であることが示唆された。

3. EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陽性がん細胞のみに細胞内侵入を示し、その頻度は非標的化 HSV と同程度であった

7 種類のヒトがん細胞株に非標的化 HSV、EGFR 標的化 oHSV あるいは EpCAM 標的化 oHSV を感染させた。

非標的化 HSV は 7 種類全ての細胞に感染を示した。それに対し、EGFR 標的化 oHSV は EGFR の発現がほぼ陰性のがん細胞にわずかに細胞内侵入を示したが、EGFR 陽性がん細胞では非標的化 HSV と同程度の細胞内侵入を示した。それに対し、EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陰性がん細胞に細胞内侵入を示さず、EpCAM 陽性がん細胞では非標的化 HSV と同程度の細胞内侵入を示した。以上の結果から EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陽性がん細胞に細胞内侵入を示すことが明らかとなった。

4. EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陽性がん細胞をウイルス量依存的に殺傷した

非標的化 HSV、EGFR 標的化 oHSV あるいは EpCAM 標的化 oHSV を感染させ、これらのウイルスのがん細胞殺傷効果ならびにそのウイルス量依存性について検討した。

その結果、非標的化 HSV は 7 種類のがん細胞全てにおいてウイルス量依存的に殺傷効果を示した。それに対し、EGFR 標的化 oHSV と EpCAM 標的化 oHSV は標的抗原を発現していないがん細胞に対しては殺傷効果を示さなかったが、標的抗原を発現しているがん細胞に対してはウイルス量依存的に殺傷効果を示した。

以上の結果から EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陽性がん細胞をウイルス量依存的に殺傷することが示された。

5. EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陽性がん細胞を移植したヌードマウスにおいて抗腫瘍効果を示した

EpCAM 標的化 oHSV は *in vitro* において EpCAM 特異的な細胞内侵入ならびに細胞間伝播を示し、EpCAM 陽性がん細胞を殺傷することが示された。そこで *in vivo* において、EpCAM 標的化 oHSV は抗腫瘍効果を示すかどうかを検討した。

マウスの皮下に SW620 (EpCAM 陽性大腸がん細胞株) をヌードマウスの右大腿部に移植し、160～200 mm³ に達した段階で PBS あるいは EpCAM 標的化 oHSV を腫瘍内投与した。

その結果、PBS 投与群は腫瘍体積が増大し、投与後 30 日を経過した時点では 1,400 mm³ 前後にまで増大した。一方、EpCAM 標的化 oHSV を投与した群では投与後 5 日目までは腫瘍体積が増大したが、5 日目から 8 日目までの間、腫瘍体積が減少した。8 日目以降は腫瘍体積が増大したが PBS と比較すると増大速度は緩やかであった。30 日を経過した時点では 800 mm³

前後と PBS 群の約 60 % 程度の腫瘍体積に留まった。2 群間の差を Analysis of variance 解析を用いて検定したところ有意 ($P<0.05$) であった。したがって EpCAM 標的化 oHSV は腫瘍の増大を抑制したことが示された。

以上の結果から EpCAM 標的化 oHSV は SW620 を移植したヌードマウスにおいて抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

【考察】

すでに臨床開発に進んでいる腫瘍溶解性 HSV はウイルス複製に必要な遺伝子を不活化あるいは欠損させることにより弱毒化している。この改変により正常細胞では増殖せず、がん細胞でのみ増殖することが可能である。しかしながら、がん細胞特異的なウイルスの増殖が得られる一方、腫瘍溶解性が低下しうることが指摘されている。それに対し、受容体標的化 oHSV は複製の段階ではなく細胞内侵入の段階を標的としているため、がん細胞における複製能を維持しつつ、正常細胞は殺傷しないという 2 つの目的を達成する、これまでのものとは異なる特性を有する標的化技術となりうる。

