

主 論 文

Liposome-encapsulated plasmid DNA of telomerase-specific oncolytic adenovirus with stealth effect on the immune system

(免疫系においてステルス効果を有するテロメラーゼ特異的腫瘍崩壊性アデノウイルスのリポソーム封入プラスミド DNA)

【諸言】

腫瘍融解ウイルス療法は、新興の癌治療戦略である。多くの腫瘍融解ウイルスが、様々なタイプのウイルス（アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、バクシニアウイルス、レオウイルス、ポックスウイルス、ピコルナウイルスなど）から開発され、臨床試験で使用されたものもある。我々は先んじて、テロメラーゼ特異的腫瘍融解アデノウイルス（Telomelysin）を開発した。それは腫瘍内で選択的に複製し、正常細胞内では複製しない、腫瘍融解細胞死を誘導する。細胞死の後に、複製されたウイルスは、周囲腫瘍細胞へ拡散し、連鎖的に腫瘍融解細胞死を起こす。ヒトに対する Telomelysin の安静性は、昨今米国で施行された phase I 臨床試験で証明された。その安静性と Telomelysin と放射線の併用療法の有用な前臨床データに基づき、phase I/II 臨床試験が現在日本でも進行中であり、併用療法の安全性と効果を評価している。腫瘍融解アデノウイルスは、有効な抗腫瘍効果を証明してきたが、同時に重大な弱点を持っていることも事実である。全身投与後の肝臓、脾臓などの細網内皮系（RES）による非特異的な排除であったり、免疫系による中和反応であったりで、基本的に局所投与の適応に限定されている。

近年、癌治療へのナノテクノロジーの応用は急速に進み、特にドラッグデリバリーシステムでの開発は目覚ましい。粒子サイズは効果的な薬剤送達には重要であり、大きな粒子は RES により捕捉される。小さな粒子は容易に腎排泄を受ける。ナノ粒子は 1 -100nm 径の粒子と定義され、EPR (enhanced permeability and retention) 効果によりより選択的に腫瘍組織に集積する。EPR 効果は、腫瘍組織内の腫瘍血管構造からの漏出とリンパ系の欠如に由来する。ナノ粒子に用いられる多種の資源の中で、リポソームはドラッグキャリアに最も汎用されるナノ粒子である。それはタンパク、ペプチド、ヌクレチドなどのような治療薬剤を脂質 2 重構造の中に封入し、これにより血中での安定性を増強し治療効果を向上させる。リポソームドキシソルビシン（ドキシル）が 1995 年に AIDS 関連カポジ肉腫に FDA の承認を初めて受けて以来、リポソーム製剤として臨床応用が承認された製剤もある。

全身投与可能な腫瘍融解アデノウイルス開発の観点から、リポソームによる腫瘍融解アデノウイルスの封入化の概念は容易に理解されるが、問題点もある。1つはリポソーム封入化アデノウイルスが大きくなりすぎて（100nm 以上）EPR 効果を享受できない可能性がある。これはアデノウイルス自体が 80 - 100nm のサイズをもつという事実から推察される。他の問題としては、アデノウイルスの感染性の性質である。アデノウイルスは元来、多段階プロセスを経て細胞内に取り込まれる。最初の段階はウイルスファイバーを含むアデノウイルスカプシドが細胞表面コク

サッキー・アデノウイルス受容体 (CAR) に結合することで開始する。アデノウイルスのリポソーム封入化は、ウイルス感染のこの最初の段階を不要にする可能性がある。

強力な腫瘍特異的抗腫瘍効果をもつ腫瘍融解アデノウイルスと、血中での安定性と EPR 効果による腫瘍特異性をもたらすナノサイズリポソームの利点をともに有効活用するため、リポソーム封入化に、アデノウイルス自体の代わりにテロメラーゼ特異的腫瘍融解アデノウイルスのプラスミド DNA を用いることにした。これにより EPR 効果が効率的に作用する範囲にナノ粒子サイズを減少しようとした。当研究では、*in vitro* と *in vivo* での全身送達可能な腫瘍融解アデノウイルスとして、このリポソーム封入アデノウイルスプラスミド DNA の可能性を、抗腫瘍効果、ウイルス感染の CAR 非依存性、免疫系の効果 (特にアデノウイルスへの中和抗体を介する) を評価した。

