

令和元年6月13日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09501

研究課題名(和文)造血器腫瘍に対するHSV-1ウイルス療法の開発

研究課題名(英文)Oncolytic virus therapy with HSV-1 for hematological malignancies

研究代表者

門脇 則光(Kadowaki, Norimitsu)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：60324620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子改変を施したHSV-1であるT-01が21種類のヒト造血器腫瘍細胞株中16細胞株で殺細胞効果を示した。HSV-1レセプターnectin-1の発現レベル、T-01のエントリー量、殺細胞効果の三者に正の相関関係がみられた。これに一致して、nectin-1のノックダウン細胞においてT-01のエントリー量が減少し、nectin-1陰性細胞へのnectin-1強制発現によって殺細胞効果が付与された。以上より、造血器腫瘍におけるHSV-1の殺細胞効果は、nectin-1を介したエントリーに強く規定され、nectin-1の発現が有効性のバイオマーカーになると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんウイルス療法がさまざまな固形がんに対する免疫療法の1つとして発展しつつあり、中でもHSV-1がメラノーマに対して実用化されている中、このウイルスが造血器腫瘍に対しても有効性が期待できることが示された。このことは、造血器腫瘍に対する免疫療法の選択肢を増やし治療成績の向上につながるとともに、今後ウイルス療法と免疫チェックポイント阻害療法の併用といった複合的免疫療法の開発に発展しうる成果である。

研究成果の概要(英文)：A recombinant HSV-1, T-01, killed 16 out of 21 human cell lines of hematological malignancies. Positive correlations were observed among the expression levels of HSV-1 receptor nectin-1, entry of T-01, and cytotoxicity. In accord with it, knockdown of nectin-1 decreased entry of T-01, and forced expression of nectin-1 induced cytotoxic activity. These data indicate that viral entry via nectin-1 is a determining factor of cytotoxicity by oncolytic HSV-1 against hematological malignancies, and that the expression of nectin-1 is a biomarker of the susceptibility of hematological malignancies to HSV-1.

研究分野：血液学、免疫学

キーワード：造血器腫瘍 ウイルス療法 免疫療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体といった、T 細胞への抑制シグナルをブロックする免疫チェックポイント阻害薬などのめざましい臨床効果により、がん免疫療法ががん治療の表舞台に一気に躍り出てきた。しかし、これらの治療効果はメラノーマや腎がんといった限られた腫瘍の、しかも一部の患者でしか示されていない。今後免疫療法を発展させるためには、「1. 免疫抑制のブロック」と「2. 免疫反応の誘導」の併用という複合的がん免疫療法が必要である。免疫の本来の働きである感染免疫では、この2つが有機的に起こる。つまり、病原体によって活性化された自然免疫が、感染巣における免疫抑制をブロックするとともに、樹状細胞(DC) T 細胞という免疫反応を誘導する。これにより、「自然免疫 樹状細胞 T 細胞 その病巣への集積」という一連の事象(いわば immunogenic cycle 図1)が起こる。この感染免疫の physiology をがん再現するのが、「がんのウイルス療法」である。

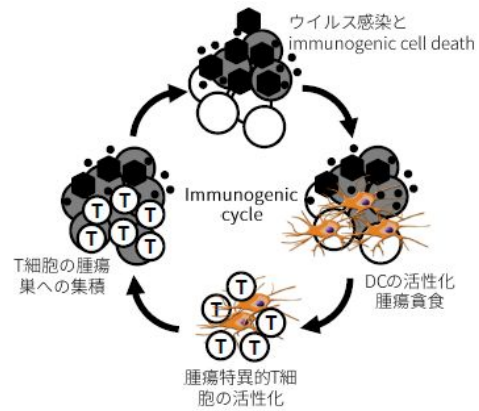


図1 Immunogenic cycle (感染免疫の physiology の腫瘍における再現)

