

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11696

研究課題名(和文) 口腔癌に対するウイルス療法の開発-免疫チェックポイント阻害薬との併用療法-

研究課題名(英文) Oncolytic virus therapy for Oral cancer.

研究代表者

中原 寛和 (Nakahara, Hirokazu)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：70324796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌は手術を中心とした治療が行われているが、手術による機能障害を避け得る新しい治療法の出現が期待されている。近年、癌細胞で選択的に複製するウイルスを癌治療に応用され、単純ヘルペスウイルスⅠ型(HSV-1)は癌治療に適した特徴を有することがわかってきた。第三世代遺伝子組換えHSV-1(G47)は、研究分担者藤堂具紀(東大医科研)によって開発された抗腫瘍ウイルスで、高い安全性を維持しつつ、癌細胞におけるウイルス複製能と惹起される抗腫瘍免疫が増強し、強い抗腫瘍効果を発揮した。本研究はこのG47を用いたウイルス療法を口腔癌の治療の導入するための研究である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌は全癌の5%程度を占めており、手術を中心とした集学的治療が行われており治療の可能な癌の一つになってきた。しかし口腔癌は呼吸、咀嚼・嚥下、発声、構音などの生活上で重要な機能が集中した部位であり、手術による機能障害は大きなQOLの低下をもたらすため、手術による機能障害を避け得る、新しい治療法の出現が待望されている。本研究の第三世代遺伝子組換えHSV-1(G47)が臨床応用されれば、侵襲の少ない口腔癌治療の実現が可能となり、社会的意義も絶大であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although oral cancer is mainly treated by surgery, the emergence of a new treatment method that can avoid functional disorders due to surgery is expected. Recently, a virus that selectively replicates in cancer cells has been applied to cancer treatment, and it has been found that herpes simplex virus type 1 (HSV-1) has characteristics suitable for cancer treatment. The third-generation recombinant HSV-1 (G47) is an anti-tumor virus developed by research contributor Tomoki Todo (University of Tokyo Medical Science). Anti-tumor immunity was enhanced, and a strong anti-tumor effect was exhibited. This report is a study to introduce the viral therapy using G47 for the treatment of oral cancer.

研究分野：歯科口腔外科

キーワード：口腔癌 ウイルス療法 単純ヘルペスウイルス 免疫チェックポイント阻害剤

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔癌は全癌の数%程度を占めており、手術を中心とした集学的治療が行われており治療の可能な癌の一つになってきた。しかしながら、口腔癌は呼吸、咀嚼・嚥下、発声、構音などの生活上で重要な機能が集中した部位で手術による機能障害は大きな QOL の低下をもたらす。そこで手術による機能障害を避け得る、新しい治療法の出現が待望されてきた。本研究では治療用ウイルスを口腔癌に適用し、その実用化に向けた、基礎実験および臨床実験を研究目的としている。

### 2. 研究の目的

口腔癌は呼吸、咀嚼・嚥下、発声、構音などの生活上で重要な機能が集中した部位で手術による機能障害は大きな QOL の低下をもたらす。そこで手術による機能障害を避け得る、新しい治療法の出現が待望されている。本研究では脳腫瘍において、難治性のがんに対して、安全でかつ強い抗腫瘍効果の確認できた単純ヘルペスウイルス 1 型を用い、口腔扁平上皮癌の治療に応用しうるかの検討を行い、さらに口腔扁平上皮癌特異的に効果を発揮し得る、がん治療用ウイルスの開発と作製を行う。さらに本研究では免疫チェックポイント阻害剤を併用した場合、いかなる時期に併用することが、適切なのかを検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 口腔癌に対するウイルス療法の基礎実験

##### ① 培養細胞

アフリカミドリザル腎細胞株 Vero、ヒト培養扁平上皮癌細胞とし TSU, HOC313、OSC-19、SC-20、SAS、HSC-3、OSC-4、ヒト肺扁平上皮癌細胞 EBC-1RCRF-LC-Sq 1、ヒト食道扁平上皮癌細胞 KYSE220、ヒト子宮扁平上皮癌細胞 HCS-2 (papilloma virus)、マウス扁平上皮癌細胞 KLN205、KLN205-MUC1 (American Type Culture Collection (ATCC)より購入)を用いた。すべての細胞は添付文書により推奨された培地、凍結、継代、維持を行った。

##### GFP 導入培養細胞

ヒト培養扁平上皮癌細胞 OSC-19 および SAS 細胞に Retro-XTM ベクターを用いて、GFP (Green fluorescent protein) を導入し、GFP 発現ヒト培養扁平上皮癌細胞 OSC-19-GFP、SAS-GFP を作製した。培養は親株と同様の培地、凍結、継代、維持を行った。

