

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02876

研究課題名(和文) 増殖型レトロウイルスを用いた遺伝子治療を応用した膵癌の新規治療戦略

研究課題名(英文) Retroviral replicating vector mediated gene therapy activates anti-tumor immune responses in an immunocompetent pancreatic cancer model

研究代表者

平野 聡 (Hirano, Satoshi)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：50322813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：プロドラッグ活性化遺伝子治療(RRV-yCD/5-FC治療)の腫瘍免疫を検討した。マウス膵癌両側皮下腫瘍モデルで、右腫瘍を遺伝子治療し左腫瘍の免疫応答を解析した。右側は治療で腫瘍増大停止し、左側は遅れて増大停止した。CD8+細胞を抽出し細胞傷害効果を判定し抗腫瘍効果を得た。抗PD-1抗体併用で効果は増強した。増強効果はCD8+・CD4+抗体で消退した。CPT-11併用療法を検討したが、感染率が変動し再現性が課題である。K-RASを不活性化する変異体ウイルスを構築した。Host細胞への影響からウイルス産生量が低く、別の誘導型発現システムを構築した。は今後の検討を要す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果で最も重要な点は、遺伝子治療の抗腫瘍免疫応答を介した治療効果は、転移先を想定した対側腫瘍(直接遺伝子治療を行っていない部位)にも効果を発揮するという点である。さらにプロドラッグ投与で膵癌細胞の抗PD-1の発現は高くなり、抗PD-1抗体併用で遺伝子治療の効果はさらに増強された。この治療効果はCD8+ T cellあるいはCD4+ T cellを抑制することで消退し、作用機序としてT cellが重要な役割を果たすことが明らかとなった。既存の化学療法併用における問題点などさらなる課題も示された。効果的な治療法のない転移性膵癌に対し、新規治療法の基盤を提示できた点で意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The prodrug activator gene therapy with Toca511, a tumor-selective retroviral replicating vector encoding an optimized yeast cytosine deaminase (yCD), is a strategy under clinical evaluation for various malignancies. Toca511 exerts direct anti-tumor effects through intratumoral conversion of the prodrug 5-fluorocytosine (5-FC) to the active drug 5-fluorouracil (5-FU) by its encoded yCD, and induce anti-tumor immunity by eliminating immunosuppressive cells. Toca511/5-FC treatment in immunocompetent bilateral subcutaneous Pan02 pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) tumor models were evaluated. The CTL assays and in vivo therapeutic efficacy showed significant regression after 5-FC treatment in Toca511-transduced tumors compared to untransduced control. Furthermore, CD8+ T cells isolated from Toca511/5-FC treated mice showed higher cytotoxicity against Pan02 cells than controls, indicating that has potential to induce anti-tumor immune responses in the PDAC.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 新規遺伝子治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは膵癌の遺伝子治療の臨床応用へ向け、安定した遺伝子導入と腫瘍特異性を兼ね備えた腫瘍選択的増殖型レトロウイルスベクター (RRV; replicating retroviral vectors) を用いた研究を重ねてきた。RRV は核移行シグナルを持たず、静止期の細胞に感染しないため、腫瘍細胞での選択的増殖が期待できる。申請者らはこの RRV を用い、プロドラッグ活性化酵素としてシトシン脱アミノ酵素 (yCD; yeast cytosine deaminase) の遺伝子導入を開発した。yCD を導入された細胞内では、抗真菌薬のフルオロシトシン (5FC) が抗癌剤のフルオロウラシル (5FU) に変換される。したがって、抗真菌薬を全身投与すると、yCD を導入された細胞内では抗癌剤に変換される。これまで膵癌に対する RRV システムは *in vitro*, *in vivo* の効果を証明できたが、臨床応用は確立されておらず、RRV システムが腫瘍免疫に与える影響や、他の抗がん薬との併用療法、また導入遺伝子の新規開発など、集学的治療としての新たな展開が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果を基に、(1) 宿主の免疫応答に着目した遺伝子治療における腫瘍免疫誘導の検証、(2) 現状の膵癌治療に即した抗がん剤と遺伝子治療の併用療法による全身治療への発展、(3) K-Ras を標的とした新規遺伝子治療の開発の三点を主軸に研究し、膵癌新規遺伝子治療の臨床応用へ向けた基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) マウス膵癌細胞同種皮下移植モデルを用い、左右背部に腫瘍を作成し、片方の腫瘍に RRV を感染させる。プロドラッグを投与し、全身の腫瘍免疫反応ならびに両側腫瘍の微小環境を観察する。

