

令和 2 年 12 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15611

研究課題名（和文）革新的な腫瘍抗原ウイルスとTCR遺伝子改変T細胞の併用療法の開発

研究課題名（英文）Development of innovative combination therapy of tumor antigen virus and TCR gene-modified T cells

研究代表者

粕谷 英樹（KASUYA, Hideki）

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00402636

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、癌特異的抗原を発現するように遺伝子改変した腫瘍溶解性ウイルスHF10とウイルスが産生する癌抗原を認識するTCR遺伝子改変T細胞の組み合わせによる新規治療法の開発を目的とした。癌抗原発現細胞の樹立やT細胞の殺細胞効果の確認など着実に研究の準備を進めた。ウイルスの遺伝子組み換えにおける新たなゲノム編集技術の有用性を検討したところ、相同組換え効率の向上と遺伝子改変ウイルスの純化に非常に適した技術であることが分かった。今後は、この技術を用いて癌抗原遺伝子導入HF10の開発を進め、抗原特異的TCR遺伝子改変T細胞との併用療法の基礎データを蓄積し、臨床応用の可能性を探る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍溶解性ウイルス療法は感染を拡大させながら大量の癌細胞を殺傷し、腫瘍抗原に対する免疫抑制環境を改善することにより、腫瘍抗原特異的な免疫を誘導する。その後の抗腫瘍効果はIn situ Vaccinationとしての抗腫瘍特異的免疫によると考えている。抗腫瘍免疫反応を高めるため、我々は腫瘍抗原遺伝子をHF10に導入し、ウイルスに導入した腫瘍抗原が通常含有量よりも大量に腫瘍内に発現する事を利用して、腫瘍抗原に対してウイルス抗原と同じ強い免疫反応を引き起こし、MUC-HF10によって免疫抑制環境が改善する事と相まって遺伝子改変T細胞療法のターゲットへの精確性、効率性を高める点に新たな着想がある。

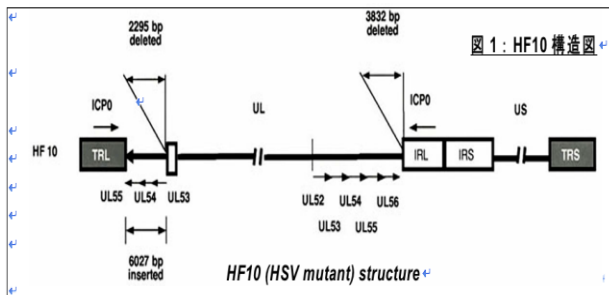
研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the possibility of novel therapeutic approach for cancer based on the combination of transgenic HF10, the oncolytic herpes simplex virus that genetically modified to express cancer-specific antigen, and TCR gene-modified T cells recognizing cancer antigen produced from transgenic HF10. We steadily advanced the preparation of research by establishing the cancer antigen-expressing cells and confirming the cell-killing effect of T cells. We examined the usefulness of novel genomic editing technology for homologous recombination efficiency, and found that novel genomic editing is a very suitable technique for improvement of homologous recombination and purification of genetically modified virus. In the future, we will advance the development of cancer antigen gene-carrying HF10 using this technology, accumulate basic data on combination therapy with antigen specific TCR gene-modified T cells, and explore the possibility of clinical application.

研究分野：消化器外科学

キーワード：HF10 癌 免疫細胞療法 癌抗原

1. 研究開始当初の背景

腫瘍溶解性ウイルス HF10 は自然変異型単純ヘルペスウイルス(HSV)であり、腫瘍のみに感染し破壊する(図1)。HF10の抗腫瘍効果はウイルスの感染増殖による直接的な癌細胞の破壊だけでなく、宿主免疫の腫瘍抗原に対する認識を明確にし、免疫関連細胞を腫瘍組織に誘導する癌免疫療法としての側面を有している。一方、免疫細胞療法は、TCR 改変リンパ球療法が腫瘍抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注による急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群に対する臨床研究が開始されており、血液悪性腫瘍に対して実用化が進んでいる領域である。ところが、これまでの TCR 遺伝子改変 T 細胞療法は体内へ投与した TCR 遺伝子改変 T 細胞の機能が腫瘍内で経時的に弱まる点や腫瘍抗原を少量保有する正常組織に障害を起こすという様な問題点があった。



