

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01578

研究課題名(和文)膜融合能増強型標的化改変ヘルペスウイルスを用いたがん免疫療法の開発

研究課題名(英文)Development of cancer immunotherapy using hyperfusogenic receptor-retargeted HSV

研究代表者

田原 秀晃 (TAHARA, HIDEAKI)

東京大学・医科学研究所・特任教授

研究者番号：70322071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々の開発したウイルス伝搬能が高く特徴的な細胞死を誘導できる膜融合能増強型標的化改変型単純ヘルペスウイルスの抗腫瘍効果について、直接的細胞傷害性に加えて免疫学的反応の検討も可能な同系マウス腫瘍モデルを構築した。そして我々が上記治療法の併用療法として注目している新規チェックポイント分子であるMilk fat globule-epidermal growth factor-factor 8 (MFG-E8)に対する阻害抗体治療実験に使用できるマウス・モノクローナル抗体も作製した。同時に、実際のがん患者において、MFG-E8の存在ががんの進展に関して重要なものであるという証拠も得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫療法は、今や、がん治療の標準的治療法の一つである。しかし、その奏効率は必ずしも高いものではないため、がん細胞を直接傷害できる治療法との併用による治療効果の改善が模索されている。我々は、腫瘍融解性ヘルペス・ウイルス療法が、その役割を担うものと考え、患者と同様な免疫反応を持つマウスを用いた実験に必要な腫瘍モデルと、免疫治療実験に使える抗体試薬を作製した。また同時に、実際のがん患者においても、我々の注目している免疫関連分子が重要な働きをしていることを見出した。この研究成果により、今後、有望な腫瘍融解ウイルスと免疫療法との併用療法の開発が加速できると考えられ、学術的・社会的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：We have been developing mutant oncolytic viruses for which viral entry into cells relies on the uniquely specific interaction of an engineered gD with the single-chain antibodies to the antigens on cancer cells. Furthermore, we introduced selected syncytial mutations into gB and/or gK of the EGFR-retargeted HSV and found that these mutations enabled formation of extensive syncytia by human cancer cell lines that express the target receptor. We have made a syngeneic mouse tumor models to evaluate its antitumor effects including immunological responses especially combining the treatment with novel immune-checkpoint inhibitor, the antibody against Milk fat globule-epidermal growth factor-factor 8 (MFG-E8). We also have shown that excessive expression of MFG-E8 has negative impact on the survival of esophageal cancer patients. We believe the system we have constructed in this project could be helpful in developing these types of cancer therapies.

研究分野：腫瘍外科

キーワード：腫瘍免疫 がん免疫療法 腫瘍溶解性ウイルス療法 遺伝子治療

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子・ウイルス療法は難治性・進行性のがんに対する有望な新規治療法と考えられてきた。それらのうち、がん治療の分野において近年特に注目されているものの一つに、腫瘍溶解性ウイルス療法がある。

これは、正常細胞に比べてがん細胞においてより効率良く増殖できる性質を持った変異ウイルスによりがん組織を選択的に破壊する治療法である。中でも、単純ヘルペスウイルス (HSV) を用いた腫瘍溶解性ウイルス (oncolytic HSV; oHSV) 療法は、いろいろなタイプのものが複数の研究グループにより開発され、臨床試験が既に進んでいるものもある。その中で、2015 年末には Amgen 社の oHSV である Imlygic (talimogene laherparepvec, 通称 T-Vec) が切除不能悪性黒色腫に対する治療薬として欧米で承認された。しかし、これまで臨床試験が進められてきた oHSV は、そのほとんどが腫瘍内に直接投与することが必要であるため遠隔臓器の転移巣に対する直接的抗腫瘍効果は期待できない。そのため、GM-CSF 遺伝子を搭載するなど、oHSV により障害を受けた腫瘍細胞に対する特異的免疫反応を惹起する工夫がされているが、内臓転移のある悪性黒色腫症例に関しては有意な効果が見られなかった。よって、oHSV 腫瘍内投与法を進行がん患者への有効な治療法とするためには、より強力な抗腫瘍免疫を促進する新たな手法の開発が必要であると考えられる。