(2) 膵癌細胞に RRV システムと CPT-11 または L-OHP のコンビネーションによる効果を isoeffect analysis を用いて検討する。またマウス膵癌 orthotopic tumor model を用い、RRV システムによる治療群と 5FU 投与による治療群において、L-OHP または CPT-11 の上乘せ効果について検討する。

(3) RRV に Dominant negative RAS 変異体 (N116Y/C-de12) を搭載し治療実験を行う。活性化 RAS の GTP 結合部位の 116 番目のコドンのアスパラギンからチロシンに変異させた DN-RAS(N116Y)は活性化を触媒する GEF と不活性な複合体を作成し、RAS シグナルを阻害する。

4. 研究成果

(1) 膵癌細胞同種皮下移植モデルによる治療実験

C57BL6J マウスの両側背部皮下にマウス膵癌細胞株 Pan02 の腫瘍モデルを作成し (右側: RRV-yCD 感染細胞、左側: RRV-yCD 未感染細胞) RRV-yCD/5-FC 治療を行った。治療開始後 2 週および 4 週で、マウス脾臓より CD8+ T cell を分離し CTL assay を行った。治療群のマウス脾臓から分離した CD8+ T cell は未治療群と比較し有意に高い細胞障害活性を示した ($P=0.02$)。同モデルにおける腫瘍径の観察では、RRV-yCD 感染腫瘍は治療による著明な縮小効果を示した。また対側の RRV-yCD 未感染腫瘍においても、治療群では未治療群に比して腫瘍増大が抑制される傾向にあった。これらの結果から、原発巣に対する RRV-yCD/5-FC 治療が抗腫瘍免疫を誘導し、転移病巣などの RRV-yCD 未感染腫瘍においても治療効果を発揮する可能性が示唆された (図 1)。Toca511 の原発巣から対側巣への RRV-yCD の感染拡大は 0.2% で、培養未感染細胞の値と同等で非特異的な検出レベルと判断した。

(2) 腫瘍特異的な T cell による細胞障害活性

前項の RRV-yCD 未感染腫瘍 (臨床では転移巣を想定) の腫瘍縮小効果が、全身に循環する特異的な T-cell による細胞障害活性であるか、の評価をマウスの脾臓から抽出した細胞を用いて検討した。CTL assay は 7-AAD/CFSE Cell-Mediated Cytotoxicity Assay Kit を使用し培

図 1 Toca511 未感染腫瘍に対する抗腫瘍効果

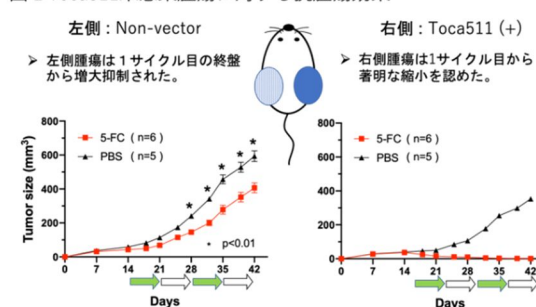
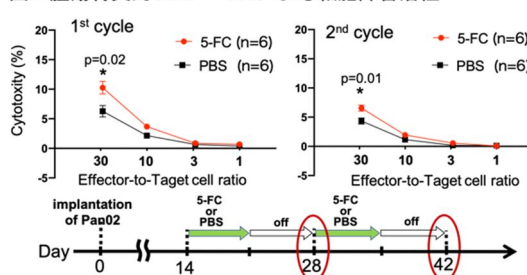
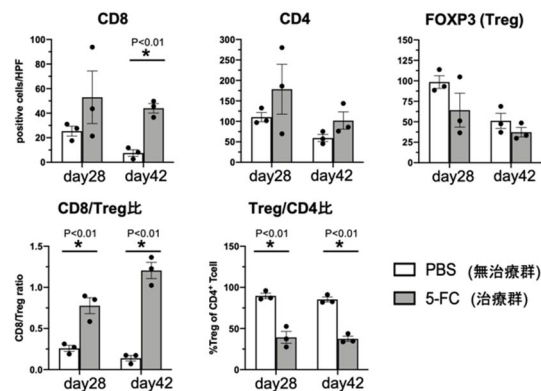


