様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ５ 月 １７ 日現在

機関番号：１３９０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ０７１６６

研究課題名（和文）遠隔転移腫瘍に対する腫瘍溶解ウイルスを用いた新規治療法の開発

研究課題名（英文）Antitumor activity of oncolytic virus for metastatic cancer

研究代表者
五島　典（Goshima, Fumi）

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：７０２０１４９９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では自然肺転移するマウス乳癌細胞株を用いて、抗腫瘍ウイルスHF10の抗腫瘍効果を検討した。まず腫瘍細胞を用いてHF10の増殖性、殺細胞性を確認したあと、マウスモデルを用いた検討を行った。両側背部に皮下腫瘍を作成し、HF10を片側の腫瘍にのみ8回接種したところ、両側の皮下腫瘍にも縮小が認められた。また自然肺転移の抑制も確認された。治療中のマウスの脾臓を採取し、腫瘍細胞で刺激したところ、抗腫瘍サイトカインであるIFN-gの分泌が認められた。以上の結果から、HF10治療により抗腫瘍免疫の誘導と転移性腫瘍の抑制効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
遠隔転移した悪性腫瘍に対する治療法は限られており、新規治療法が模索されている。我々が分離したHF10は優れた腫瘍溶解治療用ウイルスとしての特性を有し、高い安全性を示す。本研究では自然転移する乳がん細胞でマウス皮下腫瘍モデルを作製し、HF10で皮下腫瘍を治療したところ腫瘍縮小、抗腫瘍免疫の誘導と転移性腫瘍の抑制効果が認められた。
HF10は転移性乳癌の新たな治療選択肢となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Oncolytic activity of HF10 for breast cancer was investigated in this study, HF10 replicated well and killed a murine breast cancer cell line in vitro. HF10 was injected into one of the bilateral subcutaneous tumors. HF10 injection decreased both tumors, and suppressed lung metastasis. After stimulation with the cancer cells. IFN-gamma was produced from splenic cells of mice treated with HF10. From this study, HF10 treatment induced antitumoral immunity, and suppressed metastatic lung tumor.

研究分野：ウイルス学

キーワード：抗腫瘍ウイルス　HSV　HF10　アンプリコン　乳癌　転移性腫瘍

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９、ＣＫ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

（１）腫瘍溶解ウイルス療法

癌の治療にウイルスを利用するという研究は 1950 年代より行われてきた。その後ウイルスの安全性の問題や、他の抗腫瘍療法の開発により一旦下火になったが、近年のウイルスの機能解析と遺伝子工学技術の進歩により、ウイルスの正常組織に対する病原性を排除し、癌細胞特異的に増殖し、破壊するような治療が可能になってきた。このような治療法は「腫瘍溶解ウイルス療法」と呼ばれ、現在、様々なウイルスが前臨床的研究、臨床治験に用いられるようになっている。

（２）腫瘍溶解ウイルス HF10

我々の研究室は単純ヘルペスウイルス１型自然発生型弱毒株 HF から HF10 をクローニングした。HF10 は癌細胞を含む多くの培養細胞において極めてよい増殖性を示すが、末梢からの神経侵襲性が減弱しているウイルスである。その後のゲノム解析の結果、UL 領域の両端に大きな欠損があり、UL56、LAT (Latency-associated transcripts) の欠失を有すると共に、N 末端領域での frame-shift 変異により UL43、UL49.5、UL55 の発現欠損を持つことが判明した。

HF10 を様々な癌細胞（悪性黒色腫、頭頸部扁平上皮癌、大腸癌、乳癌、膵臓癌、膀胱癌、卵巣癌、繊維肉腫等）に感染させて、HF10 の抗腫瘍効果を *in vitro*、*in vivo* の両面から検討してきた。HF10 は優れた抗腫瘍作用と共に高い安全性を示したため、その結果を踏まえて、名古屋大学で転移性乳癌、頭頚部癌症例を使用した臨床治験を行い、現在米国、日本で悪性黒色腫を対象とした臨床試験が行われている。

