

日本医療研究開発機構 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 次世代がん治療用ワクシニアウイルスの研究開発
(英語) Study of next-generation oncolytic vaccinia virus for cancer virotherapy

研究開発実施期間: 令和元年10月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 中村 貴史
(英語) Takafumi Nakamura

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人鳥取大学・医学部医学科・教授
(英語) Tottori University・School of Medicine, Faculty of Medicine・Professor

II 研究開発の概要

がんウイルス療法は、従来の化学療法や放射線療法と比較して、様々なメカニズムによって腫瘍を攻撃できる利点がある。第一に感染したがん細胞・組織内におけるウイルスによる腫瘍溶解、第二にそれに伴う抗腫瘍免疫の賦活化など多様な作用機序によって抗がん効果を発揮する革新的がん治療法である。実際、がんウイルス療法による局所療法が全身に治療効果を発揮するという、既存のがん治療法にはない新しい概念が実証されたことより、米国で2015年に悪性黒色腫、本邦で2021年に悪性神経膠腫に対する腫瘍溶解性ヘルペスウイルスが承認された。先進国でウイルス療法薬が誕生した現在、今後がん治療の選択肢にウイルス療法が加わることが予想される。

しかしながら、がんは不均質で複雑な微小環境を形成するため、患者ごとにウイルスによる腫瘍溶解や抗腫瘍免疫の賦活化、即ち抗がん効果に差が生じる。又、ウイルス製剤の投与経路は主に腫瘍内であるため、体表にあるがんや超音波・CTガイド下で投与可能ながんに限定される。これより現状のウイルス療法は、限られたがん種かつ患者のみに有効である。そこで本研究では、これらの問題点を克服する次世代がんウイルス療法の確立を目指している。

これまで痘瘡ワクチンに使われたワクシニアウイルスを基に、MAPK/ERK経路の制御異常を指標にして、正常細胞を傷つけずがん細胞のみを溶解するがん治療用ワクシニアウイルス(MDRVV)の独自開発に成功した。そこで本研究開発では、がんウイルス療法の作用機序である腫瘍溶解と抗腫瘍免疫の最適化のためにウイルス側から、①ウイルス腫瘍溶解能の増強技術、②ウイルスによる腫瘍微小環境における免疫制御技術を確立する。さらに、より効果のあるがん患者を選別するためにがん細胞側から、③バイオマーカーによる抗がん効果予測技術を確立する。広範ながん種を対象とするため、④血管内投与可能なステルスウイルスの製剤化技

術を確立することに取り組んだ。

FUVAC (FUsogenic VACcinia virus) は、従来の腫瘍溶解性ワクシニアウイルス MDRVV を細胞中で複製させている際、細胞融合しながら増殖するウイルスとして発見され単離したウイルスで、VGF と O1 遺伝子の欠失によって MAPK/ERK 経路の活性化異常を指標に腫瘍を標的破壊するとともに、K2L 遺伝子のナンセンス変異によって細胞融合能を獲得している。マウス大腸癌 CT26 細胞を両側の皮下に移植した担がんマウスモデルにおいて、各ウイルスを片側の腫瘍内のみ投与した。その結果 FUVAC は、投与側の腫瘍だけではなく非投与側の腫瘍に対しても、MDRVV と比べ有意な治療効果を発揮した。

組織学的・免疫学的解析により FUVAC は、1) 投与側腫瘍内で細胞融合によりウイルス増殖と腫瘍溶解を増強し、2) 免疫応答誘導性細胞死 ICD を高めるとともに、3) 腫瘍内の制御性 T 細胞 Treg、腫瘍関連マクロファージ TAM や骨髄由来免疫抑制細胞 M-MDSC を減少させた。次いで 4) ウイルスを投与した腫瘍だけではなく投与しない腫瘍への細胞傷害性 T 細胞の浸潤が高まることで、より効果的に抗腫瘍免疫応答が賦活化されることを見出した。

FUVAC と抗 PD-1 抗体の併用治療では、MDRVV または FUVAC の単独、および MDRVV と抗 PD-1 抗体の併用では十分な治療効果が得られなかったのに対し、FUVAC と抗 PD-1 抗体の併用では投与側腫瘍を完全に退縮させたのみでなく、半数のマウスで非投与側腫瘍も完治させた。抗 PD-1 抗体単独では治療効果が得られなかったことから、FUVAC により腫瘍内免疫環境が改善し、免疫チェックポイント阻害薬抵抗性の腫瘍を応答性に変えることで、抗がん効果をより効果的に最大化した。

