

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10604

研究課題名(和文)食道癌への臨床応用を可能にする抗がんウイルスの新規開発と最適化研究

研究課題名(英文)Optimal adjustment of clinical application for oncolytic virotherapy against esophageal cancer

研究代表者

中森 幹人(Nakamori, Mikihiro)

和歌山県立医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10322372

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)：食道癌は治療抵抗性の高い癌腫であり、これに対する抗がんヘルペスウイルス治療が期待できる。本研究では第3世代抗がんヘルペスウイルスを武装化し、3種類の抗がんヘルペスウイルスとして作成した。

T-survivin, T-SOCS-3, T-hTERTとそれぞれ呼称した抗がんウイルスは、食道癌に対して高い複製能と殺細胞効果を示し、切除食道癌組織を用いたトロピズムの検討を行った結果、T-SOCS-3とT-hTERTはT-survivinに比べて、高いウイルス効果を示した。

食道癌に対する抗がんヘルペスウイルスの将来的な臨床応用に向けて、抗がんウイルスの効率の高い効果予測が可能になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症としてのウイルスの脅威とは異なるアプローチにより、遺伝子改変されたウイルスはがんに対する治療製剤としての可能性を有することがすでに報告されており、臨床試験も進んでいます。

本研究では、難治性癌のひとつでもある、「食道癌に対する最適な抗がんヘルペスウイルスの開発」と、その「将来的な臨床応用を想定した最適な抗がんヘルペスウイルスの治療効果予測モデルの開発」を行いました。

本研究成果は、将来の難治性癌に治療に有用な研究として今後も研究開発を続ける必要があると考えます。

研究成果の概要(英文)：Advanced esophageal cancer, remains refractory to conventional therapies. A third-generation oncolytic herpes simplex virus type (oHSV), is an attractive novel therapeutic agent for solid cancer. In this study, we investigated the therapeutic potential of armed-typed oHSVs (designated T-survivin, T-SOCS-3, and T-hTERT) for human esophageal cancer. In vitro, these three oHSVs showed good cytopathic effects and replication capabilities in human esophageal cancer cell lines tested. We have taken advantage of human esophageal organ cultures derived from radical esophagectomy to investigate oHSV tropism. Analysis of oHSV replication in esophageal surgical specimens 3 days post infection showed that T-SOCS-3 and T-hTERT generated approximately 30-fold more viral progeny than did T-survivin. Our results show that these oncolytic herpes viruses point to the utility of using human esophageal organ cultures in assessing oHSV tropism and specificity for clinical application in the future.

研究分野：消化管外科学

キーワード：抗がんウイルス 食道癌

1. 研究開始当初の背景

食道がんは、我が国を含む東アジア地域において未だに罹患率が高く、我が国の食道がんに対する治療成績も一定の向上を示したとは言え、さらなる治療成績の向上が求められています。特に、切除可能進行食道がんに対する標準治療は、術前化学療法後の根治手術であり、国内では現在、日本臨床腫瘍グループの多施設ランダム化比較試験で、2剤併用の術前化学療法、3剤併用術前化学療法、そして、術前化学放射線療法の3つの術前治療を比較しているのが現状である。

しかし、食道がん術後再発は多様であり、リンパ節再発や遠隔転移も高頻度に認められ、それに対する治療は化学療法あるいは化学放射線治療のみである。また、欧米の食道がん症例のほとんどが腺がんであり、我が国では扁平上皮がんがほとんどであるため、欧米の治療戦略を外挿することは現実的ではないと考えた。

本研究者は、術前3剤化学療法の第2相試験を行いました。2剤併用療法を凌駕するほどの治療の予後向上を示すことができませんでした (Anticancer Res, 2016)。また、同じ消化管がんの胃がんや大腸がんとは異なり、国内で分子標的治療薬として認可されているものは現時点ではひとつもありません。また、本研究者が行った「がんワクチン療法」も未だエビデンスを確立できていないのが現状です (Cancer Sci, 2011)。つまり、食道がんに対する新規治療法の研究開発は急務であると考察しました。

本研究者は、ヘルペスウイルスを遺伝子工学的に改良した抗がんウイルス療法の治療開発の研究を2002年より開始し、日本学術振興会、厚生労働省、日本医療研究開発機構からの研究費の援助により、胃がんに対する抗がんウイルス療法の基礎的研究 (Int J Cancer, 2013)を行うとともに、その臨床応用にも精力的な研究を進めてきました。また、欧米では悪性黒色腫に対して、抗がんヘルペスウイルスが世界で初めて薬剤として認可を受けたばかりです。

そして、我が国でも、2016年2月に医薬品医療機器総合機構が、抗がんヘルペスウイルスを先駆け審査指定制度の対象品目として承認しました。そこで、胃がんに対する抗がんウイルス治療開発の経験を生かして、従来の化学療法と外科手術、放射線治療の他に有効性を示す治療法がない食道がんに対しても、これまでの研究手法をさらに発展させ、食道がんに適した抗がんウイルスの開発を行うことで、難治がんのひとつである食道がんの治療成績の向上に寄与できるのでは、という着想に至りました。

