

令和元年6月5日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15755

研究課題名(和文)コクサッキーウイルスB群3のin vivoにおける抗腫瘍免疫誘導の検討

研究課題名(英文)Analysis of anti-tumor effect of CVB3 via immunogenicity

研究代表者

廣瀬 理沙(Hirose, Lisa)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：30637012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍溶解性ウイルスコクサッキーウイルスB群3型(CVB3)の免疫原性を介した抗腫瘍効果をin vivoの実験系で検討した。マウス線維肉腫細胞を用いてCVB3の抗腫瘍効果と免疫誘導能を検討し、CVB3が線維肉腫に対して抗腫瘍効果を有することが明らかとなった。また、CVB3はマウス線維肉腫細胞でCalreticulinを細胞表面に誘導することを明らかにした。CVB3の抗腫瘍効果にはCalreticulinによる免疫原性が寄与している可能性が示唆された。更にCD8陽性T細胞のグランザイムBの産生がコントロールに比べて増加した。CVB3によるin vivoの免疫の変化についての解析は今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦において、悪性腫瘍に対する外科的治療、放射線療法、化学療法は、副作用の軽減が大きな課題である。近年、悪性腫瘍患者の免疫を誘導して治療する免疫療法の研究が急速に進んでおり、その中で腫瘍溶解性ウイルスを用いたウイルス療法の開発が注目されている。ウイルス療法は、腫瘍細胞でのみ複製可能なウイルスを増幅させ、ウイルスの直接的な殺細胞作用で腫瘍細胞を死滅させる治療法と従来考えられてきていたが、CVB3の免疫原性を介したウイルスの抗腫瘍効果をin vivo系で示唆できたことは、悪性腫瘍に対する免疫療法開発への大きな貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the anti-tumor effect of CVB3 through immunogenicity, we evaluated the tumor growth after inoculation of CVB3-infected dying mouse fibrosarcoma cells subcutaneously into immunocompetent mouse to induce the immunity, followed by the inoculation of live mouse fibrosarcoma cells. CVB3 induced calreticulin to the surface of mouse fibrosarcoma cells. It is also revealed that inoculation of CVB3-infected cells suppressed the growth of tumor in vivo. These results indicated that CVB3 had anti-tumor effect through the immunogenicity in vivo. Furthermore, CVB3 induced the production of Granzyme B in CD8-positive T cells. Further studies are necessary to elucidate the alteration of immunity after immunogenicity is induced by CVB3.

研究分野：医歯薬学

キーワード：抗腫瘍免疫 コクサッキーウイルスB群3型 Calreticulin

1. 研究開始当初の背景

応募者の研究室では、ピコルナウイルス科・エンテロウイルス属に着目して、これまでに約 40 種類のウイルスを各種ヒト癌細胞株及び正常細胞に *in vitro* で感染させ、これらの殺細胞効果を指標にエンテロウイルスのスクリーニングを行った。その結果、野生型 CVB3 が正常肺線維芽細胞を傷害することなく、幾つかの癌細胞を特異的に溶解することを発見し、担ヒト肺癌ヌードマウスを用いた *in vivo* 研究において原発及び転移巣での有意な抗腫瘍効果を誘導することを報告した(*Cancer Research* 72 (10) 2609-21 2012)。続いて、野生型 CVB3 の欠点である正常臓腑及び筋肉組織への感染性を克服すべく、各組織に特異的に発現する micro RNA (miR-1 及び miR-217) に相補的な配列を搭載した CVB3-miR-1&217T (CVB3-miRT) の作製に成功した。実際、CVB3-miRT を担癌マウス (肺癌および乳癌) において腫瘍内投与した際、抗腫瘍効果の減弱なく、野生型 CVB3 で引き起こされる肺炎、筋炎の消失及び膵、肝機能障害の正常化を認め、安全性の向上を確認できた(特許名: 組換えコクサッキーウイルス、出願番号: 61/812943、出願日: 2013 年 4 月 17 日)。

腫瘍溶解性ウイルスで初めて野生型 CVB3 が二次的な抗腫瘍免疫を誘導すること、すなわち HMGB1 の細胞質放出および Calreticulin 細胞膜移行と ATP の細胞外放出誘導を *in vitro* 確認した。この結果から、CVB3 は、生体内への投与により二次的に全身性の抗腫瘍免疫を誘導し、抗腫瘍効果が全身に及ぶ可能性が示唆された。また、応募者の研究室ではこれまでに CVB3-miRT の臨床応用を念頭に、CVB3 の精製法を確立し、サルおよびマウスで毒性試験を実施してきた。