ウイルス療法は、遺伝子改変により腫瘍選択性と腫瘍殺傷性を付与した腫瘍溶解性ウイルス (oncolytic virus; OV) を主として腫瘍内に投与し、がん細胞を選択的に殺傷しようと開発された治療だが、その効果のかなりの部分が免疫学的機序によることが明らかになりつつある。すなわち、OV が腫瘍細胞を殺すと同時に、自然免疫を刺激して腫瘍巣の免疫抑制環境を打破する。そして、自然免疫によって活性化された DC が死んだ腫瘍細胞を貪食し、抗腫瘍 T 細胞反応を全身的に誘導する(図1)。実際特筆すべきことに、一部の腫瘍内への投与であっても、離れた部位の腫瘍も縮小する(J Clin Oncol 27: 5763, 2009)。このように、ウイルス療法は、感染免疫と同じことをがんを起こす、合理的な「がんワクチン療法」といえる。

ウイルス療法の開発は、ウイルス感染後に腫瘍が縮小するという anecdotal な報告に端を発しているが、興味深いことに、そのほとんどが白血病、悪性リンパ腫といった造血器腫瘍である。したがって、造血器腫瘍はウイルス療法が効きやすい可能性がある。

OV としてさまざまなウイルスが用いられているが、中でも HSV-1 は開発が進んでおり、現在米国で進行期メラノーマに対し第 III 相試験が、また東京大学で難治性脳腫瘍(膠芽腫)と前立腺癌に対し臨床試験が行われている。しかし、HSV-1 が血液細胞に感染しにくいことから造血器腫瘍には効かないと信じられ、造血器腫瘍への応用は試みられていない。

2. 研究の目的

東大医科学研究所脳腫瘍外科・藤堂具紀教授が開発し、膠芽腫と前立腺癌に対する臨床試験に用いられている遺伝子組換え HSV-1 である G47 と同様の遺伝子改変を施した T-01 を用いる。そして、(1) T-01 がヒト造血器腫瘍細胞に感染しこれを殺傷するか、(2) T-01 がどのようにして免疫系を活性化するか(腫瘍細胞の immunogenic cell death の誘導)、(3) マウス in vivo の造血器腫瘍に対して T-01 が有効か、を細胞・分子・個体レベルで解析し、造血器腫瘍に対する HSV-1 ウイルス療法の臨床応用に向けた基盤的知見を得る。

3. 研究の方法

遺伝子組換え HSV-1 G47 について

G47 (東大医科研・藤堂具紀教授より供与) は、正常細胞・腫瘍細胞の両方に感染するが腫瘍細胞でしか複製できないように、次の3つの遺伝子組換えを施した HSV-1 である。

- 34.5 遺伝子の欠失: 抗ウイルス酵素 PKR に拮抗するウイルス蛋白 34.5 の遺伝子を欠失させることにより、PKR が低下した腫瘍細胞でのみ G47 が複製できる。
- Ribonucleotide reductase (RR) をコードする ICP6 遺伝子の不活化(大腸菌 *lacZ* 遺伝子の挿入による): G47 は腫瘍細胞の RR を利用して腫瘍細胞でのみ複製できる。
- 47 遺伝子の欠失: TAP を阻害してウイルス抗原の MHC クラス I への提示を阻害する 47 をなくし、G47 感染腫瘍細胞の抗原提示能を保つ。

以上により、G47 は優れた安全性と抗腫瘍免疫誘導能を兼ね備えている。本研究では、G47 と同様の遺伝子改変を施した HSV-1 である T-01 を用いる。

(1) T-01 が造血器腫瘍細胞に感染しこれを殺傷するか

さまざまなヒト造血器腫瘍細胞株や、造血器腫瘍患者由来の primary の腫瘍細胞に GFP を遺伝子導入した T-01 を添加して、フローサイトメトリーにて T-01 の感染を検出する。また、トリパンブルー染色で生細胞数をカウントすることにより、殺傷の有無・程度を定量する。

また、HSV レセプター nectin-1, HVEM, PILR の各腫瘍細胞上の発現と、これらに対する阻害抗体を用いた実験、あるいは遺伝子ノックダウンや強制発現の実験により、T-01 感染の責任レセプターを調べる。