【材料と方法】

細胞株

HCT116 (ヒト結腸癌細胞株) と HCT116-RFP (赤色蛍光蛋白 (RFP) 発現 HCT116 細胞株) を使用した。

試薬

リポソーム封入化には、Lipofectamine LTX and Plus 試薬を使用した。

リポソーム封入化テロメラーゼ特異的腫瘍融解アデノウイルスプラスミド DNA の特性と準備

我々は Telomelysin の開発後に、緑色蛍光タンパク (GFP) 発現テロメラーゼ特異的腫瘍融解ウイルス (TelomeScan) を作成し、ウイルス複製のモニターのために使用してきた。TelomeScan プラスミド DNA は、*E. coli* DH5 α competent cell で増幅され、Hispeed Plasmid Midi Kit で精製した。DNA 濃度は、NanoDrop 分光光度計の 260nm 波長を用いて測定した。TelomeScan プラスミド DNA 脂質複合体 (Lipo-pTS) は、使用説明書に従ったプラスミド DNA とリポフェクタミン量を用いて準備した。脂質複合体と TurboGFP プラスミド DNA (Lipo-pGFP) はコントロール対照として用いた。DNA 量と濃度は、リポソームを含有せず、各々 μg と $\mu\text{g/ml}$ 表記した。

細胞生存率の分析

HCT116 細胞株 (1.0×10^3 cell/well, 96well プレート) ($n=5$) を Lipo-pTS, Lipo-pGFP, リポソーム単独で様々な濃度で処理し、3 日後に XTT 分析し細胞生存率の分析を行った。リポソーム処理群を 100%とした。共焦点レーザー顕微鏡をもちいて 3 日間 60 分ごとに、Lipo-pTS, Lipo-pGFP, PBS 処理したタイムラプス画像を撮影した。

ウェスタンブロット分析

全細胞溶液から抽出したタンパクを電気泳動し、膜に転写した。転写膜を、アデノウイルスタイプ 5 E1A と β アクチンに対する 1 次抗体を結合させ、ペルオキシダーゼ結合 2 次抗体処理した。

In vivo 皮下腫瘍モデル

HCT116 細胞 (2.0×10^6 cell/マウス) を 5, 6 週齢メス BALB/c ノードマウスの脇腹に皮下注射した。腫瘍径が約 5-10mm となったところで、マウスを 4 群 (PBS, リポソーム, Lipo-pGFP, Lipo-pTS) ($n=7$) に分け、腫瘍内投与を 3 回 (day0, 4, 7), Lipo-pTS (10 μ g), Lipo-pGFP (10 μ g), リポソーム, PBS の何れかを投与した。腫瘍の直行する径を day24 まで週 2 回計測し、腫瘍容積(mm^3) = $a(\text{長径}) \times b(\text{短径})^2 \times 0.5$ で求めた。別の実験では、最終 (第 3) 治療 2 日後に腫瘍を摘出、免疫組織化学染色で GFP 発現を評価し、腫瘍内でウイルス産生が進行していることが示された。

CAR ブロック分析

HCT116 細胞 (1.0×10^3 cell/well, 96well プレート) を Lipo-pTS (0.4 μ g/ml) か TelomeScan (10, 20 MOI) を用いて、抗 CAR 抗体 (8 μ g/well) の前処置の有無で、分析した。処理後 3 日目に任意の 3 視野で、蛍光顕微鏡 (40 \times) を用いて GFP を観察し、数えた。