2. 研究の目的

食道がんに対する新しい強力な治療の開発が必要であることから、本研究者がこれまでの一連の研究で、抗がんウイルスを開発し、胃がんに対する治療効果をすでに確認した。本研究では、この成果を食道がんに対しても、将来の臨床応用を視野に入れ、食道がん細胞の分子細胞学的特徴を加味した抗がんウイルスを新たに開発することを目的とした。

目標とする抗がんウイルスは、食道がん細胞における複製能を担保した抗がんウイルス、食道がん幹細胞に対しても殺細胞効果を有するウイルス、そして、食道がんの生物学的個性に対応したウイルスであり、これらの抗がんウイルスによるカクテル療法の基礎的開発を足がかりに、臨床応用を目指すことも研究目的としました。

上記に記した背景ならびに、これまでに申請者が研究開発した抗がんヘルペスウイルスを基に、食道がんに対する様々な問題点を克服するために、本研究では、食道がんに対してより適応力を有する新規の抗がんヘルペスウイルスを基礎研究開発し、将来の治療薬としての臨床応用に向けた礎となる研究を行い、研究期間内に以下に示したことを明らかにすることとしました。

まず、ヘルペスウイルス感染に重要な分子である SOCS-3 を強制発現する抗がんヘルペスウイルス (T-SOCS-3) とテロメラーゼ関連分子の hTERT プロモーター下流に RR (ribonucleotide reductase) 遺伝子を組み込んだ抗がんヘルペスウイルス (T-hTERT) が現状のウイルス製剤よりも複製能が増強すること示し、食道がん細胞、食道がん幹細胞にも抗腫瘍効果が増強することを明らかにすること、次に、未だ詳細に明らかにされていない抗がんヘルペスウイルスとオートファジー現象の関係を明らかにし、オートファジー制御型抗がんヘルペスウイルスの開発を目指すこと、そして、外科手術新鮮切除食道がん標本を用いて、食道がん治療に適した抗がんヘルペスウイルスの治療効果予測モデルの基礎的検証を行うことを目的としました。

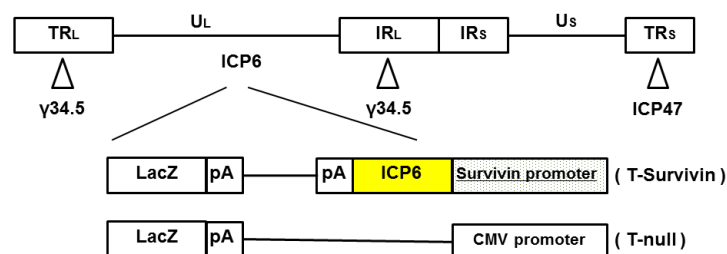
最終的には、食道がんの分子生物学的プロファイルに対応した、多種の抗がんヘルペスウイルスをカクテル療法として臨床応用が可能か否かについても基礎的臨床的に検証することを目的としました。

3. 研究の方法

(1) Survivin 制御型抗がんヘルペスウイルス (T-Survivin) の作成と、その複製能と抗腫瘍効果、メカニズムの解明

書面により同意が得られた食道がん切除標本に対し、survivin antibody (NB500-201, Novus Biologicals 社) を用いて免疫組織染色法にて Survivin の発現頻度および発現強度と予後の関係を明らかとすることで、腫瘍特異的プロモーターとして Survivin promoter を用いることの妥

当性を検証した。T-BAC system (呼称)を用いた、画期的な遺伝子組換え抗がんヘルペスウイルスの作成技術により、ベクタープラスミド SV-01 のマルチクローニングサイトに Survivin promoter およびその下流に ICP6 遺伝子をクローニングし、SV-Survivin を作成した。これを Cre/loxP 系を応用した相同組換えを行い、T-BAC-SV-Survivin を作成し、この T-BAC-SV-Survivin を、FLPs プラスミドとともに Vero 細胞にリポフェクション法で導入した。これにより、FLPe/FRT 相同組み換えによる BAC シークエンスが切り出され Survivin promoter 制御型抗がんヘルペスウイルス (T-Survivin : 下図)) が作成可能とした。



(2) 抗がんヘルペスウイルスによる腫瘍破壊とオートファジー現象の機序の解明

ヘルペスウイルスのシグナル伝達に関しては、STAT3 のリン酸化やアポトーシスに関する報告 (Hepatology, 2008) があるが、抗がんヘルペスウイルスとの関連性を示した報告は未だない。そこで、3 種類の抗がんヘルペスウイルス (T-Survivin, T-SOCS-3, T-hTERT) それぞれの感染後 24 時間におけるリン酸化 STAT3, cyclin-D1, bcl-xl の発現をウエスタン・ブロット法で確認した。さらに、オートファジー現象については、puncta formation アッセイ (Cell, 2010) を用いて行い、3 種類の抗がんヘルペスウイルスの抗腫瘍効果とオートファジー現象の相関について検証した。