（３）乳癌と遠隔転移

乳癌は乳房組織に発生した癌であり、女性の 10%弱が生涯に罹患すると報告されている。小葉癌、乳管癌に分類され、後者が大半を示す。定期検診の普及により早期にみつかることが多くなってきたが、進行癌で発見されることも少なくはない。乳癌は比較的転移しやすい癌であり、進行癌となると所属リンパ節や皮膚などへの局所転移だけでなく、肺、骨、肝臓、脳などへの遠隔転移も認められることもある。

（４）IL-2 搭載 HSV アンプリコンベクター

HSV-1 由来のアンプリコンベクターは、HSV-1 と同じ envelope をもつため HSV-1 と同様に様々な細胞に感染し、効率よく遺伝子導入できる。今回マウス IL2 遺伝子を導入したアンプリコンベクターを作成した。アンプリコンベクター内には、IL2 遺伝子を含むアンプリコンプラスミドが HSV-1 ゲノム長相当になるまで繰り返し入っているため、遺伝子導入された細胞から複数の IL2 の分泌が期待できる。HF10 をヘルパーウイルスとして作成した IL2 搭載アンプリコンベクター (以下 IL2 アンプリコンと称する) により抗腫瘍効果が増強されるか検討した。

２．研究の目的

腫瘍溶解ウイルス療法は感染させた腫瘍塊への抗腫瘍作用を期待した治療法であるが、その後の研究により、ウイルスを接種していない腫瘍へも抗腫瘍効果も認められることが判明してきた。本研究では、抗腫瘍ウイルス HF10 の乳癌への抗腫瘍効果を検討とするとともに転移性腫瘍に対する効果を検討した。乳癌は比較的転移しやすい癌であるため、自然肺転移するマウス乳癌細胞株を使用した。皮下腫瘍、自然肺転移巣への HF10 の抗腫瘍効果を検討し、治療により誘導された抗腫瘍免疫についても検討を行った。

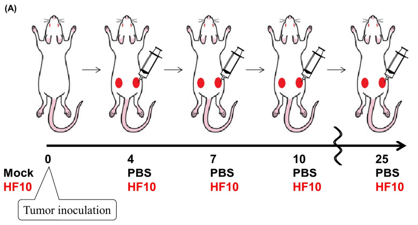
３．研究の方法

（１）in vitro における HF10 の抗腫瘍効果と増殖能

Balb/c マウス乳癌細胞株 4T1-luc (以下 4T1) を使用し、HF10 の in vitro における抗腫瘍効果を検討した。HF10 を 96 well plate に播き、翌日に HF10 を様々な MOI で感染させた。経時的に MTS assay で測定することにより HF10 の殺細胞作用を検討した。また 6 well plate に HF10 を MOI (感染多重度) 3/0.03 で感染させ、経時的に上清を回収した。Vero 細胞を用いて plaque assay を行い、HF10 の増殖能につき検討した。

（２）in vivo における HF10 の抗腫瘍効果

4T1 を Balb/c マウス皮下に接種して皮下腫瘍を作成し、HF10 もしくはコントロールとして PBS を週 2 回、計 8 回接種した。経時的に腫瘍径と体重を測定した。次に IL2 アンプリコンを同様のスケジュールで腫瘍内に接種し、腫瘍成長の抑制効果を比較検討した。



また、マウスを 15 日目、25 日目、35 日目に D-ルシフェリンを腹腔内に接種した。腹腔麻酔して in vivo imager で撮影することにより、皮下腫瘍の経時的な変化と肺への転移能の有無につき検討した。

（３）HF10 治療後の抗腫瘍免疫

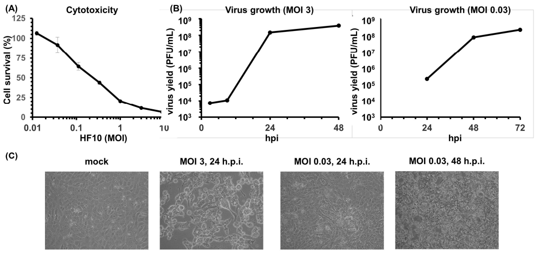
上記プロトコールで治療を行い、15 日目（4 回目の接種から 24 時間後）にマウスを麻酔して脾臓を摘出した。脾細胞を分離し、4T1 細胞と共培養した。24 時間に上清を回収し、抗腫瘍サイトカインである IFN-γを ELISA 法で測定した。