図 2 腫瘍特異的な CD8+ T cell による細胞障害活性



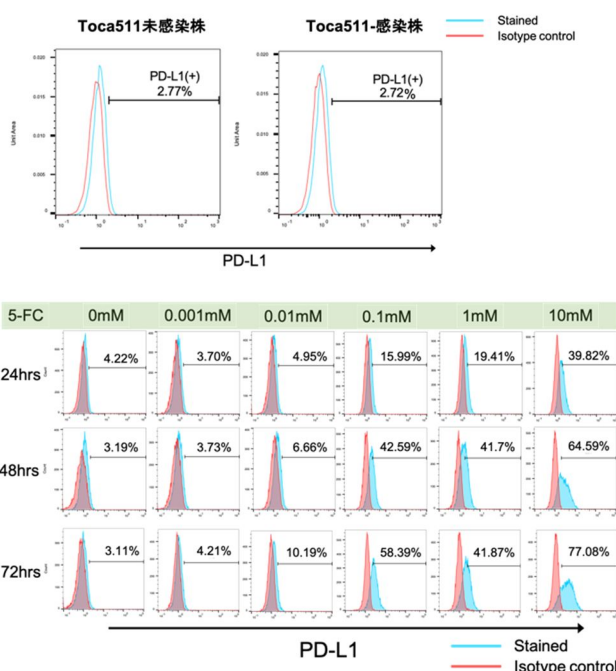
養から採取した Pan02 を Target cell、脾臓より抽出した T cell を Effector cell として使用した。結果 CD3+ T cell で行った CTL assay では、1 サイクル目・2 サイクル目共に治療群とコントロール群で細胞障害活性に有意な差は認めなかったが、CD8+ T cell では、day28, day42 とともに治療群で有意に細胞障害活性が高かった (図 2)。次に RRV-yCD 未感染腫瘍を病理組織学的に評価した。腫瘍中心部・辺縁部それぞれで、CD4, CD8, FOXP3 (Treg) について免疫染色を施行したところ、いずれの部位も CD8/Treg 比が高く、Treg/CD4 比が低い結果であった (図 3)。

図 3 Toca511未感染腫瘍の病理組織学的評価



以上より Toca511/5-FC 治療は抗腫瘍免疫応答を誘導し、Toca511 が感染した腫瘍だけでなく、未感染の腫瘍にも治療効果を示し、制御性 T-cell を抑制し細胞障害性 T-cell が活性化する宿主の腫瘍免疫機能に対して有利な微小環境を構築することが示唆された。一般的な 5FU 化学療法を施行した場合、免疫細胞の働きは抑制され、腫瘍免疫には不利な状況となるが、Toca511 治療は細胞内で 5FU に変換されるため、全身の血液細胞への影響は見られず、直接の癌細胞破壊に伴う抗原提示から効率よく抗腫瘍免疫が誘導されたと考える。従って、次に考えるべき課題は Toca511 治療と抗 PD-1 抗体などの制御性 T-cell 系を遮断する治療との組み合わせである。

図 4 膵癌細胞のPD-L1発現変化 (Pan02)