2. 研究の目的

本研究は、腫瘍溶解性ウイルス療法と免疫細胞療法の併用により、癌治療の効果を相補的に高めるための研究である。具体的には、ターゲットとする癌腫に特異的な抗原ペプチドを発現する遺伝子をゲノム内に組み込んだ腫瘍溶解性ウイルス HF10 を作成し腫瘍に感染させ、癌細胞自体の微弱な抗原性を増強させる。さらにその癌特異的抗原ペプチドに反応する遺伝子改変リンパ球を静脈輸注する事により、腫瘍溶解性ウイルスと免疫細胞療法との革新的異分野併用癌治療法の新規技術開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) HF10 ゲノムの UL 遺伝子特定領域はフレームシフト変異のため機能していないことから、この遺伝子座に癌抗原遺伝子を導入することを計画した。癌抗原遺伝子は CMV プロモーターにより発現を制御し、IRES を介して蛍光色も発現するようにした。CMV promoter derived 外来遺伝子カセットの両端に各 500 塩基ずつ UL 遺伝子特定領域と同じ塩基配列を配したプラスミドを構築した。

(2) 相同組み換え効率の向上のために新ゲノム編集技術の有用性を検討した。UL 遺伝子の特定領域配列に対するガイド RNA とタンパク質のリボ核タンパク質複合体 (RNP complex) を HF10 ゲノム DNA に加え、37°C で一晩インキュベートし In vitro で HF10 ゲノム DNA の切断を行った。切断部位を挟むプライマーを用いて PCR を行い UL 遺伝子特定領域の切断の有無を確認した。また、RNP complex で処理した HF10 ゲノム DNA を Vero 細胞にトランスフェクションし、細胞変性効果を検出することでウイルス産生の有無を調べた。

ム DNA の切断を行った。切断部位を挟むプライマーを用いて PCR を行い UL 遺伝子特定領域の切断の有無を確認した。また、RNP complex で処理した HF10 ゲノム DNA を Vero 細胞にトランスフェクションし、細胞変性効果を検出することでウイルス産生の有無を調べた。

(3) マウス膀胱癌細胞株 PAN02 及びマウス悪性黒色腫細胞株 B16 に pCI-neo-cOVA をトランスフェクションし、24 時間後 500ug/mL G418 を加えて培養し、増殖した細胞を単離して OVA を安定発現する PAN02/OVA 及び B16/OVA を樹立した。受理した細胞株の OVA 発現をフローサイトメトリーにて確認した。

(4) OT-1 マウスの脾臓から CD8 陽性 T 細胞を採取し、SIINFEKL ペプチド (ovalbumin 抗原) と IL-2 で刺激し、ovalbumin 抗原特異的な CTL を誘導した OT-1 T 細胞を得た。B16/OVA 細胞に OT-1 T 細胞を E/T ratio を変えて添加し、培養 2 日後に MTT assay を行ない OT-1 T 細胞の殺細胞効果を調べた。

4. 研究成果

(1) CMV プロモーターにより癌抗原遺伝子発現を制御し、IRES を介して蛍光遺伝子も発現するようにした外来遺伝子カセットの両端に UL 遺伝子特定領域と同じ塩基配列を配したカセットベクターを構築した。このカセットベクターに組み込む外来遺伝子として、複数の癌抗原遺伝子に加え数種のサイトカイン遺伝子も計画し、そのすべてのカセットベクターの構築を完了した(図2)。

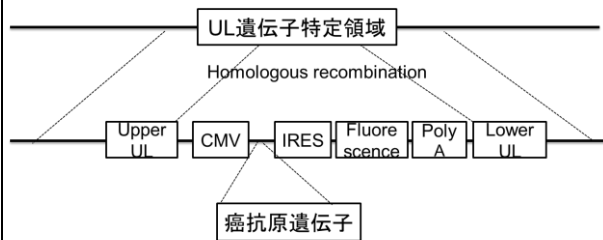


図2 構築したカセットベクター

(2) 上記のカセットベクターを HF10 ゲノム DNA と共に Vero 細胞にトランスフェクションし、相同組換えにより外来遺伝子を UL 遺伝子特定領域に組み込む。しかし、従来のウイルスゲノム DNA と外来遺伝子との相同組換え法では効率が低いという報告がある。そこで、相同組み換え効率の向上のために新たなゲノム編集技術の有用性を検討した。RNP complex を用いて In vitro で HF10 ゲノムの切断を行い、PCR により UL 遺伝子特定領域の検出を行ったところ、UL 遺伝子特定領域を確かに切断する事が確認された(図3)。

