

令和元年6月26日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17856

研究課題名(和文) 口腔癌リンパ節転移および骨浸潤の制御を目指した第三世代がん治療用HSV-1の開発

研究課題名(英文) Development of the third generation oncolytic HSV-1 for control of lymph node metastasis and bone invasion in oral cancer

研究代表者

内橋 俊大 (Uchihashi, Toshihiro)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60757839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：新規に作成したKLN205-MUC1マウスモデルは、頸部リンパ節転移を来し、その後肺転移を起こし死に至る、臨床における口腔癌患者の病状進行に類似したモデルである。このモデルを用いて、免疫賦活化第三世代がん治療用HSV-1である、T-B7-1およびT-mfIL-12を用いて作成した舌腫瘍にウイルスを投与すると、頸部リンパ節転移の長期的な抑制効果が見られ、コントロールウイルスであるT-01に比して生存延長効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新たに作成したマウス口腔癌リンパ節転移モデルを用いて、免疫賦活化因子発現型第三世代がん治療用HSV-1は、原発巣に対して極めて有効な治療法であるのみならず、頸部リンパ節転移に対して有効であることが明らかとなり(特に原発巣に投与した際の頸部微小転移に対して)、これらのウイルスを用いることで、これまで制御困難であった頸部リンパ節転移の制御、および口腔癌患者QOLの保持という口腔扁平上皮癌の治療において非常に重要な効果をもたらすことが期待された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the therapeutic efficacy of T-B7-1 or T-mfIL-12, a triple mutated oncolytic HSV-1 expressing soluble murine B7-1, or oncolytic HSV-1 armed with murine interleukin 12 (IL-12) in orthotopic mouse tongue cancer model using KLN205-MUC1 cells. This model reproduces the stepwise development of the disease characterized by local lymph-node metastases followed by lung metastases. The results suggest that T-B7-1 or T-mfIL-12 more prevents the progression of neck lymph node metastases than T-01, a control virus.

研究分野：口腔外科学

キーワード：がんウイルス療法 口腔癌リンパ節転移 抗腫瘍免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は全癌の2%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いるが、進行癌の制御率は未だ充分ではない。さらに口腔は呼吸、咀嚼・嚥下、構音などの生活上で重要な機能が集中した部位であり、手術や放射線治療後の合併症である難治性顎骨髄炎などの機能障害はQOLの著しい低下をもたらすため、低侵襲かつ高い治療効果を持つ新しい治療法の出現が切望されている。

近年、ウイルスゲノムを遺伝子工学的に改変し、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、特に単純ヘルペスウイルス1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。治療用の増殖型変異HSV-1は、癌細胞に感染すると複製し、宿主の癌細胞を死滅させる。複製したウイルスは周囲の癌細胞に感染し、複製細胞死感染を繰り返して抗腫瘍効果を示す。東京大学医科学研究所先端がん治療分野・藤堂具紀教授は、第二世代の遺伝子組み換えHSV-1(G207)の開発、その基礎開発から臨床試験に携わり、治療原理、抗腫瘍効果の機序、他の治療法との併用効果、安全性などを解明した。藤堂らはその開発経験から、G207を改良し、世界で初めて三重変異を有する第三世代遺伝子組換えHSV-1(G47)を作製することに成功した(Todo T et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001)。このG47は、癌細胞でのみ高いウイルス複製能を示し、同時に強力な抗腫瘍免疫を惹起することができ、安全性を維持しながら抗腫瘍効果が格段に向上した。現在、このG47は東京大学医科研病院において膠芽腫に対して医師主導試験が行われ、近い将来の製剤化が目指されている。また、東京大学において、任意の外来遺伝子をG47の基本骨格に組み込むことができるT-BACシステム(Fukuhara H, Todo T et al. Cancer Res 2005)が開発され、短期間で効率よくウイルスを作製することが可能となった。この手法で作成されたG47と同様の機能を有するウイルスはT-01と命名された。このT-01に、マウスにおける抗腫瘍効果を判定するため免疫刺激因子であるマウス可溶性B7-1を遺伝子導入したものは、T-B7-1と命名された。また、その後マウスIL-12を発現するT-mfIL-12が開発され、T-B7-1およびT-mfIL-12はマウス膠芽腫細胞Neuro2a皮下腫瘍モデルおよびマウス腎癌細胞株RenCa尾静脈肺転移モデルにおいてT-01より有意な腫瘍抑制効果を認めた(未発表データ)。

口腔癌の治療においてもG47をはじめとするがん治療用ウイルスを応用することで、治癒の見込めなかった進行癌の制御およびQOLを維持できる低侵襲治療の実現が期待できる。

2. 研究の目的

IL-12はNK細胞を活性化し、Th0からTh1への分化を促進することでT細胞依存性の抗腫瘍免疫を増強する。われわれはこのT-mfIL-12およびT細胞活性の共刺激因子である可溶性B7-1を発現するT-B7-1を用いることで、他の癌腫のようにT-01(G47と同様の効果を有する)よりさらに高い抗腫瘍効果をマウス口腔癌においてももたらすことができるのではないかと考えた。これらのウイルスの効果を検証することで、侵襲度の極めて少ない画期的な口腔癌治療への応用を目指す。