##### ウイルス複製能

6 ウエルプレートに Vero 細胞を  $4.0 \times 10^5$ /2ml まき、37 °C で 16 時間培養した。1%熱非働化 FBS 添加 DPBS にて作製したウイルスを希釈し、multiplicity of infection (MOI) 0.02 ( $8.0 \times 10^3$  PFU/0.7ml) のウイルス希釈液を作成した。1%熱非働化 FBS 添加 DPBS 1 ml にてウエルを洗浄して除き、ウイルス希釈液を 0.7ml/ウエルにて 1 株につき 3 ウエルずつ感染し、室温で 5 分間震盪し、37 °C で 1 時間培養した。ウイルス液を除き、1%熱非働化 FBS 添加 DMEM を 2ml/ウエル加え、34.5 °C で 72 時間培養した。ウエルごとに培地と細胞を回収し、ドライアイス・エタノールにて凍結、融解を 3 回繰り返し、2 分間超音波による細胞破碎処理を行い、タイタ を測定した。タイタ 測定は回収されたウエルごとに 3 枚のプレート、各 2 ウエルずつをカウントして行い各株の平均を出した。

##### ウイルス感染能 (entry assay)

24 ウエルプレートに細胞  $5.0 \times 10^4$ /500  $\mu$ l/ウエルでまき、37 °C で 16 時間培養した。1%熱非働化 FBS 添加 DPBS にて作製したウイルスを希釈し、multiplicity of infection (MOI) 1.0 で感染させる。感染後 6 時間で感染をストップさせて、X-gal 染色を行い、ウイルスの感染効率を測定した。

##### In vitro におけるウイルスペクタ の殺細胞効果

各ウイルスの殺細胞効果について、in vitro においては以下のように評価した。細胞間、ウイルス間で比較することができるよう、ウイルス量、感染時間、培養時間などは全て同一条件で行った。6 ウエルプレートに細胞を  $2.0 \times 10^5$ /2ml まき、37 °C で 16 時間培養した。16 時間後に作製したプレートのうち 1 枚を使用してトリプシン処理にて細胞をはがし、細胞数を測定した。6 ウエルの平均細胞数をもとに、1%熱非稼働 FBS 添加 DPBS もて MOI 1.0、0.1 または 0.1、0.01 の 2 段階のウイルス希釈系列を作製した。1%熱非稼働化 FBS 添加 DPBS 1 ml にて各ウエルを洗浄して除き、ウイルス希釈液を 0.7ml/ウエルにて各濃度 3 ウエルずつ感染し、室温で 5 分間震盪し、37 °C で 1 時間培養した。ウイルス液を除き、1%熱非稼働化 FBS 添加 DMEM を 2ml/ウエル加え、34.5 °C で培養した。24 時間ごと 4 日間にわたり生存する細胞数を測定し、mock 感染群における生存細胞数対する、パーセント表示で評価した。細胞数の測定は Coulter counter (Beckman Coulter, CA, USA) にて行った。なお、ヒト由来細胞株には MOI 1.0 および 0.1 を感染して行った。

##### 動物実験

5-6 週の BALB/c nu/nu 雌マウス (ヌードマウス) を使用した。マウスは三協ラボサービスから購入し、specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育した。動物実験は「動物愛護及び管理に関する法律」を遵守し、東京大学バイオサイエンス委員会による東京大学動物実験実施マニュアルに従って行った。なお、動物実験使用するウイルスの希釈には全て 10%グリセロール添加 PBS を使用した。

#### 皮下腫瘍モデルの作製

マウスの左側腹部に、25G 針を使用して、DMEM 溶液 50  $\mu$ l/マウスにて希釈した細胞を皮下注射し、皮下腫瘍を作製した。ヒト扁平上皮癌細胞を使用した実験ではヌードマウスに細胞数  $1.0 \times 10^7$  個/50  $\mu$ l/匹を、それぞれ皮下注射して皮下腫瘍を作製した。最大腫瘍径が 5mm 大になったときを day0 として実験を行った。週に 3 回腫瘍を測定し、最大径  $\times$  短径  $\times$  厚み ( $\text{mm}^3$ ) で腫瘍体積を算出して評価した。または生存期間を観察して評価した。片側の皮下腫瘍モデルにおいては腫瘍の最大径が 24 mm に達したとき安楽死させた。

#### 皮下腫瘍モデルにおけるウイルスの腫瘍内投与実験

最大腫瘍径が 5 mm になったときを day0 として、10%グリセロール添加 PBS 溶液 20  $\mu$ l/マウスでウイルスを希釈して、30G 針を用いて day0 および day3 に腫瘍内投与した。

舌投与頸部リンパ節モデルの作製と頸部リンパ節転移モデルにおけるウイルスの静脈内投与実験

BALB/c nu/nu 雌マウス(ヌードマウス)の舌に 30G 針を使用して PBS で希釈した SAS 細胞  $2.0 \times 10^5$  個/50  $\mu$ l/匹 を舌に投与した。細胞を舌に投与した日を day0 として実験を行った。ウイルスの投与実験では、10%グリセロール添加 PBS 溶液 20  $\mu$ l/マウスでウイルスを希釈して、30G 針を用いて day 1、3、5 に局所投与した。頸部リンパ節の転移数を評価する検討においては、GFP の発現によって評価した。