また、共培養の上清中に抗 CD4/8 中和抗体を入れて同様の assay を行うことにより、CD4 陽性、CD8 陽性細胞の寄与につき検討した。

４．研究成果

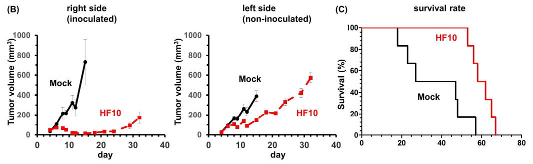
（１）*in vitro* における抗腫瘍効果と増殖能

HF10 を感染した 72 時間後に MTS assay を行ったところ、MOI 依存性に抗腫瘍効果を認めた。高い MOI で HF10 を感染させたところ、24 時間でほとんどの細胞で細胞変性効果（CPE）とウイルス増殖を認めた。低い MOI で感染させても、48 時間でほとんどの細胞で細胞変性効果（CPE）とウイルス増殖を認めた。



（２）両側皮下腫瘍モデルマウスを用いた抗腫瘍効果

HF10 治療による体重減少や副作用は認めなかった。HF10 を接種した右側の皮下腫瘍の大きさを検討したところ HF10 接種により有意な腫瘍の縮小効果を認めた。また HF10 を接種していない左側の皮下腫瘍へも有意な腫瘍の縮小効果を認めた。また、マウスの生存の延長にも寄与した。

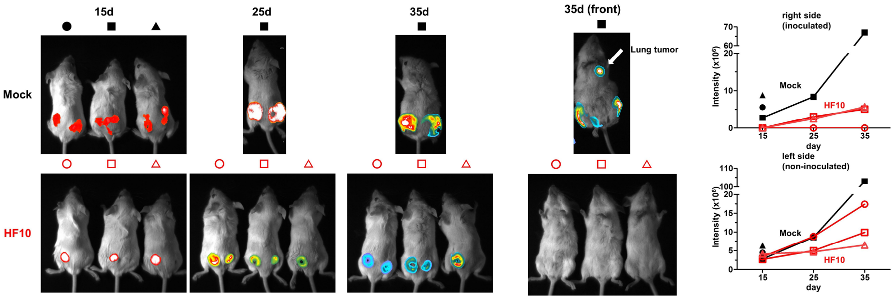


IL2 アンプリコンを同様に接種した。コントロール群より有意な腫瘍抑制効果認めたが、HF10 と比して有意な腫瘍抑制効果は認めなかった。

（３）皮下腫瘍、肺転移巣の計測

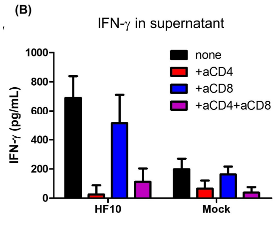
15 日、25 日、35 日目に D-ルシフェリンを腹腔内に *in vivo* imager で皮下腫瘍を撮影した。15 日目は HF10 を接種した右側では皮下腫瘍からの発光は認められず、接種した腫瘍への抗腫瘍効果が認められた。25 日目になると HF10 治療による両側皮下腫瘍への縮小効果が認められた。35 日目にも両側皮下腫瘍への抗腫瘍効果が認められた。

経時的に腹臥位で撮影したところ、35 日目になると偽治療群のみで肺転移巣と思われる発光が認められた。



（４）治療後に誘導された抗腫瘍効果

マウス脾細胞を 4T1 で刺激し、上清中の上清中の IFN-γを測定したところ、HF10 治療後のマウスで IFN-γの分泌が増多していた。この IFN-γの分泌は抗 CD4 中和抗体の追加により抑制され、この抗腫瘍免疫には CD4 陽性 T 細胞が重要な役割を示していることが示唆された。