中和抗体分析

HCT116 細胞 (1.0×10^3 cell/well, 96well プレート) を Lipo-pTS (0.4 μ g/m) か TelemeScan (80, 150MOI) を用いて、アデノウイルスタイプ 5 特異的抗体 (0.5 unit/well) の前処置の有無で、分析した。細胞生存率分析は、処理後 5 日目に XTT 分析した。

in vivo 免疫原性評価

in vivo でのアデノウイルス特異的免疫原性を評価するため、5 週齢メス BALB/c マウスに、PBS とリポソームを 2 回 (day 1 と 15) 投与に加え、Lipo-pTS (10 μ g) か TelomeScan (1.0×10^9 PFU) ($n=5$) を経静脈的に投与された。全血を day 29 に採取した。H1299 細胞 (ヒト非小細胞肺癌細胞株) (1.0×10^4 cell/well, 96well プレート) を、TelomeScan (1 MOI) で 3 日間 1024 倍に希釈した血清とで処理した上で、GFP を観察し蛍光強度を計測した。

統計解析

全データは、平均 \pm SD で表記した。群間の差は、Student's t テストで検定された。P 値 <0.05 で有意差ありと判定した。

【結果】

Lipo-pTS の準備と特性

TelomeScan プラスミド DNA の増幅後、オリジナル TelomeScan プラスミド DNA と同等であることを示す必要があり、電気泳動によるゲノムサイズを確認した。Lipo-pTS は、透過型電子顕微鏡で、40-50nm 粒子であることが観察された (Fig. 1a)。この粒子サイズは、EPR 効果をもたらすのに十分なサイズと思われた。Lipo-pTS が、治療後の腫瘍細胞内で腫瘍融解アデノウイルスを首尾よく産生することを示すため、Lipo-pTS 治療が freeze-thaw 処理を施された後 7 日目に HCT116 細胞を回収した (Fig. 1b)。別の HCT116 細胞は 3 サイクルの freeze-thaw 処理後に回収された上清で処理すると、24 時間後に蛍光顕微鏡で GFP 発光が観察され、継時的に増加した (Fig. 1c)。この事実は、Lipo-pTS 治療は、粒子径の観点からナノテクノロジーによる有利性と、周囲腫瘍細胞に続く感染が起こり次々と腫瘍特異的に腫瘍融解細胞死を引き起こすバイアブルなアデノウイルスを産生する能力があることを示すものである。

in vitro と in vivo の Lipo-pTS の細胞障害性

Lipo-pTS の感染性の最初の評価のため、HCT116 細胞 (5.0×10^5 cell/well、12 well プレート) を様々なリポフェクタミン濃度 (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 $\mu\text{g/ml}$) で処理し、24、48、72 時間で蛍光顕微鏡を用いて GFP 発現を観察した。GFP 発現は、処理後 24、48、72 時間において容量依存性に 2.0 $\mu\text{g/ml}$ まで増加したが、4.0 $\mu\text{g/ml}$ 濃度ではどの時点でも GFP 発現の明らかな増加は認めなかった (Fig. 2a)。2.0 または 4.0 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の Lipo-pTS で処理した HCT116 細胞はまた、処理後 48 から 72 時間で死滅することを認めた。他の細胞株での Lipo-pTS の感染性も GFP 発現の観察による確認された (Supplimentary Fig. 1)。次に Lipo-pTS の細胞障害性について、HCT116 細胞 (1.0×10^3 cell/well、96 well プレート) を用いて XTT 分析による in vitro 試験を行った。Lipo-pTS 濃度をこの試験での細胞数に応じて 0 - 0.8 $\mu\text{g/ml}$ に調整した、一方で 0 - 4.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の Lipo-pTS を用いて先の試験では 12 well プレート上で施行された。この設定の中で、Lipo-pGFP に比べて Lipo-pTS は処理後 72 時間で有意に細胞生存率を用量依存性に抑制した、50%阻害濃度 (IC50) は約 0.4 $\mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 2b)。この抑制効果は、HCT116-RFP を用いた time-lapse 画像でも観察され、Lipo-pTS が劇的に細胞増殖を抑制する様子が観察された。一方で Lipo-pGFP は GFP を発現したが、細胞増殖の抑制はごく軽度であった (Fig. 2 と Supplimentary Video)。ウェスタンブロット分析では、アデノウイルスタイプ 5 のタンパクは、Lipo-pTS 処理後 24 時間で観察され、72 時間まで増加した。このことは Lipo-pTS 処理後のウイルス産生の事実を支持するもので、腫瘍融解細胞死へ導く (Fig. 2d)。