(2) T-01 による腫瘍細胞死が immunogenic cell death (ICD) かどうか

腫瘍細胞が ICD で死滅すると抗腫瘍免疫が高まる。そこで、免疫賦活作用のある ATP や HMGB1 の放出を ELISA で測定し、T-01 で死んだ腫瘍細胞が ICD の特性をもつかどうか調べる。

(3) T-01 のリンパ腫皮下接種モデルへ T-01 を腫瘍内投与し、抗腫瘍作用がみられるか

次に、T-01 の in vivo での抗腫瘍効果をマウスモデルで検証する。HSV-1 は、静脈内投与すると血管壁に付着しやすく腫瘍巣に到達しにくいので、主に腫瘍内投与される。造血器腫瘍の中で、臨床応用の際に腫瘍内投与に適した悪性リンパ腫を対象として、その皮下接種モデルを用いる。免疫不全マウスにヒトリンパ腫細胞株を皮下接種し、T-01 を腫瘍内投与すると増大が抑制されるかどうかを調べる。

4. 研究成果

(1) T-01 が造血器腫瘍細胞に感染しこれを殺傷するか

さまざまな系統（骨髄系、B 細胞系、T 細胞系）のヒト造血器腫瘍細胞株 21 種類中 16 種類に T-01 が感染し、細胞が死滅した（図 1）。また、造血器腫瘍患者由来の primary の腫瘍細胞 16 例中 8 例に T-01 が感染し、細胞が死滅した。

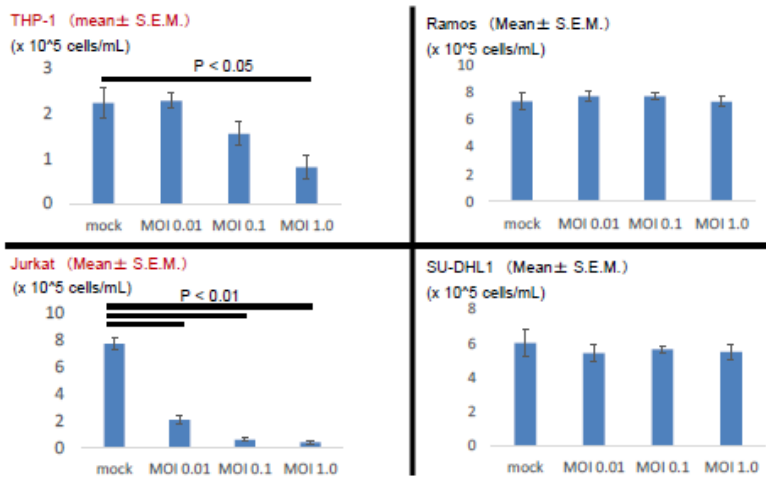


図 1 T-01 によるヒト造血器腫瘍細胞株の死滅(in vitro)

T-01 を、記載のような MOI (multiplicity of infection) で添加すると、THP-1 (急性骨髄性白血病)、Jurkat (急性 T リンパ性白血病) は用量依存性に死滅し、Ramos (Burkitt リンパ腫)、SU-DHL-1 (びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫) は死滅しなかった。

感受性細胞と抵抗性細胞

の違いを明らかにするために、細胞株上の HSV-1 レセプターの発現レベル、GFP 導入 T-01 のエンタリー量、殺細胞効果の三者の相関を調べたところ、nectin-1 の発現レベル、T-01 のエンタリー量、殺細胞効果の三者に定量的な正の相関関係がみられた（図 2）。