さらに FUVAC と抗 PD-1 抗体の併用によって腫瘍が完治したマウスの腫瘍への免疫記憶の有無を確認するため、完治マウスへの腫瘍細胞の再移植を行った。治療後 101 日目に CT26 細胞を腹部両側皮下へ再度移植した。その結果、比較用の同週齢ナীবマウスは腫瘍成長を示したが、腫瘍完治後に再移植したマウスでは腫瘍の成長は全く見られなかった。以上より FUVAC の抗がん作用を様々な腫瘍において確認するとともに、FUVAC と免疫チェックポイント阻害剤の併用によって副作用なく完全に腫瘍が消失するレベルの強力な抗がん効果を発揮することを実証した。

ワクシニアワクシニアウイルスは、190kbp の線状二重鎖 DNA をゲノムにもつ大型ウイルスであるためベクターとしての能力が高く、複数かつ長いサイズの外来治療遺伝子を同時に搭載発現できる。この特性を活かして FUVAC に 6 種類の外来遺伝子を同時に搭載発現できるシステムを構築し、様々な免疫制御遺伝子を搭載発現させ、マウス大腸癌 CT26 細胞の両側皮下担がんモデルマウスにて抗がん効果を検証した。その結果、FUVAC 投与と比べ、MDRVV-IL12/CCL21、又は FUVAC-IL12/CCL21 では、投与 19 日後のウイルス投与側、および非投与側の腫瘍径が有意に小さいことが確認できた。さらに MDRVV-IL12/CCL21 投与において 5/17 匹 (29%) のマウスで両方の腫瘍が完全寛解 (CR) したのに対し、FUVAC-IL12/CCL21 において 13/18 匹 (72%) のマウスで両方の腫瘍が完全寛解 (CR) した。

即ち FUVAC による細胞融合と IL12 と CCL21 の組合せの相乗効果によって、単回の腫瘍内投与による治療にもかかわらず、ウイルスを投与した局所の腫瘍 (=原発巣) のみならず投与しない遠隔の腫瘍 (=転移巣) に対しても高い治療効果を発揮し生存期間を延長させた。また FUVAC-IL12/CCL21 の作用機序をシングルセル解析によって解明するとともに、臨床応用を視野に入れスケールアップ可能なウイルスの製造法を構築し、FUVAC 製剤の安全性試験およびウイルス動態試験の一部を実施した。その結果、投与したウイルスが腫瘍内に局限すること、また安全に腫瘍免疫応答を増強することを実証した。

腫瘍内におけるがん治療用ワクシニアウイルスの増殖能を予測するバイオマーカーを探索した。卵巣がん以外の様々な腫瘍において、UCA1 の発現亢進と Cdc42 の活性化がバイオマーカーになり得るかどうかを検証した結果、大腸がんにおいても、UCA1 が Cdc42 の活性化を介して、Filopodia と呼ばれる細胞突起を増加させ、がん治療用ワクシニアウイルスの細胞間伝播を亢進していることを明らかにした。又、UCA1 は、2つのマイクロ RNA (miRNA) を負に制御するスポンジ機能によって、ウイルスの細胞間伝播を亢進していることが

示された。以上より、卵巣がんと大腸がんにおいて、UCA1 の発現亢進、Cdc42 の活性化や miRNA は、がん治療用ワクシニアウイルスの抗がん効果を予測するバイオマーカーとして有用であることが確認され、それらを組み合わせることによって、より精度の高い予測システムになる可能性が示された。

宿主因子とがん治療用ワクシニアウイルスの腫瘍溶解において正の相関関係が確認できたがん種に関して、がん患者からの初代培養細胞を用いて、UCA1 や miRNA の発現、Cdc42 の活性化、FUVAC の腫瘍特異的増殖と MAPK 経路の活性化を評価した。その結果、UCA1 の発現亢進、Cdc42 の活性化や miRNA の発現低下は、がん治療用ワクシニアウイルスの腫瘍溶解効果を予測するバイオマーカーとして有用であることが確認された。さらに臨床検体の腫瘍組織片培養において同定したバイオマーカーの有益性を検証している。一方、がん治療用ワクシニアウイルスの大量産生のための簡便で効率の良い製剤化技術を確立するとともに、担がんモデルマウスにおいて血管内投与の可能性を示した。

以上より、これまでの基盤技術に加え、新たな技術を確立することによって、極めて高い新規性・進歩性・優位性をもつパテントポートフォリオを構築し、intelligent Oncolytic Vaccinia system (iOVs) をほぼ完成させた。iOVs は、腫瘍溶解能を増強したがん治療用ワクシニアウイルスをベースに、難治性がんの病態に応じて腫瘍微小環境の免疫制御、バイオマーカーや血管内投与を可能にする製剤化技術を組み合わせることで、広範ながん種および患者に有効な次世代ウイルス療法となることが期待される。今後は、iOVs により難治性がんの病態に応じてカスタマイズしたがん治療用ワクシニアウイルスを創出し、その効果を担がんマウスを用いて実証する。

