

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19312

研究課題名(和文) 肝細胞癌に対する腫瘍融解ワクシニアウイルスJX-594と一過性免疫抑制の併用効果

研究課題名(英文) The effect of oncolytic vaccinia JX-594 in combination with transient immunosuppression for hepatocellular carcinoma

研究代表者

長谷川 直之 (Hasegawa, Naoyuki)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：00707820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍融解ウイルスJX-594と免疫抑制の併用によりウイルス増殖が促進し、治療抵抗性の進行癌に有効な可能性がある。治療抵抗性の原因として癌幹細胞(Cancer stem cell; CSC)が知られており、CSCに対するJX-594と免疫抑制の併用効果を検討することとした。CSCの安定した培養に難渋したが、mTeSR1培地で肝細胞癌細胞株Li-7を培養するとCSCの性質を有するCD13陽性細胞が維持され、動物実験でも腫瘍形成能が維持されることが明らかとなった。CSCに対する新規治療の検討に有用な安定した実験系が確立した。今後、CSCに対するJX-594と免疫抑制の併用効果を動物実験で検討する。

研究成果の概要(英文)：Combination therapy of Oncolytic vaccinia virus JX-594 and immunosuppression has possibilities to overcome the treatment-resistant progressive cancer. Recently, it is known that cancer stem cells (CSCs) cause the treatment resistance. CSCs are suitable therapeutic targets for overcoming the treatment-resistance. We decided to research the efficacy of combination therapy of JX-594 and immunosuppression to hepatocellular carcinoma CSCs. However, to incubate CSCs stably was difficult, so that we have to establish the stable CSC's incubation method at first. We found that CD13 positive cells in hepatocellular carcinoma cell line, Li-7, had CSC features and those cells could be maintained stably by mTeSR1 medium. This result is useful to develop the new treatment for CSCs. We will apply this incubation method to research the efficacy of combination therapy of JX-594 and immunosuppression to treatment-resistant hepatocellular carcinoma.

研究分野：肝胆膵疾患

キーワード：肝臓癌 腫瘍融解ウイルス 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

現在、進行肝細胞癌に対しては、分子標的薬や肝動注化学療法等による治療が行われているが、その効果には限界があり、進行肝細胞癌の予後はなお不良であり、新規治療法の開発が望まれている。

近年、腫瘍細胞選択的に増殖し腫瘍を融解壊死させる種々の「腫瘍融解ウイルス」が開発され、癌の遺伝子治療用の基盤ベクター（遺伝子武装腫瘍融解ウイルス）として注目されている。JX-594 は、米国 Jennerex 社の開発した腫瘍融解ワクシニアウイルスであり、thymidine kinase(TK)を欠損することにより正常細胞内では複製不能であるが、腫瘍細胞内では腫瘍が産生する TK を利用して複製可能となり、腫瘍を融解壊死させる。JX-594 はすでに肝細胞癌患者を対象とした第 2 相臨床試験が報告され(Heo J et al. *Nature Medicine*. 2013; 19:329-36)、現在海外では第 3 相臨床試験が実施されている。

腫瘍融解ウイルスとそれをを用いた遺伝子治療には抗ウイルス免疫が障壁となるが、免疫抑制剤併用によりその問題を克服できるとの報告が複数ある。

一方、癌の再発・転移・治療抵抗性に関しては最近の研究により癌幹細胞(cancer stem cells; CSCs) が関与していることが明らかとなった。CSCs を治療対象とする新規治療の開発が必要不可欠と考えられる。JX-594 と免疫抑制剤の併用療法の肝細胞癌 CSCs に対する効果は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、治療抵抗性の肝細胞癌に対する JX-594 と免疫抑制療法の効果を肝細胞癌の癌幹細胞モデル(CSCs)で検証することを目的とした。

肝細胞癌 CSCs モデルとして、肝細胞癌細胞株 Li-7 において CD13+CD166-分画細胞が CSCs 様の特徴を持つことが報告されている(Yamada T et al. *BMC Cancer* 2015 15:260)。

肝細胞癌細胞株 Li-7 は長期培養によって CSCs の特徴を持つ CD13+CD166-分画細胞の割合が減少し、マウスにおける腫瘍形成能を失っていた。肝細胞癌 CSCs における JX-594 と免疫抑制療法の効果を検討する上で、まず CSCs における thymidine kinase(TK)の活性や JX-594 の感染効率、殺細胞効果を in vitro および in vivo で検討する必要がある、長期継代培養でも CSC 分画が維持される新しい Li-7 の培養法を確立する必要があった。

3. 研究の方法

(1)いくつかの市販のヒト胚性幹(embryonic stem; ES)細胞/ヒト人工多能性幹(induced pluripotent stem; iPS)細胞用培地を用いて、肝細胞癌細胞株 Li-7 の CSCs 様の特徴を持つ CD13+CD166-分画を長期に安定して培養