また、RNP complex を作用させた HF10 ゲノム DNA を Vero 細胞にトランスフェクションして

も細胞変性効果が見られない事を確認した(図4)。このことから、新たなゲノム編集技術の作用により HF10 ゲノムが切断され、子孫ウイルス産生が生じなくなったことが示唆された。

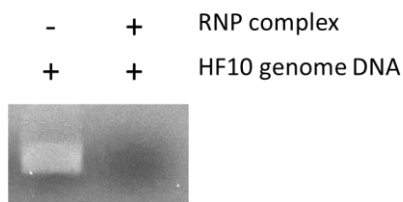


図3 RNP complexによるIn vitro切断

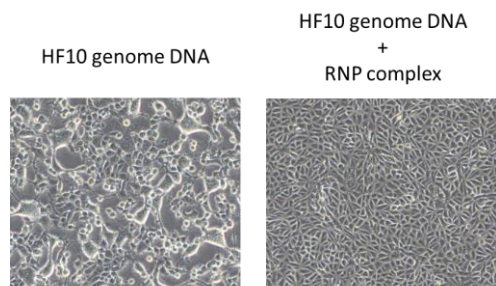


図4 トランスフェクション後の細胞変性効果

(3) 上記の結果を受け、HF10 ゲノム及びカセットベクターと共に RNP complex プラスミドベクターを Vero 細胞にトランスフェクションし新たなゲノム編集により HF10 ゲノムへ外来遺伝子を導入する計画を立て、現在、組換えウイルス作製のための遺伝子組み換え実験大臣確認申請の手続き中である。遺伝子組換えウイルスの作製が可能となるまで、癌抗原を発現した腫瘍に対する TCR 遺伝子改変 T 細胞の殺細胞効果を確認するため、OT-1 T 細胞のターゲットとなる OVA を発現する PAN02 細胞 (PAN02/OVA) 及び B16 細胞 (B16/OVA) を樹立した。樹立したクローンはフローサイトメトリーにより OVA の発現を確認することができた (図5)。

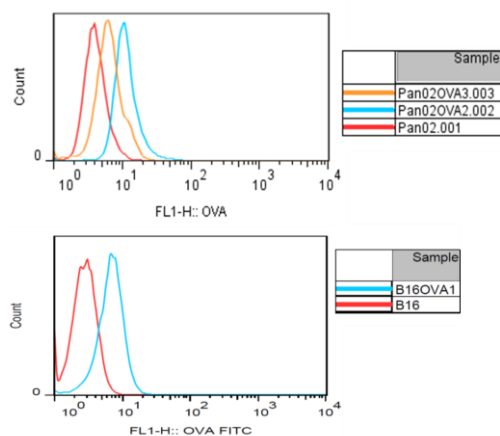


図5 樹立した細胞のOVA発現確認

(4) In vitro における OVA 発現細胞 (B16/OVA) に対する OT-1 T 細胞の殺細胞効果を検討したところ、OT-1 T 細胞は量依存的に殺細胞効果を示した (図6)。