上述の既存 oHSV は、すべて HSV の増殖能に係わる遺伝子に変異や欠失があることにより腫瘍特異的な増殖性を持つが、それらとは異なり、我々は膜抗原を認識してそれを有する細胞にのみ侵入することにより標的細胞特異性を担保する標的化改変 oHSV を開発し、この oHSV が各種の膜抗原に対応でき強い殺細胞効果を持つことも報告してきた。さらに最近、膜融合活性が高く細胞膜融合型の細胞死 (syncytial cell death: SCD) をきたす標的化改変 oHSV の開発にも成功した。加えて、抗 Milk fat globule-epidermal growth factor-factor 8 (MFG-E8) 抗体という新たなタイプのチェックポイント阻害剤が、生体内のアポトーシス細胞を免疫源として抗腫瘍免疫反応を著しく高めることも見出した。

以上のことを踏まえて、強い殺細胞効果を持ち腫瘍免疫を誘導可能であると考えられる標的化改変 oHSV に加えて新規免疫抑制解除法を用いれば、遠隔臓器転移を有するがんにも有効な oHSV 療法の開発が可能と考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究においては、我々が最近作製に成功したウイルス伝搬能が高く特徴的な細胞死を誘導できる(A)膜融合能増強型標的化改変型 oHSV の抗腫瘍効果と免疫誘導に与える影響、ならびに、現在我々が主に抗癌剤全身投与との併用により開発を進めている抗 MFG-E8 抗体療法を中心に、(B)免疫抑制解除法を oHSV と併用する効果の両面から検討することを目的とした。

検討課題(A): 膜融合活性が高く細胞膜融合型の細胞死 (SCD) をきたす oHSV は、通常型の細胞死 (cytopathic effect: CPE) をきたす oHSV より強い抗腫瘍活性を持つことが報告されている。しかし、抗腫瘍免疫の誘導への影響の詳細についてはまだ不明な点が多い。我々は最近、自身の持つ標的化改変 oHSV の gB および gK 領域に変異を組み込むことにより、SCD 機能を持つ oHSV (SCD-oHSV) の開発に成功した。Vero 細胞への感染実験を行い 48 時間後に観察すると、右図に示す通り、親株 oHSV (KdGNE; 過去に構築した EGFR 標的化 HSV ベクター) に比べ、syn 変異導入 HSV (KdGNE-synHT) は明らかに大きい plaque を形成している。これらのベクターを用いてマウス同系腫瘍モデルを用いた比較対照実験により免疫学的検討を行うことが必要である。

検討課題(B): 近年、がん細胞の持つ T 細胞の活性化抑制機構を阻害することにより免疫反応を促進するチェックポイント阻害剤 (Immune check-point inhibitors: ICPI) と総称される治療薬の開発が進んでいる。これは、抗 CTLA-4 (cytotoxic T-cell activating factor-4) 抗体による悪性黒色腫に対する第 III 相臨床試験成功 (Hodi FS et al. N Engl J Med; 363:711-723. 2010) を契機とし、その後 PD-1 機構 (Programmed cell Death protein-1) の阻害抗体 (抗 PD-1 あるいは抗 PD-L1 抗体) 療法の開発が複数のがん種に対して急速に進められている。

我々は、CTLA-4 や PD-1 などとは作用点が異なり、広義の ICPI とも言える MFG-E8 に関して検討してきた (Jinushi M, et al. J Exp. Med. 206:1317-1326, 2009. Jinushi M et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 108:12425-30. 2011)。MFG-E8 は、アポトーシスに陥った正常細胞の膜上に出てくる phosphatidylserine に結合し、抗原提示細胞 (マクロファージや樹状細胞) が Integrin $\alpha v \beta 3$ を利用して貪食することを促すと同時に、制御性 T 細胞 (Treg) を誘導して免疫反応は抑制し正常組織に危害を加えないように作用する重要な分子である。我々は、がん細胞のアポトーシスを誘導する治療法と抗 MFG-E8 阻害抗体を併用すると全身的強い抗腫瘍免疫反応を誘導し得ることをマウス腫瘍モデルにより示した (Jinushi M, et al. J Exp. Med. 206:1317-1326, 2009.)。この方法は、生体内である程度のがん細胞をアポトーシスに誘導できさえすれば、それを免疫源として有効な免疫反応を促進できることを示したものである。現在、種々の oHSV 療