in vivo モデルでは、HCT116 腫瘍細胞を皮下移植されたマウスを PBS, リポソーム, Lipo-pGFP, Lipo-pTS で 1 週間に 3 回腫瘍内投与治療し、Lipo-pTS が他の治療対照群に比べ有意に腫瘍増大を抑制した (Fig. 3a)。他の実験では、3 回目の治療後 2 日目に皮下腫瘍を回収し、GFP の免疫組織化学染色で Lipo-pTS 治療後の腫瘍組織内にウイルス産生を確認した (Fig. 3b)。これらの結果から、Lipo-pTS には in vitro と in vivo モデルにおいて、ウイルス産生により合理的な抗腫瘍効果をもたらすことが示された。

Lipo-pTS の CAR 非依存性

TelomeScan (ヒトアデノウイルスタイプ 5 由来である) を含む腫瘍融解アデノウイルス製剤の感染性は、原則的に細胞の CAR 発現に依存するため、CAR 発現の低い癌細胞に対する TelomeScan の細胞障害効果は十分ではない。実際に、TelomeScan (10 または 20 MOI) の HCT116 細胞への感染性は、培養液中の中で抗 CAR 抗体存在中では約 60% 劇的に抑制された (Fig. 4a,b)。一方で、Lipo-pTS の感染性には、抗 CAR 抗体存在下にて何ら変化を認めなかった。これらの結果から、TelomeScan とは異なり CAR 非依存性から、Lipo-pTS は細胞表面に CAR をほとんど発現しない癌細胞でも感染し細胞障害性をもたらすことを示している。

免疫系での Lipo-pTS のステルス効果

ヒトアデノウイルスタイプ 5 由来の腫瘍融解アデノウイルスの他の重大な限界は、全身投与が不可能ということである。理由の一つとして、アデノウイルスタイプ 5 に対する中和抗体 (AdNAbs) を介した免疫除去である。アデノウイルスタイプ 5 が風邪の原因ウイルスの 1 つであり、多くの成人はこのウイルスに対する免疫を有している。in vitro 分析で、TelomeScan の感染性と細胞障害性は、AdNAbs の存在下で強く抑制された (Fig. 5)。

しかし、Lipo-pTS は、AdNAbs 非存在下と同等に AdNAbs 存在下でも強力な細胞障害性を示した。一方で TelomeScan (150MOI) の細胞障害性は AdNAbs によりほぼ無効化された。Lipo-pTS と TelomeScan (150MOI) の細胞障害性は、AbNAbs 存在下ではほぼ同等であった。免疫保有マウスへ全身投与後の AdNAbs の産生をみる実験では (Fig. 6a)、H1299 への TelomeScan 感染性は、Lipo-pTS (10 μ g) を 2 回全身投与したマウスから回収した血清では阻害されなかったが、TelomeScan (1.0 \times 10⁹ PFU/time) を 2 回投与したマウスから回収した血清で共培養すると TelomeScan 感染性は劇的に減弱した。このことは TelomeScan の全身投与により免疫保有マウスの体内に AdNAbs が産生され、その反対に Lipo-pTS は抗体産生しなかったことを示す (Fig. 6b,c)。以上の事から、Lipo-pTS は、in vivo 環境での免疫系にステルス効果を有し、Lipo-pTS の全身投与が実現可能性を有することを意味するものである。

【考察】

腫瘍融解ウイルス療法は、癌治療において免疫チェックポイント阻害薬を用いて免疫療法に次ぐ次世代突破口となる可能性を秘めている。腫瘍融解ウイルスは、1990 年代より世界中で開発が進められてきた。それはウイルスが元来もつ強力な細胞障害性や理想的な腫瘍特異性という特性に基づくものであり、適切に遺伝子修飾されることで初の腫瘍融解ウイルス製剤である talimogene laherparepvec (T-VEC) が、2015 年アメリカ FDA により承認された。それはメラノーマ治療に対してであり、phase III 試験での有用性に基づく。その中で、T-VEC は腫瘍内投与され、50%以上の腫瘍減量効果を発揮し、注射部位で 64%、非注射内臓部位で 34%、内臓部位で 15%の減量効果であった。この興味深いことには、腫瘍融解ウイルスの局所投与はメラノーマに対し局注部位への直接的な効果に加えて、全身的な免疫治療効果を誘導したことだった。このウイルス局所投与による全身への効果はとても魅力的であるが、局所投与は時として難しい局面、

