

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20219

研究課題名(和文) 弱毒性HSV-1 HF10を用いた頭頸部扁平上皮癌への腫瘍溶解療法の開発

研究課題名(英文) Oncolytic activity of HF10 for head and neck squamous cell carcinomas

研究代表者

江崎 伸一 (Esaki, Shinichi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20620983

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)：本研究では、HF10がHNSCCに対して抗腫瘍ウイルスとして効果があるか検討を行った。2つのヒト由来頭頸部扁平上皮癌細胞株と、1つのマウス由来扁平上皮癌細胞株を用意した。HF10はどの細胞においてもin vitro、in vivoで増殖し、細胞死を誘導した。局所ではHSV感染領域にネクロシスとCD8T細胞が認められた。また、脾臓では顆粒球、CD8T細胞が増加し、腫瘍細胞で刺激したところ、抗腫瘍サイトカインが増加していた。以上の結果からHNSCCに対してHF10は治療効果、抗腫瘍免疫の誘導効果を認め、新しい治療法としての選択候補として示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the therapeutic potential of HF10 against head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Two human HNSCC cell lines, a mouse SCC cell line were prepared. HF10 replicated well, and killed them. HF10 injection decreased ear tumor in vivo and prolonged survival. Pathologically, HF10 infection induced necrosis, where infiltrating CD8 T cells were observed. Granulocytes and CD8 T cells increased in the spleen, and several antitumor cytokines increased in the supernatant of splenic cells after stimulation with the tumor cells. The mice that had survived from tumor rejected re-challenge of the tumor cells. These result suggested that HF10 killed the HNSCC cells and induced antitumoral immunity, and that HF10 can be a promising agent for the treatment of HNSCC patients.

研究分野：耳鼻咽喉・頭頸部外科

キーワード：腫瘍溶解ウイルス療法 単純ヘルペスウイルス 頭頸部扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

頭頸部領域に発生する悪性腫瘍の 90%以上が扁平上皮癌である。手術療法、化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的治療により予後は改善しているが、20-30%の割合で局所もしくは遠隔臓器に再発する。再発腫瘍に対する治療選択肢は乏しいため、新しい治療法の開発が必要とされている。

腫瘍溶解ウイルス療法とは、ウイルスの正常組織に対する病原性を排除し、癌細胞だけで増殖させることを意図した治療法である。現在様々なウイルスが前臨床的な研究、臨床治験に用いられてきている。名古屋大学医学部ウイルス学教室でクローニングした HF10 は、自然発生型の弱毒型単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) である。今まで、多くの癌細胞株で増殖性が非常に高く、様々なマウス腫瘍モデルですぐれた抗腫瘍性と安全性を有していることを明らかにしてきた(悪性黒色腫、大腸癌、乳癌、膵臓癌、膀胱癌、卵巣癌、繊維肉腫)。また頭頸部扁平上皮癌乳癌、膵癌に対して臨床試験を行い、癌細胞破壊作用と安全性を確認した。現在では米国ピッツバーグ大学医療センターを中心とした多施設にて、扁平上皮癌、乳癌、悪性黒色腫を対象とした第 I/II 相試験を終え、現在は免疫チェックポイント阻害剤である Ipilimumab との併用療法の臨床治験が行われているところである。

2015 年には遺伝子欠損させた HSV-1 に GM-CSF を挿入した腫瘍溶解ウイルス (talimogene laherparevec) が第 相試験を終え、米国 FDA に認可された。その第 相試験では、悪性黒色腫患者の 16%に治療効果が示され、抗メラノーマ抗原特異的 T 細胞の増加、免疫抑制細胞の減少により未接種腫瘍の退縮も認められた。

HF10 は自然発生型のウイルスであり、ウイルスゲノムの安定性が大きな特徴であるウイルスである。過去の研究により、メラノーマ細胞株を用いたマウスモデルにおいて、HF10 を腫瘍塊に接種することにより抗腫瘍免疫が増強した。また、骨髄由来抑制細胞 (MDSC) を抑制するゲムシタピンを HF10 と併用することにより、大腸癌細胞株を用いたマウスモデルにおいても抗腫瘍免疫が増強されることを示した。頭頸部扁平上皮癌については、腫瘍内で HF10 が増殖することが臨床研究から確認されているが、抗腫瘍免疫にあたる影響は不明である。

2. 研究の目的

本研究は HF10 の頭頸部扁平上皮癌への抗腫瘍効果、抗腫瘍免疫への影響を検査することを目的とする。具体的にはヒト由来の癌細胞株を用いて、HF10 の抗腫瘍作用を *in vitro*、*in vivo* の両面から検討する。またマウス由来の癌細胞株を用いて、抗腫瘍効果を同様に検討すると共に、治療後に誘導される抗腫瘍効果について検討する。