法の免疫反応を促進する方法として抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体、そして抗 PD-L1 抗体の併用法が検討されているが、これらの作用点は、抗原が認識され T 細胞活性化のシグナルが既に入った後の部分であり、抗原認識の部分を増強するものではない。よって、抗 MFG-E8 抗体療法は、oHSV 療法と併用する ICPI としては最適のものである可能性がある。また抗 MFG-E8 抗体療法からの視点に立っても、骨髄抑制を起こすことなく免疫誘導の可能な細胞死を誘導し得る方法である oHSV 療法は、相性のより良い細胞死誘導法の一つと考えられる。よって、抗 MFG-E8 抗体療法の併用を基軸として、抗 CTLA-4 抗体や抗 PD-1 抗体とも比較しながら最適な併用療法の検討とその機序の解析を行うこととした。

3. 研究の方法

臨床開発も視野に入れた「oHSV を用いた効果的ながん免疫療法の開発」をするためには、正常な免疫反応を持つマウスでの *in vivo* 実験が必要と考えられる。しかし、これまでの oHSV の開発研究では、適当な同系マウス腫瘍モデルがなく、ヒト腫瘍株を免疫不全マウスに移植するゼノグラフトモデルでの検討にとどまっている。そこで本研究では、詳細な免疫学的検討を行うことができる *in vivo* モデルの構築に着手した。そのモデルを用いて oHSV の免疫誘導に与える影響を検討しつつ、免疫抑制解除法を oHSV と併用する効果についてヒトにおける状況を模した形で検討するためには、それにふさわしい試薬の作製も必要となるため、抗マウス MFG-E8 マウス抗体を作製した。加えて、食道がん患者の切除標本を用いて MFG-E8 を免疫組織染色し、患者の臨床情報と照合して、ヒトのがんにおける MFG-E8 発現様式とその役割の検討も行った。

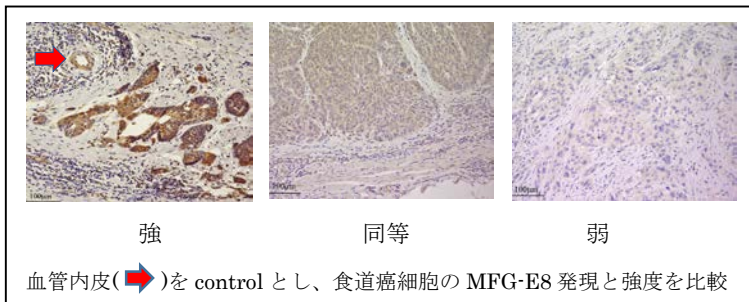
4. 研究成果

我々の開発した SCD 機能を持つ oHSV (SCD-oHSV) が、*in vitro* だけではなく、*in vivo* においても抗原特異的侵入能を失うことなく細胞融合型の細胞死を強力に誘導できるか否かについて検討を進めた。具体的には、免疫不全マウス (SCID-Beige) に、U87 (hEGFR を発現するヒト・グリオーマ細胞株) を接種し、十分な大きさの腫瘍を形成した後に、抗 hEGFR 単鎖抗体を搭載した SCD-RR-oHSV を腫瘍内投与した。その後マウスを犠牲死させ腫瘍組織を採取し組織学的に検討したところ、腫瘍内には多くの SCD をきたした腫瘍細胞が存在し、かつ周辺の正常組織には障害が発生していないことが確認された。続いて、このベクターによる直接的殺細胞効果だけでなく免疫学的機序も含めた抗腫瘍効果の機序について検討するために、hEpCAM 遺伝子を発現させた CT26 (マウス大腸癌腫瘍細胞株、hEpCAM-CT26) を同系である BALB/c マウスの皮下に移植した同系マウス腫瘍モデルを用いて予備的検討を行った。接種 8 日後に最大投与可能量よりも有意に低いウイルス量の SCD-oHSV を腫瘍内投与したところ、PBS を接種したコントロール群に比べ有意に腫瘍増殖が抑制されることが確認された。またマウスへの明らかな有害事象は見られなかった。しかしながら、同時に行った *in vitro* での感染実験により、マウス腫瘍細胞株における HSV の感染と増殖の程度は、ヒト細胞のそれらとに比べ有意に低いことを見出した。この事実から、よりヒト腫瘍に近い特性を持つマウス腫瘍モデルの構築が必要であることが判明したので、多数のマウス腫瘍細胞株について HSV の感染性と増殖性について検討したところ、数は少ないものの利用可能な細胞株のあることを見出した。

