

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17959

研究課題名（和文）髄膜腫に対する効率的ながんウイルス療法の確立

研究課題名（英文）Development of the efficient oncolytic virus therapy for meningioma

研究代表者

札幌 博貴（Fudaba, Hirotaka）

大分大学・医学部・助教

研究者番号：00772930

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）：第三世代がん治療用HSV-1であるG47 は、人為的な三重変異によって腫瘍細胞に選択的な高いウイルス複製能をもち、また全身性抗腫瘍免疫を強力に惹起する。このG47 を基盤としたT-hTERTは、ウイルス複製に必要なICP6をhTERTプロモータで制御するため、宿主のリボヌクレオチドレダクターゼに依存せずに複製能を維持する仕組みが施されている。緩徐に増大する髄膜腫を治療対象にした実験モデルの中で、T-hTERTは、コントロールウイルスのT-01と比較し、10倍以上の複製能の上昇が得られ、それに伴う殺細胞効果の上昇が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、切除不能な良性髄膜腫における、複製能を維持したがん治療用ウイルスの開発や、再発、難治性髄膜腫における新たな治療法の開発に繋がると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The third generation oncolytic herpes simplex virus type 1 G47 has artificial triple mutations and exhibits augmented viral replication in tumor cells, enhanced induction of systemic antitumor immunity and high safety features in normal tissues. In this study, we evaluated the therapeutic efficacy of T-hTERT, which regulate ICP6 with hTERT promotor and replicate without dependence on ribonucleotide reductase in host cells to meningioma experimental models. T-hTERT increased more than tenfold replication-competence than T-01, a control virus. In addition, T-hTERT showed excellent cytotoxicity on meningioma models. The results suggest that oncolytic virus therapy will be the new therapeutic strategy for patients with meningiomas.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：髄膜腫 ウイルス療法

1. 研究開始当初の背景

がんウイルス療法とは、正常細胞では複製せず、がん細胞でのみ複製するがん治療用ウイルスを用いて、その直接的な殺細胞効果によりがんの治癒を図る新たな治療法である。**第三代がん治療用 HSV-1 である G47** は、人為的な三重変異によって腫瘍細胞に選択的な高いウイルス複製能をもち、また全身性抗腫瘍免疫を強力に惹起する。そのため、高い安全性を保ちつつ、強力な抗腫瘍効果を呈する (Todo T., et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2001)。2009 年より進行性膠芽腫患者を対象とした臨床研究が実施された結果、G47 の脳腫瘍内投与の安全性が確認され、治療効果も示唆された。2014 年より第二相試験が医師主導治験として開始され、症例登録が進んでいる。膠芽腫以外の難治性がんに対しても適応拡大が期待されており、各臓器がんにおいても基礎研究、臨床研究が進んでいる。

G47 は、HSV-1 ウイルス遺伝子の人為的な三重変異が施されているが、そのうち Infected Cell Protein(ICP)6 遺伝子はリボヌクレオチドレダクターゼ(RR)の大サブユニットをコードし、ウイルス DNA 合成の鍵となる。G47 では ICP6 遺伝子が不活化してあるため、正常細胞ではウイルス複製ができないが、腫瘍細胞では宿主細胞の RR を利用してウイルス複製が可能となる。しかし、ウイルス複製が腫瘍細胞の RR に依存するため、緩徐に増殖する腫瘍組織においては、十分なウイルス複製が行われず、期待される効果が得られないことが危惧される。これを克服するため、ICP6 遺伝子を欠失する代わりに、腫瘍特異的プロモータで ICP6 遺伝子を制御し、腫瘍細胞に限って ICP6 遺伝子が発現するようなウイルス(T-hTERT)が開発された。

また、髄膜腫は、WHO 分類では grade1 から grade3 に分類され、特に grade1 の**良性髄膜腫**は緩徐に増大し、局所神経症状や頭蓋内圧亢進症状を呈する。硬膜を含めた全摘出により長期予後が見られるが、頭蓋底発生の髄膜腫は硬膜を含めた摘出が困難であり、再発をきたしやすい。また、頻度は少ないものの、悪性転化が起こりうるため、残存腫瘍に対する早期治療介入が望まれる。

切除不能な良性髄膜腫や再発、難治性髄膜腫では、手術、放射線療法、化学療法に加える新たな治療法の開発が急務であり、がんウイルス療法を突破口のひとつとして、本研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