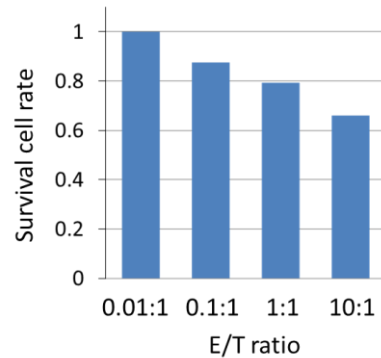


図6 OT-1 T細胞の殺細胞効果

考察) 新たなゲノム編集技術を用いることで UL 遺伝子特定領域部位を特異的に切断し相同組換え効率を向上させることが期待できる。また、HF10 ゲノム DNA を RNP complex で処理することにより、親株 HF10 を除去することが可能であり、新たなゲノム編集技術が遺伝子改変ウイルスの純化にも有用であることが明らかとなった。遺伝子組み換え実験大臣確認申請の承認後は、この技術を用いて癌抗原遺伝子導入 HF10 の開発を進める。また、模擬的な癌抗原として OVA を発現するウイルス (HF10-OVA) と OT-1 T 細胞との併用実験を計画しており、その前段階として OVA 発現細胞を樹立し、OVA 発現細胞への OT-1 T 細胞の殺細胞効果を確認することができた。今後さらに、上記の併用実験に加え他の癌抗原遺伝子導入 HF10 と抗原特異的 TCR 遺伝子改変 T 細胞との併用効果を検討していく。

本研究では、癌抗原発現 HF10 の感染により IL-12 や TNF- α を分泌するマクロファージが癌微小環境にリクルートされる事により、癌免疫抑制環境が改善され、癌抗原特異的 TCR 遺伝子改変 T 細胞が癌抗原発現 HF10 の感染した腫瘍に強く浸潤し、体内の T 細胞の機能も長く維持される事が期待される。また、腫瘍内で HF10 により発現する癌抗原が、TCR 遺伝子改変 T 細胞にターゲットをより明確にさせ、正常細胞への誤認識を避け、腫瘍内に効率的に集中させる事により先述の問題点を回避できる可能性がある。将来的な発展として、既知の癌抗原や切除標本等から新たに同定される癌抗原ペプチドへの応用が考えられ、臨床研究段階にある腫瘍溶解性ウイルス療法と免疫細胞療法を基にした新しい着想は今後の難治癌の臨床研究に重要な情報を提供する事が期待される。

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 2件)

①Yoshihiro Hotta, Hideki Kasuya, Itzel Bustos, Yoshinori Naoe, Toru Ichinose, Maki Tanaka, Yasuhiro Kodera, Curative effect of HF10 on liver and peritoneal metastasis mediated by host antitumor immunity, *Oncolytic Virotherapy*, 査読有、Volume 6、2017、31-38、DOI: 10.2147/OV.S127179

②Ibrahim Ragab Eissa, Yoshinori Naoe, Itzel Bustos-Villalobos, Toru Ichinose, Maki Tanaka, WuZhiwen, Nobuaki Mukoyama, Taishi Morimoto, Noriyuki Miyajima, Hasegawa Hitoki, Seiji Sumigama, Branko Aleksic, Yasuhiro Kodera and Hideki Kasuya, Genomic Signature of the Natural Oncolytic Herpes Simplex Virus HF10 and Its Therapeutic Role in Preclinical and Clinical Trials, *Front. Oncol*, 査読有、Volume 7, 2017、149、DOI:10.2147/OV.S127179

〔学会発表〕(計 19件)

①森本 大士, 直江 吉則, 向山 宜明, 宮嶋 則行, Ibrahim Ragab Eissa, 一ノ瀬 亨, Itzel Bustos-Villalobos, 山田 豪, 田中 舞紀, 藤本 保志, 小寺 泰弘, 粕谷 英樹, 腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス HF10 と免疫チェックポイント阻害剤の併用、第 51 回制癌剤適応研究会、2018/3/23、下呂温泉水明館(岐阜県下呂市)

②森本 大士, 直江 吉則, 向山 宜明, 一ノ瀬 亨, Itzel Bustos Villalobos, 神田 光郎, 丹羽 由紀子, 岩田 直樹, 林真路, 小林 大介, 田中 千恵, 中山 吾郎, 山田 豪, 杉本 博行, 小池 聖彦, 藤原 道隆, 田中 舞紀, 藤本 保志, 粕谷 英樹, 小寺 泰弘, Combination therapy of PD-L1 immune checkpoint inhibitor and oncolytic herpes simplex virus HF10、第 28 回日本消化器癌発生学会総会、2017/11/17~18、メルパルク熊本(熊本県熊本市)

③呉 智聞, 一ノ瀬 亨, 駱 晨虹, 直江 吉則, ヴィラロボス イツェル・バストス, 山田 豪, 杉本 博行, 宮嶋 則行, 森本 大士, 向山 宣昭, 西川 洋子, 小出 悠介, 小寺 泰弘, 田中 舞紀, 粕谷 英樹, COMBINATION THERAPY AGAINST HUMAN COLORECTAL CANCER WITH THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR INHIBITOR CETUXIMAB AND ONCOLYTIC HERPES SIMPLEX VIRUS HF10、第 55 回日本癌治療学会学術集会、2017/10/20~22、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