3. 研究の方法

1. T-01と比較した際のT-mfIL-12, T-B7-1のマウス舌がんモデルにおける抗腫瘍効果の検討

東京大学の藤堂、福原等が開発した任意の外来遺伝子をG47の基本骨格に組み込むことができるT-BACシステムを利用して新たに作製された、T-01においてマウスIL-12およびマウス可溶性B7-1を発現するウイルス(T-mfIL-12, T-B7-1)を用いて頸部リンパ節転移に対する抗腫瘍効果の増強の有無を検討することとした。IL-12はNK細胞を活性化し、また、Th0からTh1への分化を促進することでT細胞依存性の抗腫瘍免疫を増強する。我々はこのT-mfIL-12およびT細胞活性の共刺激因子である可溶性B7-1を発現するT-B7-1を用いることでT-01(G47と同様の機能を有する)よりさらにリンパ節転移巣における転移抑制効果を増強できるのではないかと考え、前述の免疫正常能のマウスであるC3Hマウス由来のSCCVII皮下腫瘍モデルおよび舌がんモデル、DBA/2マウス由来のKLN205-MUC1舌がんモデルを用いて、原発進行癌の制御および頸部リンパ節転移抑制効果により、担癌マウス生存延長効果がT-01に比してさらに見られるか検討する。さらにフローサイトメトリーを用いて、免疫担当細胞の動態を観察する。

・SCCVII皮下腫瘍モデルおよび舌腫瘍へのウイルス投与による抗腫瘍効果：原発進行癌への効果の増強の検討を検討。皮下腫瘍では腫瘍体積、舌腫瘍では生存期間および体重測定により比較する。

・KLN205-MUC1舌がんモデルにおける舌腫瘍切除によるリンパ節転移巣のみでの効果の比較：リンパ節転移進行抑制効果の差の検討、リンパ節の大きさ、生存期間により比較)さらに、KLN205-MUC1皮下腫瘍マウスを作成し、KLN205-MUC1舌癌モデルにおけるそれぞれのウイルス投与後7日目の頸部リンパ節からリンパ球を抽出し、皮下腫瘍へ投与し、それぞれのリンパ球が、実際に抗腫瘍免疫がどの程度働くかをin vivoで検討する。加えて、この系を用いて、近年癌治療の実臨床でも用いられている免疫療法との併用を考慮し、マウス抗CTLA-4抗体と

T-B7-1 の併用にて T-01 との併用より抗腫瘍効果が増強するかを、マウス生存期間、リンパ節転移巣の大きさ、ならびにリンパ節内の腫瘍細胞数にて検討する。

2. 顎骨浸潤モデルにおける T-01 および T-mf IL-12 の抗腫瘍効果の検討

顎骨破骨細胞の分化・成熟は、骨芽細胞が分泌する RANKL が前駆細胞の RANK に結合することにより NF- κ B の経路を活性化させおこる。PTHrP はこの骨芽細胞の RANKL 放出を強化し、破骨細胞の活性化の一端を担っている。そのほか、M-CSF や TNF- α も破骨細胞の分化に必要な因子とされている。IL-12 は主に T リンパ球や NK 細胞の活性化を促すサイトカインとして知られているが、骨関連の研究では破骨細胞の分化阻害に関与しているという報告が散見される。その主な機序は、TNF- α に誘導された Fas に対し IL-12 に誘導された FasL が作用することで、アポトーシスを引き起こすというものであり、実際に TNF- α の発現がある場合にのみ IL-12 の破骨細胞への分化を阻害がみられることが明らかとなっている。これらのことを踏まえ、今後マウスの SCC 細胞株である SCCVII を用いた顎骨浸潤モデルに対する、マウスの IL-12 を発現するよう遺伝子導入された第三世代のがん治療用ヘルペスウイルスの治療効果を検討する予定である。このモデルでは、骨浸潤、骨破壊部においては IL-6 や PTHrP、TNF- α などのサイトカイン発現の上昇がみられることが報告されており、ウイルスの発現する IL-12 により顎骨浸潤の抑制効果が期待される。T-01 での骨浸潤部への効果を mock と比較し、顎骨浸潤モデルにおける生存率を比較する。その後、ウイルスが骨浸潤部にまで到達しているのか、HSV の免疫染色で検討する。また、腫瘍浸潤断端での破骨細胞の動態（骨吸収像）を TRAP 染色で検討する。