特に内臓腫瘍に対しては困難となることがある。それ故に全身投与による送達される腫瘍融解ウイルスの開発は、依然として腫瘍融解ウイルス療法の適応拡大に必要である。この全身送達への難題を攻略するため、肝臓のような細網内皮系からの非特異的排除や中和抗体による免疫系の特異的ウイルス排除を回避する能力が必要であり、血中での安定性の増強に繋がる。この解決手段の一つとしてドラッグキャリアにナノ材料を用いることである。

リポソーム、ミセル、ポリマー、金属ナノ粒子といった多種のナノ材料が開発され、ドラッグデリバリーシステムの発展に大いに貢献してきた。上記に挙げたドキシルに加え、アブラキサンは悪性腫瘍に対する他のナノテクノロジーに基づく化学療法薬であり、ナノ粒子アルブミン結合パクリタキセルとして、乳癌、非小細胞肺癌、膵癌に FDA から承認、日本では胃癌に承認されている。遺伝子デリバリーのナノ粒子の適応に関し、多くのナノ粒子が核酸 (DNA, mRNA, siRNA, miRNA) キャリアとして開発され、脂質やポリマーをベースとするナノ粒子による遺伝子治療が現在臨床試験で評価されている。しかしまだそれらは実用段階には及んでいない。リポソームは、人体への使用に十分耐用がある生理学的脂質から構成されており、薬剤キャリアとして最も汎用されるナノ粒子の一つであり、薬剤脂質複合体の免疫原性を減少することで *in vivo* 環境でもステルス効果を持ち得る。先行論文の中では、脂質による腫瘍融解ウイルス自体の封入化が、全身送達に有用である可能性を示している。しかしこの戦略でも、効果的な薬剤送達システムの観点では、いまだ問題点が残る。腫瘍融解ウイルス脂質複合体のサイズはどうしても 100nm を越えてしまうと、それでは EPR 効果の利点を得られない。というのもアデノウイルスや単純ヘルペスウイルスの直径はそれぞれ約 80, 100nm であるためである。この問題の解決に、我々はリポソームでアデノウイルス自体を封入するのではなく、ウイルスのプラスミド DNA を封入することにした。結果、ナノサイズの Lipo-pTS を作製することに成功し、アデノウイルスのファイバーを含むカプシドを除くことで、透過型電子顕微鏡での計測で 40-50nm のサイズまで減少した。1 篇の同様な手法による先行論文があり、その中で、ウイルス自体の投与に比べ腫瘍融解ウイルスゲノム DNA 脂質複合体の全身投与は、強力な代替療法となりうり、従来の腫瘍融解アデノウイルス療法の臨床応用の限界を克服しうることを示している。

腫瘍融解ウイルス療法の基本的な概念としては、ウイルスの宿主細胞への感染後に細胞内でウイルスゲノムが複製され、次のウイルスを産生し特異な細胞死 (腫瘍融解細胞死) を起こすというもので、周囲細胞に連鎖するものである。我々の戦略の第一段階として、アデノウイルスプラスミド DNA による治療後に、癌細胞内で腫瘍融解能をもつウイルスの産生が起きていることを確認することが必要であった。この現象の確認は、freeze-thaw 実験により明白に確認された。次なる段階として、Lipo-pGFP (脂質と GFP 発現プラスミドの複合体で、腫瘍融解能をもたない) に比べて、Lipo-pTS が *in vitro* と *in vivo* 環境で、癌細胞に有効な細胞障害性を持つことを示し、Lipo-pTS が遺伝子導入や GFP 発現のストレスではなく腫瘍融解効果により癌細胞を傷害したことを示した。Lipo-pTS の腫瘍融解効果は、time-lapse 画像実験から (Fig. 2c), 処理後 24 時間で観察され、このことは先行論文からの TelomeScan のウイルスコピー数は、感染後 24 時間以内に 10^5 倍以上に増幅されるという事実に合致するものと思われる。つぎに重要なことは、Lipo-pTS は *in vivo* 環境でも免疫系に対するステルス効果を示した、この中で Lipo-pTS の免疫保有マウスへの全身投与は、TelomeScan ほどの AdNAbs を産生しなかった。さらに Lipo-pTS は AdNAbs