#### 統計学的解析

統計学的解析はスチューデント t 検定および生存期間の解析については Kaplan-Meier 法にて生存曲線を描き、Log-rank 検定を行った。統計解析ソフトはエクセル統計 2012 (SSRI) を用いた。

#### 4. 研究成果

ヒト培養扁平上皮癌細胞とし TSU、HOC313、OSC-19、SC-20、SAS、HSC-3、OSC-4 の G47 ウイルスの殺細胞効果、ウイルス複製能、ウイルス感染効果を検討した結果、殺細胞効果があり、複製能が高く、感染効率 (entry assay) の良好な OSC-19、SAS、HSC-3 を以下の実験に使用した。G47 の扁平上皮癌細胞のヌードマウス皮下モデルでの結果は in vivo においても G47 は十分な殺細胞効果が認められた。同様の効果は OSC-19 細胞でも得られた(結果省略)。さらに GFP を導入した OSC-19-GFP、SAS-GFP において舌に投与し、頸下リンパ節に転移するかを検討したところ、両細胞とも、有意に頸下リンパ節への転移を GFP 発現によって確認できた。G47 の扁平上皮癌細胞 OSC-19 のヌードマウス舌腫瘍モデルでの結果は in vivo においても G47 は十分な殺細胞効果が認められた。

しかしながら、免疫チェックポイント阻害剤の in vivo の結果はネガティブデータが得られた。今後の実験としては免疫チェックポイント PD-1 抗体のロット変更等にて対応し、継続的に研究を継続する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Iwata Eiji, Hasegawa Takumi, Yamada Shin-ichi, Kawashita Yumiko, Yoshimatsu Masako, Mizutani Tomomi, Nakahara Hirokazu, Mori Kazuyo, Shibuya Yasuyuki, Kurita Hiroshi, Komori Takahide	4. 巻 18
2. 論文標題 Effects of perioperative oral care on prevention of postoperative pneumonia after lung resection: Multicenter retrospective study with propensity score matching analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 30840
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.surg.2018.11.020">https://doi.org/10.1016/j.surg.2018.11.020</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashida Saki, Soutome Sakiko, Yanamoto Souichi, Fujita Shigeyuki, Hasegawa Takumi, Komori Takahide, Kojima Yuka, Miyamoto Hironori, Shibuya Yasuyuki, Ueda Nobuhiro, Kirita Tadaaki, Nakahara Hirokazu, Shinohara Mitsuyo, Umeda Masahiro	4. 巻 32
2. 論文標題 Evaluation of the Treatment Strategies for Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws (MRONJ) and the Factors Affecting Treatment Outcome: A Multicenter Retrospective Study with Propensity Score Matching Analysis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 2022 ~ 2029
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbmr.3191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Soutome Sakiko, Yanamoto Souichi, Funahara Madoka, Hasegawa Takumi, Komori Takahide, Yamada Shin-ichi, Kurita Hiroshi, Yamauchi Chika, Shibuya Yasuyuki, Kojima Yuka, Nakahara Hirokazu, Oho Takahiko, Umeda Masahiro	4. 巻 96
2. 論文標題 Effect of perioperative oral care on prevention of postoperative pneumonia associated with esophageal cancer surgery	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 medicine	6. 最初と最後の頁 e7436 ~ e7436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MD.00000000000007436	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura, Y., Togashi, Y., Nakahara, H., Tomida, S., Banno, E., Terashima, M., Hayashi, H., de Velasco, MA., Sakai, K., Fujita, Y., Okegawa, T., Nutahara, K., Nishio, K.	4. 巻 163
2. 論文標題 Afatinib against Esophageal or Head-and-Neck Squamous Cell Carcinoma: Significance of Activating Oncogenic HER4 Mutations in HNSCC.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Mol Cancer Ther.	6. 最初と最後の頁 1988-1997
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1535-7163.MCT-15-0737	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 保富貴裕、正元洋介、毛利佐与子、山本真子、泉田美雪、大谷朋弘、中原寛和
2. 発表標題 当院における癌患者の周術期口腔機能管理の現状
3. 学会等名 日本口腔ケア学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 泉田美雪、毛利佐与子、山本真子、廣石幸恵、中原寛和
2. 発表標題 当科における周術期口腔機能管理
3. 学会等名 日本口腔ケア学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 廣石幸恵、中原寛和
2. 発表標題 大阪市立大学医学部附属病院・歯科口腔外科における
3. 学会等名 日本口腔腫瘍学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 廣石幸恵、中原寛和
2. 発表標題 大阪市立大学医学部附属病院・歯科口腔外科における周術期口腔機能管理の現状
3. 学会等名 日本口腔腫瘍学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	古郷 幹彦  (kogo Mikihiro)  (20205371)	大阪大学・歯学研究科・教授   (14401)	
研究分担者	内橋 俊大  (Uchihashi Toshihiro)  (60757839)	大阪大学・歯学部附属病院・医員   (14401)	
研究分担者	藤堂 具紀  (Todo Tomoki)  (80272566)	東京大学・医科学研究所・教授   (12601)	