2. 研究の目的

免疫応答性野生型マウスを用いて CVB3-miRT の *in vivo* 抗腫瘍効果に対する CVB3 の抗腫瘍免疫誘導の寄与を明らかにする。

二次的抗腫瘍免疫誘導の増強がウイルス療法の治療戦略上重要と考え、Programmed death-ligand 1 (PD-L1) 制御により腫瘍微小環境での免疫寛容を打破し、二次的免疫応答増強を図るため PD-L1 中和抗体を利用した薬剤併用 CVB3-miRT 療法を開発する。更には CVB3 投与による免疫細胞の動態の変化を明らかにする。

3. 研究の方法

研究開始時に予定していた研究方法は下記の通りである。

CVB3 の *in vivo* 抗腫瘍免疫誘導能を検討するため、免疫誘導細胞死に特異的に誘導される物質 Calreticulin、HMGB1 をノックアウトした腫瘍細胞を作製後、CVB3 に感染させたノックアウト細胞をマウスに投与し、数日後に新たに腫瘍細胞を投与する。経時的に tumor free マウスの匹数をカウントして抗腫瘍効果を評価し、CVB3 による抗腫瘍免疫に関わる分子を明らかにする。上記の検討を複数の腫瘍細胞を用いて行う。次に、CVB3 の抗腫瘍免疫を最大限利用するため、抑制性免疫チェックポイント分子 PD-L1 を負に制御し、抗腫瘍免疫応答の増強を狙う。また、臨床応用に向けて、担癌マウスに CVB3 を単回あるいは反復投与し、経時的に腫瘍径を測定して抗腫瘍効果を評価すると共に、全身の組織障害などを確認する。

- 1) マウス腫瘍細胞で CVB3 が Calreticulin、HMGB1 を誘導するかを検討する
- 2) Calreticulin、HMGB1 をノックアウトした腫瘍細胞を *in vitro* の系で作製する。
- 3) Calreticulin、HMGB-1 をノックアウトした腫瘍細胞をマウスに投与し、抗腫瘍効果を評価する
- 4) 担癌マウスに CVB3 を投与し、経時的に腫瘍の大きさを測定して抗腫瘍効果を評価する

研究の進め方の修正

既存の治療薬と抗腫瘍効果を比較するため、免疫原性を有する抗がん剤として報告されていた oxaliplatin などによる Calreticulin の誘導を *in vitro* の系で検討したが、既報通りの結果が得られなかったため、他の免疫原性を有する抗がん剤を探索し、CVB3 と抗腫瘍効果と抗腫瘍効果に対する免疫原性の寄与を比較することとした。この抗がん剤の探索に当初予定したよりも長時間を要した。

また、oxaliplatin などで免疫原性が観察できなかつた際に、*in vivo* において免疫細胞の活性や動態を明らかにすべきであると考え、マウス血液中の免疫細胞をフローサイトメーターで解析することとした。そのため、応募時にすでに樹立していた CVB3 の受容体を強制発現させた細胞を作製し直した。すなわち、本研究課題開始前に、蛍光タンパク質の配列を含んだ CVB3 受容体のコントラクトを作製しトランスフェクションしたが、蛍光タンパク質の配列を薬剤耐性遺伝子の配列に置換したコントラクトを作製し、マウス線維肉腫細胞、マウス大腸がん細胞にトランスフェクションし、CVB3 受容体細胞を樹立した。

4. 研究成果

CVB3 がマウス大腸がん細胞、マウス線維肉腫細胞で CVB3 受容体を強制発現した細胞を樹立した

過去の文献から、免疫原性の高いマウスがん細胞として、MCA205 細胞（マウス線維肉腫）と CT26 細胞（マウス大腸がん細胞）を本研究に使用する細胞として候補にあげた。しかし、これらの細胞には CVB3 の受容体である Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (CAR) を発現していなかった。CT26 細胞には、もう 1 つの CVB3 の受容体である CD55 (DAF) も発現しておらず、human CAR、human DAF の配列をもつベクターをトランスフェクションし、human CAR、human DAF を強制発現した細胞を樹立した（図 1）。