④Mukoyama N, Naoe Y, Ichinose T, Nassr E. I. R, Luo C, Villalobos I. B, Zhiwen W, Miyajima N, Morimoto D, Tanaka M, Fujimoto

Y, Sone M, Kodera Y, Kasuya H, Combination therapy of PD-L1 immune checkpoint inhibitor and oncolytic herpes simplex virus HF10、第 23 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2017/7/20~22、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

⑤ Wu Z, Ichinose T, Luo C, Naoe Y, Villalobos I. B, Yamada S, Fujii T, Sugimoto H, Miyajima N, Morimoto D, Mukoyama N, Nishikawa Y, Koide U, Kuwahara T, Kodera Y, Tanaka M, Kasuya H, Combination therapy against human pancreatic cancer with oncolytic herpes virus HF10 and abraxane、第 23 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2017/7/20~22、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

⑥Ichinose T, Naoe Y, Nassr E. I. R, Luo C, Villalobos I. B, Zhiwen W, Mukoyama N, Miyajima N, Morimoto D, Yamada S, Fujii T, Sugimoto H, Tanaka M, Kodera Y, Kasuya H, Systemic therapeutic potential of oncolytic herpes simplex virus HF10 adsorbed on antigen-specific lymphocytes、第 23 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2017/7/20~22、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

⑦Kasuya H, Ichinose T, Naoe Y, Villalobos I. B, Nassr E. I. R, Luo C, Zhiwen W, Mukoyama N, Miyajima N, Morimoto D, Hirooka Y, Goto H, Tanaka M, Clinical trial data using HF10, oncolytic herpes simplex virus、第 23 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2017/7/20~22、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

⑧H. Kasuya, G. Tan, C. Luo, T. Ichinose, I. Bustos, Y. Naoe, Combination therapy of oncolytic herpes virus and anti-angiogenesis agent (bevacizumab) against human gastric cancer xenograft、EACR-AACR-SIC Special Conference 2017、2017/6/24~27、フィレンツェ(イタリア)

⑨藤井 努, 山田 豪, 杉本 博行, 高見 秀樹, 林真路, 神田 光郎, 二宮 豪, 高野 奈緒, 森本 大士, 多代 充, 田中 伸孟, 岩田 直樹, 丹羽 由紀子, 小林 大介, 田中 千恵, 中山 吾郎, 粕谷 英樹, 小池 聖彦, 藤原 道隆, 小寺 泰弘、膀胱腸吻合における Blumgart 変法縫合(Nagoya method)の短期および長期成績、第 117 回日本外科学会定期学術集会、2017/4/27、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

⑩ 森本 大士, 直江 吉則, 一ノ瀬 亨, Bustos Itzel, 神田 光郎, 丹羽 由紀子, 岩田 直樹, 林 真路, 小林 大介, 田中 千恵, 山田 豪, 中山 吾郎, 杉本 博行, 小池 聖彦, 藤原 道隆, 藤井 努, 田中 舞紀, 粕谷英樹, 小寺 泰弘, ヒト膵癌異種移植モデルにおける nab-Paclitaxel (nab-PTX) と腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス HF10 との併用療法、第 117 回日本外科学会定期学術集会、2017/4/27、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

⑪ 呉 智聞, 一ノ瀬 亨, 駱 晨虹, 直江 吉則, イツェル・ブストス・ビジャロボス, 山田 豪, 藤井 努, 杉本 博行, 森本 大士, 向山 宣昭, 小寺 泰弘, 田中 舞紀, 粕谷英樹, ヒト大腸がんモデルにおけるセツキシマブとの併用による腫瘍溶解性ウイルス HF10 の抗腫瘍効果、第 117 回日本外科学会定期学術集会、2017/4/27、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

⑫ 粕谷 英樹, 直江 吉則, Bustos Itzel, 一ノ瀬 亨, 森本 大士, 向山 宣昭, 呉 智聞, 藤井 努, 小寺 泰弘, 田中 舞紀、HF10 ウイルス療法における in situ vaccination 効果についての検討、第 117 回日本外科学会定期学術集会、2017/4/27、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