我々の MFG-E8 に関する成果は、ヒトへの応用が期待されるものであるが、これまでのマウスモデルに用いられた抗 MFG-E8 抗体はラビットのポリクローナル抗体かハムスターのモノクローナル抗体であり、宿主と異なる動物種由来の抗体を使用したために、異種の Fc 部分を介して予期せぬ免疫応答が起こった可能性がある。本研究ではマウス MFG-E8 とインテグリン $\alpha v \beta 3/5$ の結合を阻害できる抗マウス MFG-E8 マウス・モノクローナル抗体を作製し、その特性を評価した。具体的な作製方法としては、インテグリンとの結合部位である RGD モチーフを含む部分を標的として作製を進め、インテグリン $\alpha v \beta 3$ を発現している細胞の接着を阻害できる抗体 2 クローンを取得した。この 2 クローンはともにモノクローナルで、IgG1, κ であった。この抗マウス MFG-E8 マウス・モノクローナル抗体は、同系マウス腫瘍モデルにおいて oHSV との併用投与実験の際に詳細な免疫学的解析に使用できるばかりではなく、ヒトにおけるヒト化抗ヒト MFG-E8 モノクローナル抗体と同等のものと考えられ、この抗体療法の前臨床試験におけるサロゲート抗体として好適であると考えられる。

ヒトのいくつかの癌種でも癌細胞から MFG-E8 が発現していることが報告されているが、抗腫瘍免疫における役割、臨床的意義についてはまだ明らかになっていない。そこで今回、食道癌における MFG-E8 の発現が抗腫瘍免疫や臨床経過にどのように影響するのか、検討を行った。

大阪大学医学部附属病院消化器外科にて 2000 年から 2008 年に食道癌に対し根治切除術を行った 134 例の食道扁平上皮癌症例(66 例は術前治療なし、68 例は術前化学療法 (NAC) 施行、化学放射線療法施行例は除外)を対象とした。ホルマリン固定切除標本を用いて MFG-E8、および抗腫瘍免疫関連因子として CD8、Foxp3(Treg マーカー)の免疫組織染色を行い、それらの発現と臨床病理学的因子、予後との関連を検討した。MFG-E8 染色では癌組織における MFG-E8 発現がコントロールの血管内皮細胞よりも強い発現を示すものを強発現群、同等または弱い発現のものを弱発現群と評価した。



CD8、Foxp3 染色では癌組織に浸潤した CD8、Foxp3 陽性細胞数を 200 倍視野、5 か所でカウントし、平均値を算出した。さらに、予後との関係が報告されている腫瘍浸潤 CD8 T-cell/Treg 発現数比(CD8/Foxp3)を算出した。

正常食道扁平上皮、マクロファージ、樹状細胞においては MFG-E8 発現を認めなかった。食道癌では 134 例中 32 例 (23.9%) に MFG-E8 強発現を認めた。MFG-E8 の発現は、年齢、性別、腫瘍分化度、壁深達度のいずれとも相関を認めなかったが、MFG-E8 強発現群では MFG-E8 弱発現群に比べて所属リンパ節転移陽性例、遠隔リンパ節転移陽性例の割合が有意に多かった ($p=0.015$, $p=0.0005$)。また MFG-E8 高発現群に NAC 施行例が有意に多かった ($p<0.0001$)。予後解析では、MFG-E8 強発現群は弱発現群に比べて全生存率、無再発生存率がいずれも有意に低かった ($p=0.0047$, $p=0.012$)。NAC 施行有無で分けたサブグループ解析を行うと、NAC 非施行群では MFG-E8 強発現と弱発現の 2 群間で全生存率、無再発生存率に有意差を認めなかった ($p=0.68$, $p=0.65$)。一方、NAC 施行群では MFG-E8 強発現群は弱発現群に比べて全生存率、無再発生存率が有意に低く ($P=0.0039$, $P=0.027$)、MFG-E8 発現は NAC 施行例において予後不良に関係すると考えられた。MFG-E8 発現と抗腫瘍免疫関連因子 CD8/Foxp3 比との関連について検討したところ、NAC 非施行群における CD8/Foxp3 比は、MFG-E8 強発現群で 1.0、弱発現群 1.71 であり MFG-E8 発現と CD8/Foxp3 比との間に有意な相関は認めなかったが ($P=0.34$)、NAC 施行群における CD8/Foxp3 比は、MFG-E8 強発現群で 1.53、弱発現群 3.28 であり、MFG-E8 強発現群で有意に CD8/Foxp3 比が低かった ($p=0.042$)。その CD8/Foxp3 比が予後と関連するかどうか調べるために、NAC 施行群において CD8/Foxp3 低値群(3.2 未満 38 例)と高値群(3.2 以上 28 例)に分けて解析を行うと、CD8/Foxp3 比低値群は高値群に比べて全生存率が有意に低かった ($p=0.026$)。さらに NAC 施行群において、全生存率に関する Cox 多変量解析を行ったところ、低分化癌 ($p=0.0016$, HR 3.04)、pStageIII-IV ($p=0.0013$, HR 3.77)とならび、MFG-E8 強発現が独立した予後規定因子であることが示された ($p=0.028$, HR 2.07)。