できる新しい培養方法を検討した。

(2)ヌードマウス(BALB/c nu/nu, 4-5 週齢, メス)の皮下に、通常の Li-7 と新しい培養方法で培養した Li-7 を移植し、腫瘍形成能を比較した。

(3)新しい培養方法で培養した Li-7 の CD13+CD166-分画細胞のスフェア形成能および ALDH 活性を他の分画細胞と比較した。スフェア形成能の評価には、ナノカルチャープレート-MS, ナノカルチャーメディア R タイプ(ともに ORGANONENIX 社)を用いた。各分画の細胞を 4×10^3 個ずつ、セルソーターで 96well plate に回収し、ソート 14 日後に形成されたスフェアの数を顕微鏡下でカウントした。

ALDH 活性の測定には ALDEFLUOR 試薬(STEMCELL Technologies 社)を用い、添付説明書通りに試薬を反応させ、FACS SORP Aria (BD 社)で解析を行った。

(4)新しい培養方法で培養した Li-7 の各分画の細胞をセルソーターで回収し、ヌードマウス(BALB/c nu/nu, 4-5 週齢, メス)の皮下に 1×10^6 細胞個ずつ移植した。各分画ごとの腫瘍形成能を比較した。

4. 研究成果

(1)肝細胞癌細胞株 Li-7 の CD13+CD166-分画細胞を安定して維持する培養方法の検討

いくつかの市販の ES/iPS 細胞培養用培地で Li-7 を培養した。結果、mTeSR1(STEMCELL Technologies 社)を用いて Li-7 を培養すると、CD13 高発現の細胞が高頻度に維持されることがわかった。通常の RPMI1640+10%FBS 培地で継代培養を続けると、培養開始から 1 か月後には CD13+CD166-分画細胞は全体の 10%以下まで減少するが(図 1)、mTeSR1 培地を用いて培養すると、CD13+CD166-細胞分画は約 30%程度維持された(図 2)。

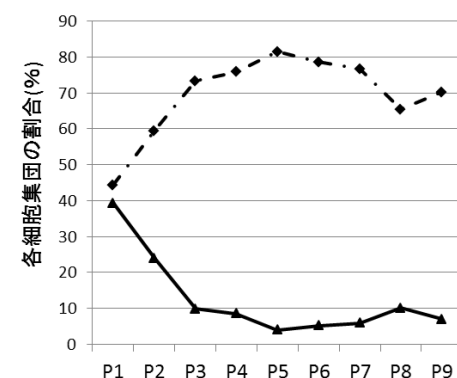


図 1. RPMI+10%FBS 培地での継代培養

—▲— CD13+CD166-
 -◆- CD13-CD166+
 P; 継代数

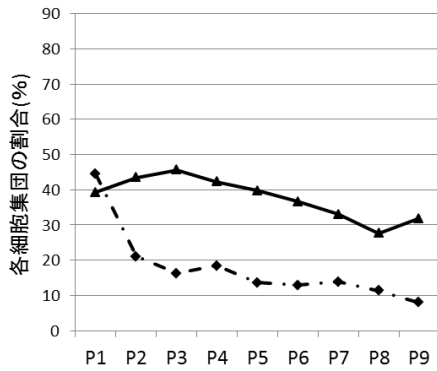


図 2. mTeSR1 培地での継代培養

—▲— CD13+CD166-
 -◆- CD13-CD166+
 P; 継代数

(2) 新しい培養方法で培養された Li-7 のマウス腫瘍形成能の評価

(1) で得られた CD13+CD166- 分画細胞を維持した Li-7 細胞をヌードマウスの皮下に移植し, その腫瘍形成能を通常培養された Li-7 細胞と比較した(表 1)。mTeSR1 培地で培養された Li-7 は 2×10^5 個の移植後 4 週間で 4 か所/4 か所の皮下腫瘍形成が確認されたが, 通常培養された Li-7 は 5×10^6 個の移植でも, 8 週間後にわずか 1 か所/4 か所の皮下腫瘍が確認されたのみであった。以上より, 新しい培養方法によって, Li-7 は通常培養された状態よりも高いマウス腫瘍形成能を持つことが明らかとなった。

培養条件	移植細胞数	2週	4週	6週	8週
RPMI1640 +10%FBS	1×10^6	0/4	0/4	0/4	0/4
	2×10^6	0/4	0/4	0/4	1/4
	5×10^6	0/4	0/4	0/4	1/4
mTeSR1	2×10^5	2/4	4/4		
	5×10^5	4/4			