3. 研究の方法

ヒト扁平上皮癌細胞株としては、FaDu、Detroit 562 を、マウス扁平上皮癌としては SCC-VII を用いた。まずは *in vitro* で HF10 を感染させて 72 時間培養し、生存した細胞を MTS assay で検討し、HF10 単独の抗腫瘍効果を検討した。次に、35mm dish に各腫瘍細胞を播き、HF10 を感染させてウイルス増殖を検討した。ウイルス増殖については、頻用される Vero 細胞 (アフリカモドリザルの腎臓上皮細胞) を用いた。

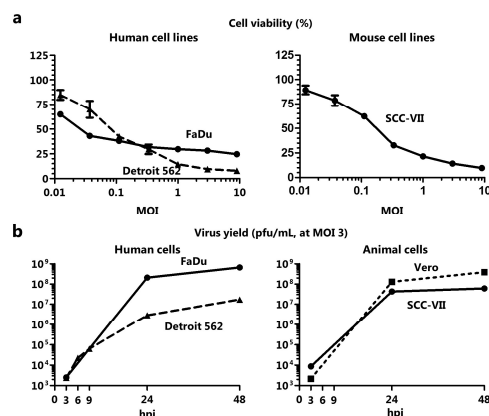
今まで頭頸部に腫瘍を作成して抗腫瘍ウイルス療法の効果を検討した研究が存在しなかった。そこで、マウス耳介に FaDu を 1×10^6 個を接種して、耳介腫瘍モデルマウスを作成した。腫瘍が明らかとなった直径 3mm 程度から治療を開始した。HF10 を 2 日おき、2 回接種し、腫瘍の縮小効果を検討した。次に、マウス耳介に SCC-VII を 5×10^5 個を接種して、耳介腫瘍モデルマウスを作成した。直径 3mm 程度となった頃から HF10 を 2 日おき、2 回接種して、腫瘍の縮小効果を検討した。

次に、SCC-VII 腫瘍モデルを用いて抗腫瘍免疫を検討した。HF10 を 2 回接種した翌日に腫瘍塊を切除して、組織切片を作成した。連続切片を H&E 染色、抗 HSV 抗体染色、抗 CD4 抗体染色、抗 CD4 抗体染色を行い、組織学的検討を行った。同時に脾臓を切除し、脾細胞の一部を各免疫細胞マーカーで染色し、脾臓に占める免疫細胞の変化を検討した。また、残りの脾細胞を腫瘍細胞と混合培養し、上清に分泌されるサイトカインについて検討を行った。

4. 研究成果

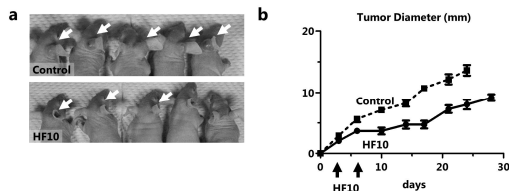
各頭頸部扁平上皮癌に HF10 を感染したところ、72 時間後には全ての細胞で MOI (ウイルス力価) 依存的な抗腫瘍効果を確認した (図 1a)。ウイルス増殖をけんとうしたところ、どの細胞においても、コントロールとして用いた Vero 細胞と遜色ないウイルス増殖効果を確認した (図 1b)。

図 1: (a) HF10 感染 72 時間後の細胞生存効果、(b) HF10 感染後のウイルス増殖。



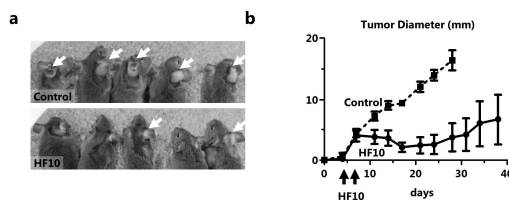
次にヒト頭頸部扁平上皮癌である FaDu を nude マウスの耳介に接種し、HF10 の抗腫瘍効果を検討した。HF10 を 2 回接種したところ、腫瘍は著明に縮小した (図 2a、図 2b)。治療中に体重減少などの明らかな副作用を認めなかった。

図 2: (a) FaDu 耳介腫瘍モデルマウスにおける、HF10 治療 7 日後のマウス、(b) 耳介腫瘍の経時的変化。



また、マウス扁平上皮癌である SCC-VII を C3H マウスの耳介に接種し、HF10 の抗腫瘍効果を検討した。HF10 を 2 回接種したところ、腫瘍は著明に縮小した (図 2c、図 2d)。同様に、治療中の体重減少などの明らかな副作用を認めなかった。

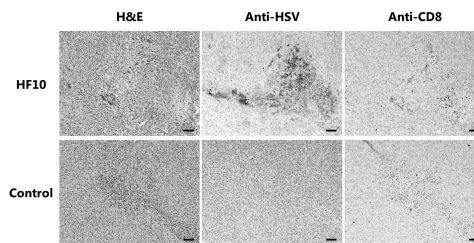
図 3: (a) SCC-VII 耳介腫瘍モデルマウスにおける、HF10 治療 7 日後のマウス、(b) 耳介腫瘍の経時的変化。