５．主な発表論文等
〔雑誌論文〕（計 5 件）

(1) Okuno Y, Murata T, Sato Y, Muramatsu H, Ito Y, Watanabe T, Okuno T, Murakami N, Yoshida K, Sawada A, Inoue M, Kawa K, Seto M, Ohshima K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Narita Y, Yoshida M, Goshima F, Kawada JI, Nishida T, Kiyoi H, Kato S, Nakamura S, Morishima S, Yoshikawa T, Fujiwara S, Shimizu N, Isobe Y, Noguchi M, Kikuta A, Iwatsuki K, Takahashi Y, Kojima S, Ogawa S, Kimura H.
Defective Epstein-Barr virus in chronic active infection and haematological malignancy.
***Nat Microbiol.* 2019. 4(3) :404-413. [doi: 10.1038/s41564-018-0334-0.] 査読有り**

(2) Ichikawa T, Okuno Y, Sato Y, Goshima F, Yoshiyama H, Kanda T, Kimura H, Murata T.
Regulation of Epstein-Barr Virus Life Cycle and Cell Proliferation by Histone H3K27 Methyltransferase EZH2 in Akata Cells.
***mSphere.* 2018 3(6). pii: e00478-18. [doi: 10.1128/mSphere.00478-18.] 査読有り**

(3) Masud HMAA, Watanabe T, Yoshida M, Sato Y, Goshima F, Kimura H, Murata T.
Epstein-Barr Virus BKRF4 Gene Product Is Required for Efficient Progeny Production.
J Virol. 2017. 91(23). pii: e00975-17. [doi: 10.1128/JVI.00975-17.] 査読有り

(4) Tanaka R, Goshima F, Esaki S, Sato Y, Murata T, Nishiyama Y, Watanabe D, Kimura H.
The efficacy of combination therapy with oncolytic herpes simplex virus HF10 and dacarbazine in a mouse melanoma model.
***Am J Cancer Res.* 2017. 7(8):1693-1703. 査読有り**

(5) Sato Y, Ochiai S, Murata T, Kanda T, Goshima F, Kimura H.
Elimination of LMP1-expressing cells from a monolayer of gastric cancer AGS cells.
***Oncotarget.* 2017. 8(24):39345-39355. [doi: 10.18632/oncotarget.16996.] 査読有り**

〔学会発表〕（計 7 件）

(1) 五島典, 江崎伸一ら. Antitumor effect of oncolytic HSV1 HF10 for metastaic brest cancer. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 2018 年.

(2) 五島典, 江崎伸一ら. Oncolytic effect of HF10 for breast cancer lung metastasis. 第 77 回日本癌学会学術総会. 2018 年.

(3)江崎伸一, 五島典ら. Oncolytic activity of HF10 for head and neck squamous cell carcinomas. 第 77 回日本癌学会学術総会. 2018 年.

(4) 五島典, 江崎伸一ら. Antitumor effect of the HSV1 HF10 for metastatic cancer. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 2017 年.

(5) 五島典, 江崎伸一ら. In vivo study of the antitumor effect of the IL2-HSV amplicon vector. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 2016 年.

(6) Goshima F, Esaki S. et al: Combination therapy with oncolytic HSV HF10 and dacarbazine for malignant melanoma. 10th International Meeting on Replicating Oncolytic Virus Therapeutics. 2016.

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

〔図書〕（計 1 件）

(1) Watanabe D, Goshima F.
Oncolytic Virotherapy by HSV.
***Adv Exp Med Biol.* 2018; 1045:63-84. [doi: 10.1007/978-981-10-7230-7_4.]**

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）
○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織

(1) 研究分担者

江崎　伸一（ESAKI, Shinichi）
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：20620983

木村　宏（KIMURA, Hiroshi）
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30303621

渡邊　大輔（WATANABE, Daisuke）
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：40324404
（2018 年 3 月 31 日まで）

(2) 研究協力者

高野　学　（TAKANO, Gaku）
名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床研究医
研究者番号：00812744
（2018 年 4 月 1 日から）

※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。