表 1. ニードマウスへの皮下移植実験

(3) 新しい培養方法で培養された Li-7 における CD13+CD166- 分画細胞の *in vitro* の特徴の再評価

前述のとおり, Yamada らにより通常培養された Li-7 においては, CD13+C166- 分画細胞が CSCs 様の特徴を持つことが報告されている。そこで, 今回(1)(2)で得られた高いマウス腫瘍形成能をもつ新しい Li-7 においても同様に CD13+CD166- 分画細胞が CSCs 様の特徴を持つのかを検証した。

まず CSCs の *in vitro* 特徴の一つと考えられているスフェア形成能を評価した。mTeSR1 培地で培養された Li-7 から各分画細胞をセルソーターで回収し, そのスフェア形成能を比較した。結果, CD13+CD166- 分画細胞は, 他の分画細胞に比べて, 高いスフェア形成能

を示した(図 3)。

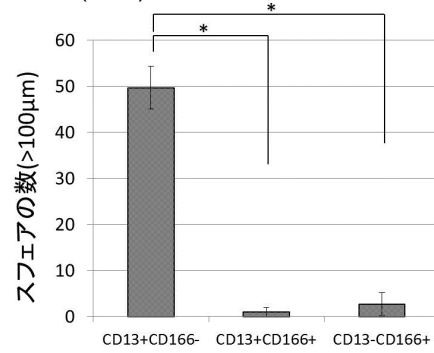


図 3. 各分画のスフェア形成能の比較

* ; P<0.01

次に, 同じく CSCs の性質の一つとされている高 ALDH 活性について調べた。各分画の ALDH 活性を比較した結果, 細胞内の ALDH 活性は CD13+CD166- > CD13+CD166+ > CD13-CD166+ 分画細胞の順に高いことが明らかとなった(図 4)。

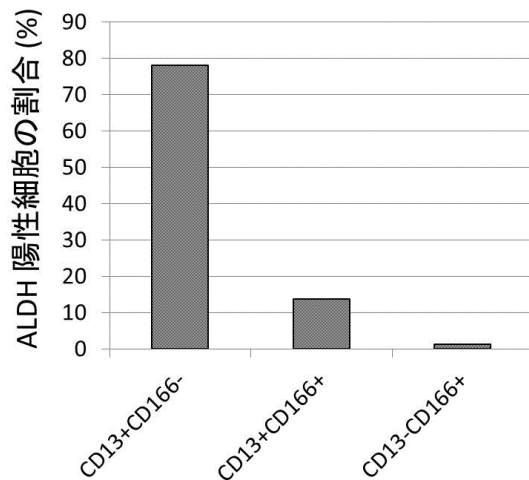


図 4. 各分画の ALDH 活性の比較

これらの結果から, mTeSR1 培地で培養された Li-7 においても, CD13+CD166- 分画細胞は, *in vitro* で CSCs 様の特徴をもつことが明らかとなった。

(4) 新しい培養方法で培養された Li-7 における CD13+CD166- 分画細胞のマウス腫瘍形成能の評価

次に, mTeSR1 培地で培養された Li-7 における CD13+CD166- 分画細胞が, *in vivo* でも CSCs 様の特徴をもつことをヌードマウスへの移植実験で確認した。結果, mTeSR1 培地で培養された Li-7 の CD13+CD166- 分画細胞は移植後 6 週間以内に腫瘍形成が確認できたのに対して, 他の細胞分画では, 3 か月以内の腫瘍形成は確認されなかった(表 2)。

このことから, 新しい培養方法によって維持された Li-7 CD13+CD166- 細胞分画は, 肝細胞癌 CSCs の *in vitro*, *in vivo* のモデルとして有用であると考えられた。

培養条件	ソート・ 移植した細胞	2週	4週	6週	8週	12週
RPMI1640 +10%FBS	CD166-	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	CD166+	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
mTeSR1	CD13+CD166-	0/2	1/2	2/2		
	CD166+	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1

表 2. セルソーティング後のヌードマウスへの皮下移植実験

以上に示したように、我々は、肝細胞癌細胞株 Li-7 の CSCs 様分画を安定して維持培養する方法を構築した。この方法によって培養された Li-7 細胞は、通常培養された Li-7 細胞と比べ、バルクでも高い腫瘍形成能を示した。この ES/iPS 細胞用培地を用いた新しい培養法によって維持された CD13+CD166- 分画は、in vitro, in vivo の両方で CSCs 様の特徴を示した。これにより治療抵抗性の進行肝細胞癌に対する有効な治療法の検討が可能となった。今後は Li-7 の CSCs に対する JX-594 と免疫抑制剤の併用効果について検討をしていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1. Yamada T, Hamano Y, Hasegawa N, Seo E, Fukuda K, Yokoyama KK, Hyodo I, Abei M. Oncolytic Virotherapy and Gene Therapy Strategies for Hepatobiliary Cancers. *Curr Cancer Drug Targets*. 2018;18(2):188-201. 査読有

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 直之 (Hasegawa Naoyuki)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：00707820