次に、上記 SCC-VII 腫瘍モデルを用いて、抗腫瘍免疫を検討した。上記の実験で腫瘍を完全拒絶したマウス 3 匹の背部皮下に SCC-VII を再度接種したところ、皮下腫瘍は形成されず、抗腫瘍免疫が誘導されたことが示唆された (data not shown)。

HF10 により変化した免疫につき検討するため、まず腫瘍内に浸潤する免疫細胞の局在について検討した。HF10 治療を行い、1 日後の腫瘍を採取し、連続切片を組織学的に検討した。HF10 治療によりネクロシスが認められ、抗 HSV 抗体陽性領域と一致した。また同部位に CD8 陽性 T 細胞が集積していたが (図 4)、CD4 陽性 T 細胞、F4/80 陽性マクロファージは認められなかった (data not shown)。異常の所見から、HF10 感染により腫瘍細胞塊が壊死したこと、CD8 陽性 T 細胞の浸潤が誘導されたことが考えられた。

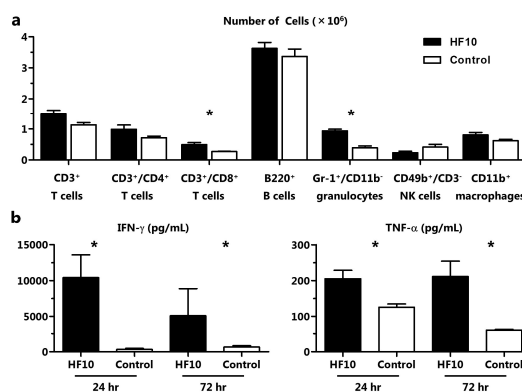
図 4: SCC-VII 腫瘍塊に HF10 を接種し、連続切片を H&E 染色、抗 HSV 抗体染色、抗 CD8 抗体染色を行い、組織学的に検討した。



腫瘍塊を組織切片作成のために採取した際に、脾臓を採取した。脾細胞を分離し、一部の脾細胞の表面抗原を染めて、フローサイトメトリーにて免疫細胞の組成を検討した。HF10 治療により CD8 陽性 T 細胞、顆粒球の有意な増加が認められた (図 5a)。また、統計的に優ては無いが、CD3 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD11b マクロファージの増加も認められた。一方、B 細胞、NK 細胞の増加は認められなかった。

残りの脾細胞を腫瘍細胞で刺激し、上清中に分泌される抗腫瘍サイトカインにつき検討した。代表的な抗腫瘍サイトカインである、刺激後 24 時間、72 時間の上清を採取し、上清中に含まれる IFN- γ 、TNF- α を ELSIA 法で検出した。腫瘍細胞で刺激すると、HF10 治療後の脾細胞から IFN- γ 、TNF- α が分泌され、その効果は 72 時間まで続くことが判明した (図 5b)。また、抗腫瘍サイトカインである IFN- α 、IFN- β についても、検討を行ったところ、上清中への分泌増加が認められた (data not shown)。

図 5: (a) 脾臓内に占める免疫細胞の組成。(b) 脾細胞を腫瘍細胞で刺激した際に上清に分泌された IFN- γ 、TNF- α 。



以上の結果から、頭頸部扁平上皮癌において、in vitro、in vivo の両面から HF10 は増殖し、抗腫瘍効果を示すことが認められた。また、SCC-VII 耳介腫瘍モデルを用いた検討により、局所、全身に占める免疫細胞の蘇生に変化を認めた。またその免疫細胞には腫瘍細胞特異的な抗腫瘍免疫が誘導されていると考えられた (現在論文投稿中)。

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

Esaki S, Goshima F, et al: Oncolytic activity of HF10, a naturally-attenuated HSV-1 for head and neck squamous cell carcinoma. 10th International Oncolytic Virus Meeting, Vancouver, Canada, 2016

Esaki S, Goshima F, et al: Oncolytic activity of HF10, a naturally-attenuated HSV-1 for head and neck squamous cell carcinoma. 4th European Seminar of Virology, Bertino, Italy, 2016

Esaki S, et al: Transient fasting enhances replication and therapeutic activity of oncolytic HSV in glioblastoma therapy. 9th International Conference on Oncolytic Virus Therapeutics, Boston, MA, USA, 2015

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

なし

○取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

江崎 伸一 (Esaki, Shinichi)

名古屋市立大学大学院・医学研究科・耳鼻咽喉・頭頸部外科・助教

研究者番号：20620983

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

五島 典 (Goshima, Fumi)

名古屋大学大学院・医学系研究科・ウイルス学・講師

研究者番号：70201499

(4)研究協力者

なし