申請者は、悪性髄膜腫細胞株への遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1) G47 の治療効果を検討する中で、細胞種によって使用するウイルスの複製能が十分得られないことを見出した。G47 のウイルス複製が宿主のリボヌクレオチドレダクターゼ(RR)活性に依存することが、緩徐に増殖する腫瘍で十分な複製能を保持できない理由と考え、G47 を基盤に作成された、テロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)プロモータで複製能を維持したウイルス(T-hTERT)を研究対象に用いることとした。

本研究は、この T-hTERT とそのコントロールウイルスである T-01 の抗腫瘍効果を培養細胞実験及びマウス腫瘍モデルを用いて検証する。本研究成果が、切除不能な髄膜腫に対する効率的ながんウイルス療法の確立に結び付くことが期待される。

3. 研究の方法

(1). 髄膜腫細胞株の樹立と細胞生物学的評価

髄膜腫細胞株の樹立

がん治療用ウイルスを評価するためには、何種類かの髄膜腫細胞株を用いる必要があるが、髄膜腫細胞株は非常に少ないので(ATCC では取り扱いなく、理研では 1 種類のみ)、当施設で確立された手法を用いて独自に新たな髄膜腫細胞株を樹立する。手術により髄膜腫を摘出し、一部の細胞塊から初代培養を始め、当施設で確立した手法で株化する。

髄膜腫細胞株の細胞生物学的評価

樹立細胞株の TERT や RR 発現を Western blotting で評価する。以上より細胞株それぞれの特徴を評価し、ウイルス投与実験に用いる細胞株を選別する。

(2). 髄膜腫細胞株を用いたがん治療用ウイルスの評価

ウイルス複製能及び殺細胞の検証

T-hTERT と、そのコントロールウイルスである T-01 を用いて、以下の実験を進める。ウイルスを樹立した髄膜腫細胞株に感染させ、24 時間後、48 時間後に細胞を回収する。凍結融解を繰り返し、得られたウイルス液を Vero 細胞に感染させ、ウイルス力価の測定を行う。また、ウイルスを髄膜腫細胞株に感染させ、24 時間後、48 時間後、72 時間後の細胞数を計測する。

RR 発現の比較

ウイルスを髄膜腫細胞に感染させ、24 時間後に細胞を回収し、RR 発現を Western blotting で検証する。

(3) *in vivo* マウス腫瘍モデルの作製(皮下腫瘍および頭蓋内腫瘍モデル)

髄膜腫細胞株をヌードマウスの皮下や頭蓋内に移植し、腫瘍形成能を病理学的に解析する。

(4) マウス腫瘍モデルを用いたがん治療用ウイルスの抗腫瘍効果の評価

腫瘍形成が確認できた細胞株を用いて腫瘍モデルを作製し、mock 群、T-01 投与群、T-hTERT 投与群に分け、ウイルスの腫瘍内投与を行う。皮下腫瘍モデルについては腫瘍体積を、また頭蓋内腫瘍モデルについては生存期間を評価し抗腫瘍効果の評価する。

4 . 研究成果

(1). 髄膜腫細胞株の樹立と細胞生物学的評価

髄膜腫初代培養細胞株の樹立を進め、複数の接着系細胞株と、無血清培地内で sphere を形成しながら増殖し、幹細胞性を模倣する細胞株を保存した。18 種類の 接着系細胞株のタンパクを抽出し、Western blotting で Ribonucleotide reductase(RR)と TERT の発現の有無を確認した。すべての細胞株は TERT の発現がみられた 一方、RR の発現量には差がみられた。RR 発現の少ない髄膜腫細胞株と、RR 発現の多い悪性髄膜腫細胞株を使用することとした。

(2). 髄膜腫細胞株を用いたがん治療用ウイルスの評価

リアルタイムセルアナライザーを用いてウイルスの殺細胞効果を検証した。髄膜腫細胞株によっては、T-01 と比較し T-hTERT では、低いウイルス価においてもより高い殺腫瘍効果が確認できた。ウイルス複製能については、T-01 と比べ、T-hTERT は 10 倍以上の複製能の上昇を示した。

(3) *in vivo* マウス腫瘍モデルの作製(皮下腫瘍および頭蓋内腫瘍モデル)

(4) マウス腫瘍モデルを用いたがん治療用ウイルスの抗腫瘍効果の評価

悪性髄膜腫細胞株をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍形成能を確認した。皮下腫瘍モデルにおいて、mock 群と比較し、T-01 投与群の腫瘍抑制効果を確認できた。良性腫瘍細胞株でのマウスモデル作成や、T-hTERT を加えた治療比較実験は今後の課題である。