4. 研究成果

T-01、T-B7-1 は in vitro においてヒトおよびマウスの扁平上皮癌細胞に対し同等かつ十分な殺細胞効果を示した。一方、正常な免疫能を有するマウス皮下腫瘍モデルにおいては、T-01 投与群と比較し、T-B7-1 投与群では有意差をもって腫瘍抑制効果がみられた。また、同マウスの舌癌頸部リンパ節転移モデルにおける抗腫瘍効果の検討においては、舌局所投与において頸部リンパ節の大きさ、及びリンパ節内の腫瘍細胞数に関しては、T-01 は Mock と比し有意差は見られなかったが、T-B7-1 は、Mock に比し有意にリンパ節巣の抑制効果を示した。生存期間においても TB7-1 投与群が長い傾向にあった。KLN205-MUC1 皮下腫瘍マウスを作成し、KLN205-MUC1 舌癌モデルにおけるそれぞれのウイルス投与後 7 日目の頸部リンパ節からリンパ球を抽出し、皮下腫瘍へ投与した実験では、T-01 に比して T-mf IL-12 は有意に腫瘍抑制効果を示し、頸部リンパ節に流入する微量のウイルスが転移頸部リンパ節で周囲のリンパ球を賦活化し、抗癌免疫を増強させる効果が、T-mf IL-12 ではより強いことがわかった。さらに、ウイルスと抗 CTLA-4 抗体を併用したところ、皮下腫瘍モデル及び舌癌頸部リンパ節転移モデルいずれにおいてもウイルスと抗 CTLA-4 抗体の併用群はウイルス単独群と比較し、有意な抗腫瘍効果を示した。以上により、可溶性 B7-1 発現型がん治療用 HSV-1 は、口腔癌、とりわけ頸部リンパ節転移における非常に有効な治療手段の一つとなりうることが示された。また、ウイルス療法単独に加え、免疫チェックポイント阻害剤を併用することにより、更なる効果の増強の可能性が示唆された。

顎骨浸潤モデルに対するウイルスの効果は、生存延長効果は認めるものの、骨内に浸潤した癌細胞への効果が、ウイルスの直接的な殺細胞効果であるか、抗ウイルス免疫の賦活化であるかはまだ判然としておらず、また破骨細胞の動態も現在のところ明らかにはなっておらず今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Fujibayashi Emi, Yabuta Norikazu, Nishikawa Yukihiro, Uchihashi Toshihiro, Miura Daisaku, Kurioka Kyoko, Tanaka Susumu, Kogo Mikihiro, Nojima Hiroshi
「Isolation of cancer cells with augmented spheroid-forming capability using a novel tool equipped with removable filter」
Oncotarget, 2018, DOI; 10.18632/oncotarget.26092 査読有
2. Uchihashi Toshihiro, Ota Kaori, Yabuno Yusuke, Ohno Shouichi, Fukushima Kohshiro, Naito Yoko, Kogo Mikihiro, Yabuta Norikazu, Nojima Hiroshi
「ELAS1 induces apoptotic death in adenocarcinoma DU145 and squamous-cell carcinoma SAS cancer cells, but not in normal KD cells」

〔学会発表〕(計 10件)

1. Kazuki Takahashi, Katarzyna Inoue, Yasuhiro Yoshimatsu, Atsushi Kaida, Kei Takahashi, Shimpei Kubota, Akinari Sugauchi, Toshihiro Uchihashi, Susumu Tanaka, Mikihiko Kogo, Masahiko Miura, Kohei Miyazono, Tetsuro Watabe

「TGF- β -induced cell cycle arrest is associated with increased migration and metastasis of oral squamous carcinoma cells」

11th AACR-JCA Joint Conference (招待講演)(国際学会) 2019

2. Katarzyna A. Inoue, Kazuki Takahashi, Yasuhiro Yoshimatsu, Akinari Sugauchi, Kei Takahashi, Shimpei Kubota, Toshihiro Uchihashi, Atsushi Kaida, Susumu Tanaka, Masahiko Miura, Mikihiko Kogo, Kohei Miyazono and Tetsuro Watabe

「Highly motile oral squamous carcinoma cells responding to TGF- β are under cell cycle arrest」

Keystone Symposia, Cancer Metastasis: The Role of Metabolism, Immunity and the Microenvironment (国際学会) 2019

3. Toshihiro Uchihashi, Akinari Sugauchi, Yasushi Ino, Mikihiko Kogo and Tomoki Todo
「The efficacy of G47 Δ in treating mouse tongue cancer models」

43rd AOMSI Conference, Chennai, 2018 (1st INDO-JAPAN OMS CONFERENCE) (国際学会) 2018

4. Kyoko Kurioka, Toshihiro Uchihashi, Akinari Sugauchi, Hirokazu Nakahara, Yasushi Ino, Mikihiko Kogo and Tomoki Todo

「Therapeutic efficacy of IL-12 expressing oncolytic HSV-1 for neck lymph node metastases in mouse tongue cancer model」

第77回日本癌学会学術総会 2018

5. Akinari Sugauchi, Toshihiro Uchihashi, Yasushi Ino, Mikihiko Kogo and Tomoki Todo

「Efficacy of oncolytic HSV-1 armed with soluble B7-1 in a mouse model for lymph node metastases of tongue cancer」

第76回日本癌学会学術総会 2017

〔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：

古郷 幹彦 Mikihiko Kogo

須河内 昭成 Akinari Sugauchi

栗岡 恭子 Kyoko Kurioka

藤堂 具紀 Tomoki Todo

稲生 靖 Yasushi Ino

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。