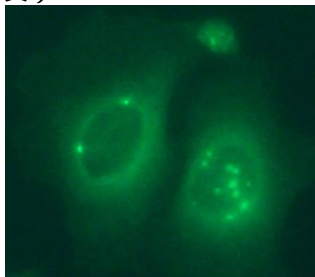
(3) 食道がん新鮮切除標本を用いた抗がんヘルペスウイルスの効果予測モデル確立と前臨床試験計画

これまでの抗癌剤などの in vitro における治療効果予測に関しては MTT アッセイや MTS アッセイを用いることが多かったが、抗がんウイルス療法ではその効果予測モデルにコンセンサスがなれないのが現状である。また、本研究ではウイルス療法の効果を評価する新たな方法として in vivo に代わるシステムの構築を目的とした。従来は抗がんウイルス療法の効果判定、安全性の検証を動物実験により行ってきましたが、近年「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」「動物愛護管理法」等により実験に供する動物の削減が求められていることを鑑み、食道がん手術検体の一部をコラーゲン培地で短期間培養することで生体内と類似環境 (短期培養系) を作り出し、この短期培養系を用いること抗がんウイルス療法の効果判定を行うことを検証した。

4. 研究成果

(1) 食道癌切除標本を用いた免疫染色を行った結果、食道癌組織における survivin の発現強度は、他の消化管癌と比べても有意な発現効果を認めず、臨床病理学的相関も有意ではなかった。作成した抗がんヘルペスウイルス T-Survivin は抗がんウイルスとしての殺細胞効果を有することを確認出来た。

(2) 抗がんヘルペスウイルスによる腫瘍破壊と分子生物学的変化を検討した結果、3 つのウイルス (T-SOCS-3, T-hTERT, T-Survivin) の間での STAT3, cyclin-D1, bcl-xl の発現には有意差を認めなかった。オートファジー現象の比較では、T-SOCS-3 が最もオートファジー現象を誘導し、puncta formation を認めた (下写真)



(3) 食道がん新鮮切除標本を用いた抗がんヘルペスウイルスの効果予測モデルについて、コラーゲン培地モデルを用いて検証した結果、再現性可能なモデルとして有用であると考察した。

以上の成果より、食道癌に対する抗がんヘルペスウイルス治療の臨床応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ojima T et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Triplet chemotherapy with docetaxel, cisplatin and S-1 for unresectable advanced squamous cell carcinoma of the esophagus: phase I/II trial results	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 847-855
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.2661	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 Tsuji T et al	4. 巻 28
2. 論文標題 Triangulating stapling vs functional end-to-end stapling for cervical esophagogastric anastomosis after esophagectomy for thoracic esophageal cancer: study protocol for a randomized controlled trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trials	6. 最初と最後の頁 83-85
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13063-019-3201-2	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 Hayata K et al.	4. 巻 38
2. 論文標題 Neoadjuvant Chemotherapy with Docetaxel, Cisplatin and S-1 for Resectable Advanced Esophageal Cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Reserach	6. 最初と最後の頁 5267-5273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticanres.12852	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 Ojima T et al.	4. 巻 95
2. 論文標題 Phase I/II Trial of Chemotherapy with Docetaxel, Cisplatin, and S-1 for Unresectable Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology	6. 最初と最後の頁 116-120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000488861	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 Ojima T. et al.	4. 巻 104
2. 論文標題 Randomized clinical trial of landiolol hydrochloride for the prevention of atrial fibrillation and postoperative complications after oesophagectomy for cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Br J Surg.	6. 最初と最後の頁 1003-1009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bjs.10548	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 Hayata K. et al.	4. 巻 162
2. 論文標題 Circular stapling versus triangulating stapling for the cervical esophagogastric anastomosis after esophagectomy in patients with thoracic esophageal cancer: A prospective, randomized, controlled trial	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 131-138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.surg.2017.01.013	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中森幹人
2. 発表標題 スキルス胃癌に対する抗がんヘルペス療法の探索的アプローチ
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中森幹人
2. 発表標題 食道胃接合部癌に対する外科的集学的アプローチ
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中森幹人
2. 発表標題 切除可能進行食道癌に対する術前補助化学療法-in houseでの2相試験
3. 学会等名 第80回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中森幹人
2. 発表標題 食道胃接合部癌に対する鏡視下手術のタスクフォース
3. 学会等名 第31回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中森幹人
2. 発表標題 難治性胃癌に対する癌治療用ウイルスの開発と期待
3. 学会等名 第55回日本癌治療学会総会
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	山上 裕機 (Yamaue Hiroki) (20191190)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	