

## 中武大夢 学位論文審査要旨

主査 汐田剛史  
副主査 久留一郎  
同 中村貴史

### 主論文

Partial deletion of glycoprotein B5R enhances vaccinia virus neutralization escape while preserving oncolytic function

(糖タンパク質B5Rの部分的欠失は、腫瘍溶解機能を維持しつつワクシニアウイルスの中和回避を強化する)

(著者：中武大夢、黒崎創、桑野望、堀田享佑、伊藤麻衣、河野博通、岡村智崇、長谷川幸清、保富康宏、中村貴史)

令和元年 Molecular Therapy Oncolytics 14巻 159頁～171頁

### 参考論文

1. lncRNA UCA1-mediated Cdc42 signaling promotes oncolytic vaccinia virus cell-to-cell spread in ovarian cancer

(lncRNA UCA1の介するCdc42シグナルは卵巣癌における腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの細胞間拡散を促進する)

(著者：堀田享佑、黒崎創、中武大夢、桑野望、大石徹郎、板持広明、佐藤翔、河野博通、伊藤麻衣、長谷川幸清、原田省、中村貴史)

令和元年 Molecular Therapy Oncolytics 13巻 35頁～48頁

# 学 位 論 文 要 旨

Partial deletion of glycoprotein B5R enhances vaccinia virus neutralization escape while preserving oncolytic function

(糖タンパク質B5Rの部分的欠失は、腫瘍溶解機能を維持しつつワクシニアウイルスの中和回避を強化する)

腫瘍溶解性ウイルス療法はウイルスによる腫瘍組織の直接的な破壊と、破壊された腫瘍への抗腫瘍免疫誘導という2つの作用をあわせ持つ新たながん治療戦略である。この治療法ではウイルスを用いるという特性上、ウイルスに対しての免疫応答がその治療効果を損なう障害となりうる。事実、現状のウイルス療法は腫瘍への直接投与が前提とされ、抗ウイルス抗体陽性の患者に対しては特に全身への治療用ウイルスのアプローチが難しいと考えられている。

この問題を解決すべく、治療用ウイルスの1つとして知られるワクシニアウイルスの持つ免疫回避形態の応用を試みた。ワクシニアウイルスは通常細胞内成熟ウイルス (IMV) と免疫回避能を持つ細胞外被覆ウイルス (EEV) という2種類の感染形態を持つ。EEVは通常IMVが宿主由来の外膜を鎧のようにまとった構造を持ち、宿主抗原に覆われることで免疫の認識を逃れる。この特性は腫瘍溶解性ウイルスへの免疫応答という問題に対する解決策となりうるが、EEVの持つ免疫回避能は完全ではない。EEV外膜上には数種類のウイルス由来抗原が依然提示されており、中でもB5Rという膜タンパク質が宿主免疫の標的となる。B5Rはウイルスの形態形成に重要であるが、B5Rに対する抗体 (抗B5R抗体) は宿主抗原に隠れたEEVを中和する不活化因子となる。

本研究では抗B5R抗体の認識領域であるSCRドメインを欠損したウイルス ( $\Delta$ SCR) を作製し、EEVの免疫回避能を最大化することで免疫存在下でも投与可能な治療用ウイルスの構築を行った。

## 方 法

EEV免疫回避能を最大化すべく、B5R内の抗原 (SCR) 領域を欠損した $\Delta$ SCRウイルスを作製し正常なB5Rを持つ親ウイルスとの比較を行った。基本的な形質の差異をウイルスプラーク像やウイルス産生量により確認した後、20種類の癌細胞株に感染させてEEV・IMVの産生や抗腫瘍効果に差が出るかを検討した。

また $\Delta$ SCRの免疫回避能を評価すべく、ヒト患者血清および免疫済サル血清の使用を検討した。B5R抗原を用いたELISAにより抗B5R抗体価を検出し、抗体価が顕著に出たサル血清を親ウイルスおよび $\Delta$ SCR由来のEEV・IMVと混合し中和させた。その後中和を逃れたウイルス

をヒト卵巣癌RMG-1細胞株へ感染させ、その増殖・伝播を観察した。さらに血清中のEEV中和因子を特定すべく、ウサギ由来の抗ワクシニアウイルス抗体と補体とをそれぞれ分量を振ってEEV等と混合し、上記と同様の手順で中和を逃れたウイルスの観察を行った。

さらに、抗体存在下での腫瘍治療効果を検討するため、腹膜播種モデルへ人工的に抗ウイルス抗体を投与し、検討した。ヒト卵巣癌A2780細胞株をヌードマウス腹腔内へ移植し、事前にウサギ抗ウイルス抗体を投与した後に親由来EEV、あるいは $\Delta$ SCR由来EEVを投与してその後の腫瘍退縮や生存期間を比較した。

## 結 果

$\Delta$ SCRウイルスは親ウイルスと比較しプラークサイズの縮小は見られたが、多くの癌細胞でEEV・IMVの産生量や抗腫瘍効果を損なうことはなかった。むしろヒト卵巣癌細胞や肺癌細胞ではEEV産生が増加する傾向が見られた。

一方、ウイルスの中和回避試験のためにヒトおよびサル血清中の抗B5R抗体価を測定したところ、ワクシニアウイルスを免疫したサル血清において抗B5R抗体を確認した。免疫済サル血清への各ウイルスの中和回避を比較したところ、 $\Delta$ SCR由来EEVは親ウイルス由来EEVより高い回避能を有していた。一方、IMVは両方のウイルス由来とも回避能は持たなかった。さらにウサギ由来の抗ウイルス抗体・補体による中和試験により、抗B5R抗体によるEEVの中和は補体依存的であり、 $\Delta$ SCR由来EEVはそれら中和因子への回避能が高まることがわかった。

腫瘍腹膜播種マウスでの検討では抗体無しでの治療効果は親由来EEVと $\Delta$ SCR由来EEVとで差はなかったものの、抗体存在下では親由来EEVは治療効果が抑えられた。 $\Delta$ SCR由来EEVは抗体存在下でもその増殖を維持し、抗体非存在時と同等の抗腫瘍効果および生存延長効果を示した。

## 考 察

EEVの抗原分子B5Rは全域を欠損させるとウイルスの増殖やEEV産生能を大きく損なうが、B5R内の抗原領域SCRのみの欠損はそれらウイルスの特性は損なわず中和因子への回避能を増大させた。ウイルスを治療因子として用いる腫瘍溶解性ウイルス療法においては、本研究のSCR欠損はワクシニアウイルスの治療効果と中和回避能を最適化させる改変であると考えられる。

## 結 論

B5R内の抗原領域を欠損させた $\Delta$ SCRウイルスは自身の増殖、子孫ウイルス産生、腫瘍溶解能を損なうことなくEEV中和抗体回避能を高めた。 $\Delta$ SCRウイルスは、特にウイルスへの抗体を有する患者に対しての新たな治療手段となることが期待できる。