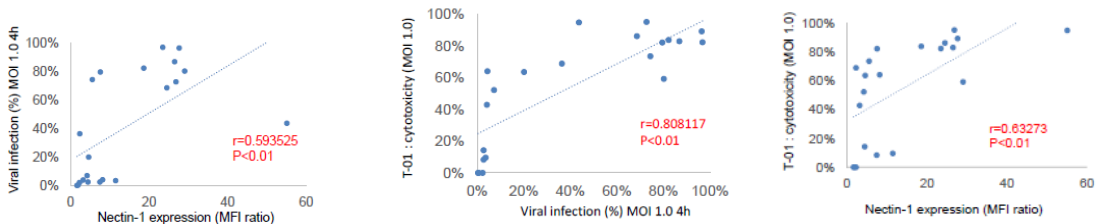


図 2 Nectin-1 の発現レベル、T-01 のエンタリー、殺細胞効果の相関

ヒト造血器腫瘍細胞株における nectin-1 の発現レベル、T-01 のエンタリー、殺細胞効果の 3 者が高い相関を示した。

これに一致して、nectin-1 のノックダウン細胞において T-01 のエンタリー量が減少し、nectin-1 陰性細胞 (Burkitt リンパ腫細胞株 Ramos) への nectin-1 強制発現によって殺細胞効果が付与された（図 3）。一方、HSV-1 レセプター-HVEM の発現レベルと T-01 のエンタリー量や殺細胞効果に相関はみられなかった。

(2) T-01 による腫瘍細胞死が immunogenic cell death (ICD) かどうか

T-01 で死滅した腫瘍細胞株の培養上清中に、ICD に特徴的な ATP や HMGB1 の放出が検出された。

(3) T-01 のリンパ腫皮下接種モデルへ T-01 を腫瘍内投与し、抗腫瘍作用がみられるか

In vitro において T-01 で死滅するマントル細胞リンパ腫細胞株 GRANTA-519 を免疫不全マウス (SCID Beige マウス) に皮下接種し、T-01 を腫瘍内投与すると、腫瘍の増大が抑制された（図 4）。このことは、T-01 が in vivo でも抗腫瘍効果をもつことを示す。

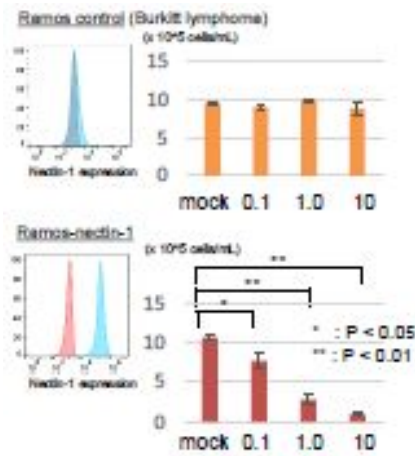


図3 Nectin-1の強制発現による殺細胞効果の付与
Nectin-1が陰性でT-01により死滅しないBurkittリンパ腫細胞株Ramosにnectin-1遺伝子を導入しこれを強制発現させると、T-01により死滅するようになった。

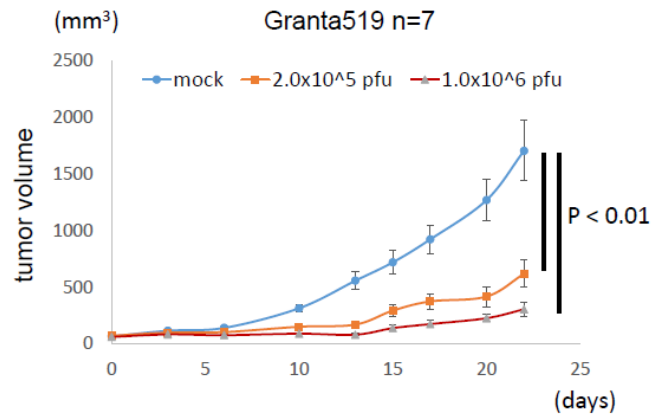


図4 悪性リンパ腫に対するT-01のin vivoでの抗腫瘍効果
マントル細胞リンパ腫細胞株GRANTA-519の皮下腫瘍にT-01を腫瘍内投与すると、腫瘍の増大が抑制された。