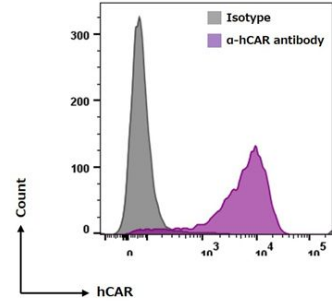


図 1 MCA205-hCAR 細胞の CAR 発現

In vitro の系での樹立した細胞を用いて、CVB3 の細胞傷害性を確認した

で樹立した細胞に *in vitro* で CVB3 を感染させ、細胞死が誘導されるかクリスタルバイオレット法を用いて確認した。MCA205-hCAR 細胞では、CVB3 の感染による細胞死が確認できた（図 2）。しかしながら、CT26-hCAR-hDAF 細胞では、CVB3 の感染による細胞死は観察できなかった。CVB3 が細胞表面の CAR や DAF を介して感染はしたが、細胞内部でのウイルス複製が阻害されるためと考えられる。その原因は明らかではない（図 3）。

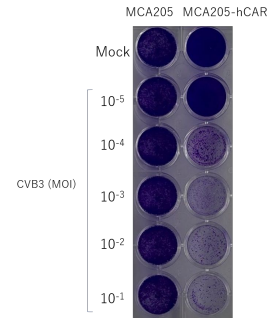


図 2 CVB3 による MCA205-hCAR 細胞傷害性

Calreticulin を最も強く誘導する CVB3 での処理時間を検討した。

の結果を受けて、MCA205-hCAR 細胞を用いて *in vivo* で CVB3 の免疫原性を適切に評価できるように、Calreticulin を最も強く細胞表面に誘導する CVB3 の処理条件を検討した。また CVB3 の抗腫瘍効果を既存の抗がん剤と比較するため、oxaliplatin や cisplatin (CDDP)、dinaciclib などでも Calreticulin の誘導を検討した。細胞表面に誘導された Calreticulin はフローサイトメーターで解析した。その結果、CVB3 を MOI 10^{-3} で 24 時間感染させた時に、コントロール細胞と比較して Calreticulin が強く誘導されることが明らかとなった（図 4）。また、MCA205-hCAR 細胞では、dinaciclib (4 μ M, 24 時間) でコントロール群と比較して有意に Calreticulin が誘導されることが分かり、dinaciclib と CVB3 の抗腫瘍効果を比較することとした（図 4）。

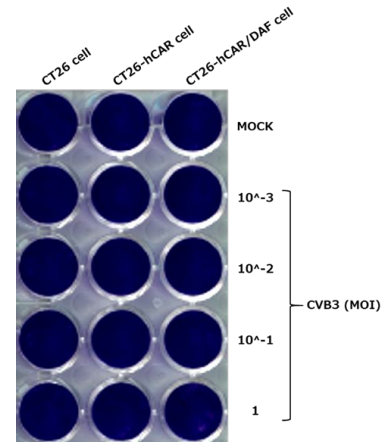


図 3 CVB3 による CT26-hCAR/DAF 細胞傷害性

マウス線維肉腫細胞で Calreticulin、HMGB1 ノックアウト細胞の作製を開始した

当初の研究計画の通り、免疫原性誘導分子である Calreticulin、HMGB-1 の CVB3 の抗腫瘍効果への寄与を検討するため、MCA205-hCAR 細胞で Calreticulin または HMGB-1 をノックアウトした細胞の作製を試みた。TALEN 法を用いたゲノム編集でノックアウト細胞を作製するため、広島大学大学院理学研究科 山本 卓 教授および 佐久間 哲史 講師に TALEN vector を作製して頂き、当研究室にてドナーベクターを作製した。細胞は、本研究期間が終了時点で薬剤選択により樹立中である。