細胞内侵入の段階でのウイルスの制御の報告例は、interleukin-13 receptor $\alpha 2$ を標的とした Roizman らのグループ、human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) を標的とした Campadelli-Fiume らのグループ、そして EGFR と CEA を標的とした本研究グループのみと限定的である。その点、本研究グループの受容体標的化 gD プラットフォームはがん関連抗原の EGFR や CEA のみならず EpCAM を標的できたことからその汎用性が高いと考えられる。

EpCAM は上皮系由来の腫瘍に幅広く発現しており、腫瘍の形成と転移に関与することから治療の標的として研究が進められてきた。免疫組織学的な研究では、多くのグループが、様々な種類のがん細胞においてそれぞれの組織由来の正常細胞と比較して EpCAM が高発現していると報告している。さらに EpCAM はヒト正常細胞では基底膜側に発現しているが、前がん性あるいは悪性の細胞では細胞膜表面全体に発現の分布が変わることから、EpCAM を標的とした治療法は正常細胞よりもがん細胞に到達しやすいと考えられる。これらの可能性を検証するためにはさらなる研究が必要である。さらに非標的細胞での複製を阻害する micro RNA を用いた方法と組み合わせることにより非がん細胞への殺傷効果の危険性を減らすアプローチも考えられる。このように、EpCAM 標的化 oHSV をバイオ医薬品として開発してゆくためにさらなる解析および検討が必要である。

【結論】

本研究の結果より、EpCAM 標的化 oHSV は細胞内侵入のみならず、細胞間伝播においても EpCAM の発現に依存することが明らかとなり、がん細胞に対する殺傷効果および抗腫瘍効果を有することが示された。また EpCAM 標的化 oHSV は gD 受容体の発現が低いがん細胞において非標的化 HSV よりも大きなプラークを形成した。このことから、さらなる解析が必要ではあるが、gD 受容体の発現が低いがん細胞において EpCAM 標的化 oHSV は非標的化 HSV

よりも高い抗腫瘍効果を示しうることが示唆された。私たちの受容体標的化 α HSV システムは、様々な種類のがんに対する新たなバイオ医薬品の開発に有用である可能性が示唆された。

【研究結果の掲載誌】

Development of an oncolytic HSV vector fully retargeted specifically to cellular EpCAM for virus entry and cell-to cell spread.

Tomoko Shibata, Hiroaki Uchida, Tomoki Shiroyama, Yu Okubo, Takuma Suzuki, Hitomi Ikeda, Miki Yamaguchi, Yoshitaka Miyagawa, Takeshi Fukuhara, Justus B. Cohen, Joseph C. Glorioso, Tetsuro Watabe, Hirofumi Hamada, Hideaki Tahara. *Gene Therapy*, 2016; 23(6): 479-88.

審査結果の要旨

腫瘍溶解性ウイルス療法とはがん細胞に選択的に感染し、殺傷効果を示すウイルスを用いたがんに対する新規治療法として注目されるが、未だ効率の良い治療法は確立していない。本研究では、がん細胞の EpCAM を標的とした受容体標的化腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス (oHSV) を作製し、その標的特異性および抗腫瘍効果を評価することを目的とした。

本研究では、EpCAM 標的化 oHSV は細胞内侵入のみならず、細胞間伝播においても EpCAM の発現に依存することが明らかとなり、EpCAM 陽性がん細胞をウイルス量依存的に殺傷することが示された。また EpCAM 標的化 oHSV は gD 受容体の発現が低いがん細胞において非標的化 HSV よりも大きなプラークを形成したことから、gD 受容体の発現が低いがん細胞において EpCAM 標的化 oHSV は非標的化 HSV よりも高い抗腫瘍効果を示しうることが示唆された。更に EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陽性がん細胞を移植したヌードマウスにおいても抗腫瘍効果を示した。こうした受容体標的化 oHSV システムは、様々な種類のがんに対する新たなバイオ医薬品の開発に有用である可能性が示唆され、生命科学の研究として高い価値を有すると考えられる。本研究成果は、すでに **Gene Therapy** に論文発表している (2016)。

本審査での発表と質疑応答も適切であり、研究者としての基本的な資質を有すると判断できる。以上のことから、本申請論文は博士学位授与に値すると考えられる。