また本事業にて創出した次世代ウイルス FUVAC-IL12/CCL21 は、両側皮下担がんマウスにおいて腫瘍内投与による治療もかわらず、ウイルスを投与した局所の腫瘍（＝原発巣）のみならず投与しない遠隔の腫瘍（＝転移巣）に対しても予想し得ない程度に極めて高い治療効果を発揮した。今後は、難治性がんの臨床像を反映した担がんマウスを用いて、FUVAC-IL12/CCL21 単剤および抗 PD-1 抗体併用の薬効薬理試験や生体内分布試験を実施する。さらに臨床試験を視野に入れ、ウイルスの製造工程を確立するとともに安定性試験を実施する。製薬企業との連携の機会を探りながら、FUVAC-IL12/CCL21 の非臨床 POC 取得から製造、そして第 I 相臨床試験を目指すトランスレーショナルリサーチを推進する。

Oncolytic virus (OV) is promising therapeutic agents for cancer and are currently under clinical investigation. The virotherapy is novel strategy that viruses infect and replicate within tumor cells, and directly lyse and kill them. Following this, OV can function as a ‘kick-start’ for anti-tumor immunity. Because of these different modes of action, cross-resistance, which occurs after standard chemotherapy or radiotherapy, is much less likely to develop with virotherapy.

We focus on highly attenuated vaccinia virus (VV) which was previously used for small pox vaccine without serious side effects in human. However, the vaccinia virus still has property of partial replication in normal cells. Two viral proteins VGF and O1 contribute to viral replication and spread by activation of EGFR-dependent MAPK/ERK pathway. VGF- and O1-deleted vaccinia virus (MDRVV) inhibited pathogenic viral replication in normal cells, while retaining its therapeutic replication in tumor cells that have the constitutive ERK1/2 activation in the MAPK pathway.

However, the clinical benefits of oncolytic virotherapy are limited due to tumor heterogeneity and the complexity of tumor microenvironment. To address questions, we have developed next-generation oncolytic vaccinia virus for cancer virotherapy.

Fusogenic vaccinia virus (FUVAC) was discovered during plaque purification of the MDRVV. FUVAC has a nonsense mutation in the viral gene K2L, whereas other viral genomes are maintained in the MDRVV. Using a bilaterally tumor-bearing syngeneic mouse model, unilateral administration of FUVAC

more efficiently enhanced CD8⁺ T cell infiltration and inhibited tumor growth in not only treated tumors but also untreated tumors than MDRVV. Interestingly, FUVAC reduced tumor-associated immune suppressive cells such as regulatory T cells, myeloid-derived suppressor cells and tumor-associated macrophages in the injected tumor. Taken together, fusogenic vaccinia virus exerts more potent antitumor immune responses by modulating the tumor microenvironment than non-fusogenic vaccinia virus.

Furthermore, we have engineered FUVAC armed with two immunostimulatory cytokines, interleukin 12 (IL12) and C-C motif chemokine ligand 21 (CCL21). The armed FUVAC-IL12/CCL21 was compared with non-armed FUVAC or armed MDRVV-IL12/CCL21, to identify whether the key therapeutic factor was cell-cell fusion and/or cytokine activity. In bilateral tumor mice, unilateral injection of MDRVV-IL12/CCL21 induced 29% of complete response (CR) in both tumors, whereas non-armed FUVAC couldn't eliminate the non-injected tumors. Notably, FUVAC-IL12/CCL21 more prolonged the survival of mice than MDRVV-IL12/CCL21 and reached 72% of CR. These results demonstrated that the therapeutic efficacy of FUVAC-IL12/CCL21 was synergistically enhanced by both cell-cell fusion and cytokine activity. The antitumor effects were analyzed by single cell RNA-seq for whole tumor immune microenvironment. FUVAC-IL12/CCL21 changed the tumor immune microenvironment systemically, by increasing tumor-infiltrating lymphocytes and decreasing tumor cells in the distant untreated tumors.

Efficient viral replication and spread plays a crucial role in the therapeutic outcome by oncolytic virotherapy. However, little is known about the influence of host factors on the viral replication and spread. Long non-coding RNA urothelial carcinoma-associated 1 (UCA1) and miRNAs has been identified and evaluated using primary cancer cell cultures and live tissues from cancer patients as potential biomarker of therapeutic response to oncolytic vaccinia virus. On the other hand, oncolytic virus injection is basically limited to the intratumoral route since anti-virus immunity potently inhibits viral delivery to remote organs. Therefore, we have established manufacturing process of oncolytic vaccinia virus which has the potential of systemic delivery of virus via circulation while evading host immune mechanisms.

Taken together, the patent portfolio for next-generation oncolytic vaccinia virus provides intelligent Oncolytic Vaccinia system (iOVs). The iOVs would enable next-generation oncolytic vaccinia virus which leads to complete eradication of malignant tumors by combining these technologies to overcome tumor heterogeneity and the complexity of tumor microenvironment.