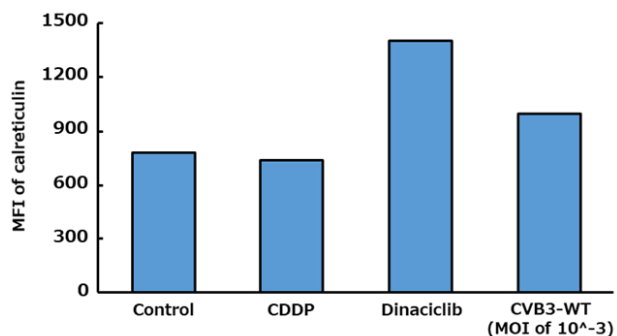


図 4 MCA205-hCAR 細胞表面への Calreticulin の誘導

In vivo 試験で CVB3 の免疫原性を確認した

CVB3 の抗腫瘍効果に ICD が寄与している事を示す実験として、ICD 特異的に誘導される物質が CVB3 の感染によって誘導された腫瘍細胞 (dying cells) を免疫応答性マウスに投与し、マウスの全身の免疫を惹起させた後に生腫瘍細胞 (live cells) の腫瘍形成能を評価する方法を試みた。MCA205-hCAR 細胞に CVB3 を感染させ (MOI 10^{-3} , 18 時間または 24 時間)。

免疫応答性マウスに投与した。一週間後に腹部反対側に生腫瘍細胞を投与するとコントロール群と比べて、CVB3 群で腫瘍径増大の遅れを認めた。この結果から CVB3 がマウスの抗腫瘍免疫を誘導することによって腫瘍の増大をさらに抑制する可能性が考えられた (図 5)。

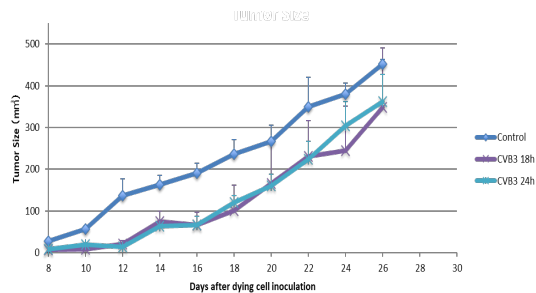


図 5 マウス腫瘍サイズ

樹状細胞と免疫原性誘導細胞を共培養し、T細胞のサイトカイン産生、免疫抑制

MCA205-hCAR 細胞を 10 cm^2 ディッシュに 2×10^7 cells で播種し、CVB3 を異なる MOI で感染させた。ポジティブコントロールとして、dinaciclib (終濃度 $4 \mu\text{M}$) を、ネガティブコントロールとして CDDP (終濃度 $200 \mu\text{M}$) ならびに PBS 処理群を設けた。感染後 4 時間、各々の細胞を回収し 1×10^7 cells/mL に調製した。その後、麻酔下にて C57BL/6J マウス (5 週令、雌、 $n=3$) の右背側部に調製した MCA205-hCAR 細胞を $100 \mu\text{l}$ (1×10^6 cells/head) ずつ皮下投与した。投与 7 日後、深麻酔下にてマウスを犠牲にし、マウス脾臓細胞を得た。得られた脾臓細胞の一部を CD3/28 マイクロビーズ存在下で 3 日間培養した。回収 6 時間前に培地に brefeldin-A を添加し、細胞内サイトカイン (グランザイム B および IFN γ) 産生量をフローサイトメトリーで測定した。その結果、図 6 に示すように CD8 陽性細胞のグランザイム B の産生増加が CVB3 感染細胞を投与したマウスで認められた。一方でマウス樹状細胞と CVB3 感染 MCA205-hCAR 細胞の共培養後、樹状細胞の貪食能と活性化を測定することを試みたが、解析途中で MCA205-hCAR 細胞に樹状細胞マーカーである CD11c が強発現していることが明らかとなり、今後樹状細胞の貪食能と活性化を検討する実験系の確立が急務と考えられた。

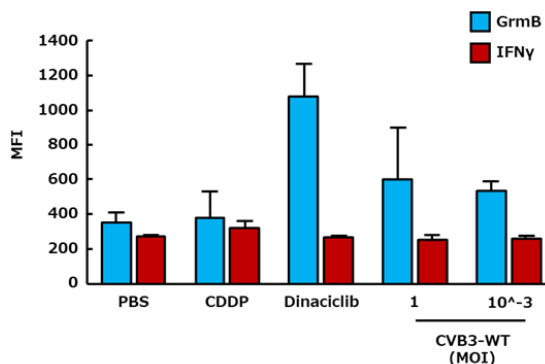


図 6 サイトカイン産生能

5. 主な発表論文等 該当なし

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者
研究分担者氏名：

ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。