本研究の意義

がんウイルス療法がさまざまな固形がんに対する免疫療法の1つとして発展しつつあり、中でもHSV-1がメラノーマに対して実用化されている中、本研究により、HSV-1が造血器腫瘍に対しても有効性が期待できることが示された。このことは、造血器腫瘍に対する免疫療法の選択肢を増やし治療成績の向上につながるるとともに、今後ウイルス療法と免疫チェックポイント阻害療法の併用といった複合的免疫療法の開発に発展しうる成果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Kadowaki N. Guest editorial: advances in immunotherapy for hematological malignancies. International Journal of Hematology 107: 260-261, 2018 査読有
DOI: 10.1007/s12185-018-2420-8

〔学会発表〕(計11件)

石野 亮、川瀬 有美、北脇 年雄、杉本 直志、稲生 靖、藤堂 具紀、高折 晃史、門脇 則光: 造血器腫瘍に対するHSV-1ウイルス療法の効果規定因子。第80回日本血液学会学術集会、大阪、2018年10月12-14日

石野 亮、川瀬 有美、北脇 年雄、杉本 直志、稲生 靖、藤堂 具紀、高折 晃史、門脇 則光: 造血器腫瘍に対するHSV-1ウイルス療法の効果規定因子。第10回血液疾患免疫療法学会学術集会、東京、2018年9月22日

石野 亮、川瀬 有美、北脇 年雄、杉本 直志、稲生 靖、藤堂 具紀、高折 晃史、門脇 則光: 造血器腫瘍に対するHSV-1ウイルス療法の効果規定因子。第22回日本がん免疫学会総会、岡山、2018年8月1-3日

石野 亮、川瀬 有美、北脇 年雄、杉本 直志、稲生 靖、藤堂 具紀、高折 晃史、門脇 則光: 造血器腫瘍に対するHSV-1ウイルス療法の開発。第79回日本血液学会学術集会、東京、2017年10月20-22日

石野 亮、川瀬 有美、北脇 年雄、杉本 直志、稲生 靖、藤堂 具紀、高折 晃史、門脇 則光: 造血器腫瘍に対するHSV-1ウイルス療法の開発。第9回血液疾患免疫療法学会学術集会、東京、2017年9月30日

石野 亮、川瀬 有美、北脇 年雄、杉本 直志、稲生 靖、藤堂 具紀、高折 晃史、門脇 則光：造血器腫瘍に対する HSV-1 ウイルス療法の開発。第 21 回日本がん免疫学会総会、千葉、2017 年 6 月 28-30 日

Ishino R, Kawase Y, Sugimoto N, Kitawaki T, Ino Y, Todo T, Takaori-Kondo A, Kadowaki N. Oncolytic Virus Therapy with HSV-1 for Hematologic Malignancies. The 8th JSH International Symposium in Miyazaki, Miyazaki, May 19-20, 2017.

Ishino R, Kawase Y, Kitawaki T, Sugimoto N, Ino Y, Todo T, Takaori-Kondo A, Kadowaki N. Oncolytic Virus Therapy using HSV-1 for hematologic malignancies. 第 78 回日本血液学会 学術集会、横浜、2016 年 10 月 13-15 日

石野 亮、川瀬 有美、北脇 年雄、杉本 直志、稲生 靖、藤堂 具紀、高折 晃史、門脇 則光：造血器腫瘍に対する HSV-1 ウイルス療法の開発。第 8 回血液疾患免疫療法学会、札幌、2016 年 9 月 3 日

石野 亮、川瀬 有美、北脇 年雄、杉本 直志、稲生 靖、藤堂 具紀、高折 晃史、門脇 則光：造血器腫瘍に対する HSV-1 ウイルス療法の開発。第 20 回日本がん免疫学会総会、大阪、2016 年 7 月 27-29 日

Ishino R, Kawase Y, Kitawaki T, Sugimoto N, Ino Y, Todo T, Takaori-Kondo A, Kadowaki N. Oncolytic Virus Therapy with HSV-1 for Hematologic Malignancies. The 7th JSH International Symposium 2016 in Awaji, Awaji, May 13-14, 2016.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。