T-hTERT は、ウイルス複製に必要な ICP6 を hTERT プロモータで制御するため、宿主の RR 活性に依存せずに複製能を維持する仕組みが施されており、髄膜腫のような緩徐に増大する腫瘍において、複製能を保ち、強力な抗腫瘍効果を発揮する可能性が高いと思われた。これらの研究を通じて、切除不能な良性髄膜腫における、複製能を維持したがん治療用ウイルスの開発や、再発、難治性髄膜腫における新たな治療法の開発に繋がると考えられた。

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 3件）

1. 著者名 Anan Mitsuhiro, Nagai Yasuyuki, Fudaba Hirotaka, Fujiki Minoru	4. 巻 29
2. 論文標題 Lactate and Lactate Dehydrogenase in Cistern as Biomarkers of Early Brain Injury and Delayed Cerebral Ischemia of Subarachnoid Hemorrhage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 104765 ~ 104765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104765	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 Fudaba Hirotaka, Momii Yasutomo, Onishi Kouhei, Asou Daigo, Fujiki Minoru	4. 巻 1
2. 論文標題 ML-07 R-MPV-A THERAPY FOR PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM LYMPHOMA IN THE ELDERLY: OUTCOME AND PROBLEM	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology Advances	6. 最初と最後の頁 ii33 ~ ii33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/oaajnl/vdz039.149	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 Fudaba Hirotaka, Momii Yasutomo, Hirano Takashi, Yamamoto Hidetaka, Fujiki Minoru	4. 巻 30
2. 論文標題 Recurrence of Biphenotypic Sinonasal Sarcoma With Cerebral Hemorrhaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Craniofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 e1 ~ e2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SCS.0000000000004720	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 豊国 公子、札幌 博貴、内田 晋、久光 慶紀、大西 晃平、森重 真毅、下高 一徳、矢野 茂敏、藤木 稔	4. 巻 26
2. 論文標題 Melanocytomaと術前診断した非典型的な画像所見を呈する後頭蓋窩類上皮腫の1例	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 脳神経外科ジャーナル	6. 最初と最後の頁 745 ~ 749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.7887/jcns.26.745	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 Fudaba H, Kubo T, Goda M, Sugita K, Morishige M, Onishi K, Ishii K, Anan M, Nagai Y, Fujiki M.	4. 巻 4
2. 論文標題 The Potentiality for Development of Multiple Dural Arteriovenous Fistulas after Ligation of the Internal Jugular Vein: A Case Report.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 NMC Case Rep J.	6. 最初と最後の頁 71～73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2176/nmccrj.cr.2016-0258	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 -

〔学会発表〕 計16件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 札幌 博貴
2. 発表標題 大分大学におけるR-MPV-A療法の経験
3. 学会等名 PCNSL Seminar in Hiroshima (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 札幌 博貴、初井 泰朋、大西 晃平、麻生 大吾、藤木 稔
2. 発表標題 高齢者中枢神経原発脳悪性リンパ腫に対するR-MPV-A療法の治療成績と問題点
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 札幌 博貴、初井 泰朋、川崎 ゆかり、藤木 稔
2. 発表標題 Well differentiated astroblastoma with focal anaplastic featuresの1例
3. 学会等名 第47回日本小児神経外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 札幌 博貴
2. 発表標題 遺伝子組換えウイルスによるがん治療
3. 学会等名 第18回みちのくウイルス塾（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 札幌 博貴、初井 泰朋、大西 晃平、平野 隆、山元 英崇、藤木 稔
2. 発表標題 初回術後11年後に頭蓋内出血で再発したbiphenotypic sinonasal sarcomaの1例
3. 学会等名 第36回日本脳腫瘍病理学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 札幌 博貴、下村 剛、松田 浩幸、大西 晃平、初井 泰朋、藤木 稔
2. 発表標題 Astrocytic gliomaの予後に関する3 Tesla MRIを用いたPASL、DTI、MRSの解析
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第77回学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 札幌 博貴、初井 泰朋、大西 晃平、松田 浩幸、下村 剛、藤木 稔
2. 発表標題 3 Tesla MRIを用いた初発星細胞系神経膠腫の予後予測に関する検討
3. 学会等名 第36回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 札幌 博貴、下村 剛、松田 浩幸、大西 晃平、初井 泰朋、藤木 稔
2. 発表標題 初発星細胞腫の予後に関する3 Tesla MRIを用いたPASL、DTI、MRSの解析
3. 学会等名 第35回日本脳腫瘍学会学術集会
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
研究協力者	藤木 稔 (Fujiki Minoru)		
研究協力者	藤堂 具紀 (Todo Tomoki)		