存在下にも有効な細胞障害効果を示し、TlomeScan の細胞障害効果は AdNAbs 存在下ではほとんど無効化されたことは、多くの成人が獲得免疫ですでに AbNAbs を有している事実から非常に有意義なことである。アデノウイルスは通常、アデノウイルスファイバーを介し CAR との接触により細胞に感染し、クラスリン仲介エンドサイトーシスを起こす。この CAR 依存性は、アデノウイルスの効率的な感染性には有用であるが、CAR を細胞表面に発現しない癌細胞に十分な治療効果を発揮できないという点で腫瘍融解アデノウイルス療法には障壁となる。しかし我々の戦略は、理論的にはこの障壁を打開しうり、実際に Lipo-pTS は *in vitro* 環境で CAR 非依存性を示し、Lipo-pTS の感染性は抗 CAR 抗体の前処理による影響を受けなかった。一方で TelomeScan の感染性は約 60% 劇的に抑制された。さらに、GFP を発現する TelomeScan は悪性腫瘍の診断手段としても発展してきたが、Lipo-pTS もまた細胞表面に CAR をほとんど発現しないような転移病巣や血流循環腫瘍細胞をも検出しうる診断手段として有用な可能性がある。

当研究は癌治療の全身送達可能な製剤としてリポソーム封入腫瘍融解アデノウイルス療法の有用な可能性を示した一方で、現時点での限界点もある。全身投与の動物実験がなされていないこと、TelomeScan の未加工のプラスミド DNA を使用していること、商品化リポソームをそのまま使用していることである。それ故に、更なる改良と研究が、更なる効率的な腫瘍融解アデノウイルス製剤の開発のためには必要である。ウイルス DNA の改良の可能性については、報告によると環状プラスミド DNA よりも、Pac I のような制限酵素で腫瘍融解アデノウイルスプラスミド DNA を直線化し、還元性ポリマーとの組み合わせると、より強力な細胞障害性をもつ研究もある。腫瘍融解アデノウイルス DNA の直線化が、導入細胞内での効果的なウイルス複製には好条件の可能性もある。他の有効な改良としては、ナノ粒子表面の修飾ということになるだろう。もっとも汎用される修飾の一つである、ポリエチレングリコール付加は治療薬剤の薬物動態を改善し、血中での安定性の向上や腎クリアランスの減少とともに免疫原性の抑制にもつながる。リガンド、抗体、ペプチドのような特定の受容体やタンパクに結合する不可的処理は、腫瘍選択性や薬物取り込みを向上し、薬物効果を高めるための更なる方法となる。EGFR や HER2 を標的とした、セツキシマブやトラスツズマブ抱合リポソームなどが、標的腫瘍組織内での薬物集積を増加し、化学療法薬の治療効果を高めるとする報告もある。

今回の研究で、リポソーム封入腫瘍融解アデノウイルスプラスミド DNA の戦略は、医学におけるナノテクノロジーの利点を最大有効化し、CAR 非依存性と免疫系へのステルス効果を有する Lipo-pTS の結果から腫瘍融解ウイルス療法の弱点を克服し、*in vitro* と *in vivo* 環境で癌細胞に有効な細胞障害効果を発揮した (Fig. 7)。次段階の研究開発が必要ではあるが、当研究により全身送達可能な腫瘍融解ウイルス製剤の開発の基礎となるものと考えられる。

【結論】

Lipo-pTS は、CAR 非依存的に抗腫瘍効果と免疫系に対するステルス効果を有する全身送達に適した腫瘍融解アデノウイルス製剤となる可能性を秘めている。