⑬ Hideki Kasuya, Effectiveness Comparison of Different Routes of Administration of Oncolytic Virus in Abdominal Tumors, The 2nd Annual Oncolytic Virotherapy Summit (招待講演)、2016/12/07~8、サンディエゴ (アメリカ合衆国)

⑭ Hideki Kasuya, Effectiveness of HF10 in Clinical Trial against Pancreatic Cancer, 第 54 回日本癌治療学会学術集会 (招待講演)、2016/10/20~22、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

⑮ Yoshinori Naoe, Toru Ichinose, Chenhong Luo, Wu Zhiwen, Nobuaki Mukoyama, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Maki Tanaka, Hideki Kasuya, Most recent clinical trial data using HF10 for 9 patients with non resectable pancreatic cancer, The 10th International Meeting on Replicating Oncolytic, 2016/10/01~4、バンクーバー (カナダ)

⑯ Toru Ichinose, Chenhong Luo, Yusuke Koide, Wu Zhiwen, Nobuaki Mukoyama, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Maki Tanaka, Yasuhiro Kodera, Hideki Kasuya, Systemic delivery strategy of oncolytic herpes simplex virus HF10

adsorbed on antigen-specific lymphocytes、第 22 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2016/07/28~30、虎ノ門ヒルズフォーラム (東京都港区)

⑰ 粕谷英樹、廣岡芳樹、後藤秀実、小寺泰弘、田中舞紀、腫瘍溶解性ヘルペスウイルス HF10 を使用した新規膵癌治療法の研究、第 71 回日本消化器外科学会総会、2016/7/14~16、あわぎんホール・アスティとくしま (徳島県徳島市)

⑱ Yoshiki Hirooka, Hiroki Kawashima, Eizaburo Ohno, Hideki Kasuya, Maki Tanaka, Hidemi Goto, EUS-Guided Injection of HF10 for Unresectable Locally Advanced Pancreatic Cancer (Phase I Dose-Escalation Clinical Trial), the 12th AFSUMB 2016, 2016/5/27 ~ 29, Kyoto International Conference Center・Grand Prince Hotel Kyoto (京都府京都市)

⑲ 粕谷英樹、山村和生、藤井努、堀田佳宏、西山幸廣、小出悠介、田中舞紀、駱晨虹、一ノ瀬亨、宮嶋則行、向山宣昭、中尾昭公、小寺泰弘、腫瘍溶解性ヘルペスウイルス HF10 を使用した新規がん治療法の研究、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016/4/14~16、大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪 (大阪府大阪市)

[図書] (計 3 件)

① 粕谷 英樹, 直江 吉則, 一ノ瀬 亨, 廣岡芳樹, 後藤 秀実, 田中 舞紀, (株)メディカルドゥ、遺伝子医学 MOOK 31 号 がん免疫療法 - What's now and what's next? 第 2 章の 4 の 3) 腫瘍溶解性ウイルス HF10 による再発乳がん多発結節症例、切除不能進行膵がん症例に対する臨床研究、2017、294 ページ (136-143)

② 粕谷 英樹、田中 舞紀、村上 善則、村山 貴彦、後藤 典子、鈴木 拓、仲瀬 裕志、小川原 陽子、北林 一生、小田 裕昭、榑 康一、田賀 哲也、村松 智輝、稲澤 譲治、原田 浩、河上 裕、塚原 智英、鳥越俊彦、升田 雄士、山本 拓也、石井 健、濱西 潤三、万代 昌紀、小西 郁生、(株)エヌ・ティー・エス、2017、386 ページ (239-248)

③ Hideki Kasuya, et al Editor: Hiroki Yamaue, Springer, Innovation of Diagnosis and Treatment for Pancreatic Cancer Part 4, Chap. 18 The Potential of Oncolytic Virus Therapy for Pancreatic Cancer, 2017、260 ページ (253-260)

6. 研究組織
(1) 研究代表者

粕谷 英樹 (KASUYA Hideki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00402636

(2) 研究分担者

駱 晨虹 (LUO Chenhong)
名古屋大学・大学院医学系研究科・招へ
い教員
研究者番号：40759627