これらの結果から、食道癌 NAC 施行例では MFG-E8 発現が CD8/Foxp3 を低値に誘導し、抗腫瘍免疫を抑制することで長期的な予後を悪化させている可能性が示唆された。食道癌における NAC 施行時に MFG-E8 を抑制することは食道癌に対する治療成績向上のための有望な戦略の一つと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanemura T, Miyata H, Makino T, Tanaka K, Sugimura K, Hamada-Uematsu M, Mizote Y, Uchida H, Miyazaki Y, Takahashi T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Wada H, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y, Tahara H.	4. 巻 109
2. 論文標題 Immuno-regulatory influence of abundant MFG-E8 expression by esophageal cancer treated with chemotherapy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 224-228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13785	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 -

1. 著者名 Kaneko Mika K., Abe Shinji, Ogasawara Satoshi, Fujii Yuki, Yamada Shinji, Murata Takeshi, Uchida Hiroaki, Tahara Hideaki, Nishioka Yasuhiko, Kato Yukinari	4. 巻 36
2. 論文標題 Chimeric Anti-Human Podoplanin Antibody NZ-12 of Lambda Light Chain Exerts Higher Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity and Complement-Dependent Cytotoxicity Compared with NZ-8 of Kappa Light Chain	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.	6. 最初と最後の頁 25～29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/mab.2016.0047	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 Kato Yukinari, Kunita Akiko, Fukayama Masashi, Abe Shinji, Nishioka Yasuhiko, Uchida Hiroaki, Tahara Hideaki, Yamada Shinji, Yanaka Miyuki, Nakamura Takuro, Saidoh Noriko, Yoshida Kanae, Fujii Yuki, Honma Ryusuke, Takagi Michiaki, Ogasawara Satoshi, Murata Takeshi, Kaneko Mika K.	4. 巻 36
2. 論文標題 Antiglycopeptide Mouse Monoclonal Antibody LpMab-21 Exerts Antitumor Activity Against Human Podoplanin Through Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity and Complement-Dependent Cytotoxicity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.	6. 最初と最後の頁 20～24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/mab.2016.0045	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 Yamazaki Naoya, Kiyohara Yoshio, Uhara Hisashi, Iizuka Hajime, Uehara Jiro, Otsuka Fujio, Fujisawa Yasuhiro, Takenouchi Tatsuya, Isei Taiki, Iwatsuki Keiji, Uchi Hiroshi, Ihn Hironobu, Minami Hironobu, Tahara Hideaki	4. 巻 108
2. 論文標題 Cytokine biomarkers to predict antitumor responses to nivolumab suggested in a phase 2 study for advanced melanoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1022 ~ 1031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13226	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 -

1. 著者名 Ogura K, Sato-Matsushita M, Yamamoto S, Hori T, Sasahara M, Iwakura Y, Saiki I, Tahara H, Hayakawa Y.	4. 巻 in press
2. 論文標題 NK cells control tumor-promoting function of neutrophils in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田原秀晃, 溝手雄, 他
2. 発表標題 免疫応答のプライミング相を制御する新規がん治療法の開発
3. 学会等名 第 119 回日本外科学会定期学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田原秀晃
2. 発表標題 患者検体の先進的利活用による医療の開発と検証
3. 学会等名 安全性評価研究会 第 2 2 回 春のセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田原秀晃
2. 発表標題 患者検体を利用したがん治療開発システムの構築
3. 学会等名 第26回HAB研究機構学術年会（招待講演）
4. 発表年 2019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	土岐 祐一郎 (Doki Yuichiro) (20291445)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	内田 宏昭 (Uchida Hiroaki) (20401250)	東京大学・医科学研究所・特任准教授 (12601)	
研究分担者	田中 晃司 (Tanaka Koji) (70621019)	大阪大学・医学部附属病院・助教 (14401)	
研究分担者	植松 美影 (濱田美影) (Uematsu Mika) (90769449)	東京大学・医科学研究所・特任研究員 (12601)	