(3) 膵癌細胞における PD-L1 の発現変化と脾臓・血液中の T cell における PD-1・PD-L1・CTLA-4 の発現変化

Toca511 治療と抗 PD-1 抗体療法のコンビネーションを行う場合に重要となるのは、膵癌細胞における PD-L1 の発現状況である。これまでの臨床試験では膵癌に対する抗 PD-1 抗体療法は期待した効果が得られていない。そこで Toca511 治療に用いる、Toca511 ウイルスならびにプロドラッグである抗真菌剤 5FC の投与により、膵癌細胞の PD-L1 の発現変化を観察した。結果、もともと Pan02 における PD-L1 は発現低く (2.7%)、Toca511 感染しても PD-L1 上昇は見られなかった。しかし、プロドラッグ 5FC の投与により、濃度依存性、時間依存性に最大 77%まで PD-L1 の発現量が増加することが分かった。0.1mM は in vivo の 5FC 投与で達成される血中濃度に相当し、本実験では 72 時間で PD-L1 の発現は 58%に到達する (図 4)。一方、5Fu の暴露 (投与) による PD-L1 の発現変化では、1 μM が治療中に血中に漏れ出うる最大濃度 (代謝されるため腫瘍に届く際にはさらに低濃度になる) であるが、この条件下で 10%であった。以上より、膵癌細胞の PD-L1 の発現は薬剤投与により変動し、Toca511 のプロドラッグ投与下において増強される可能性が示唆される結果となった。

次に、治療経過中の T cell における PD-1・PD-L1・CTLA-4 の発現変動に伴い、PD-1 抗体の治療効果が影響を受ける可能性があるため、5FC 投与下の T cell における PD-1・PD-L1・CTLA-4 の発現変化について検討した。結果は、末梢血ならびに脾臓から抽出した CD8 T cell は、各分子の発現量に変化なく、CD4 T cell は、末梢血・脾臓ともに PD-L1・CTLA-4 の発現が僅かに低下した。

(4) 抗 PD-1 抗体併用による RRV-yCD 未感染腫瘍の腫瘍縮小効果と CD4/CD8 抗体による治療効果の消失 (リバース) 評価

前項の結果で 5FC 投与による膵癌細胞の PD-L1 発現が増強することから、RRV-yCD 感染腫瘍への治療による対側の RRV-yCD 未感染腫瘍 (臨床での転移巣) の縮小効果が、抗 PD-1 抗体併用でさらに増強するかどうかを検討した。結果、Toca511/5FC+PD-1 群は多重比較検定にて 5FC 群、PBS 群と腫瘍増殖抑制効果と生存で有意差を認めた (図 5)。

さらに、この抗 PD-1 抗体併用による RRV-yCD 未感染腫瘍の腫瘍縮小効果を、抗 CD4/CD8 抗体による治療効果の消失（リバース）が起こるかを評価した。まず、CD8, CD4 抗体が計画した投与方法でそれぞれの T cell を抑制できるか脾臓・血液中の CD4, CD8 T Cell 比率を day 26, 33, 40 にフローサイトメトリーにて評価した。結果、血液中・脾臓中いずれも十分に抑制されていることが確認された。また両側腫瘍実験では、CD4, CD8 抑制抗体使用群は PBS 群と同等の腫瘍再増大を示し、抗 PD-1 抗体併用による RRV-yCD 未感染腫瘍の腫瘍縮小効果は CD4/CD8 抗体により再増大（リバース）されることが確認された（図 6）。またこの実験で PD-1 抗体併用群の治療効果は再現性が得られた。

以上の結果から、Toca511/5-FC 治療により得られた抗腫瘍免疫応答を介した治療効果は、抗 PD-1 抗体を併用することで増強され、この治療効果は CD8+ T cell あるいは CD4+ T cell を抑制することで消滅し、作用機序として T cell が重要な役割を果たすことが示された。

(5) RRV システムと化学療法の併用療法の検討

in vitro で CPT-11 との併用療法の検討を施行したが、RRV システムの感染効率の違いにより抑制効果の変動し、データの再現性は得られなかった。そこで、感染率 100%の細胞株を用いて再検討を行なった。しかし、RRV システムの効果が高く、CPT-11 の併用の上乗せ効果は十分と言えず、本研究期間内に至適コンビネーションの割合を樹立する段階に到達できなかった。In vivo を用いた検討から開始するなど、今後の課題として残された。

(6) K-Ras を標的とした新規遺伝子治療の開発

K-RAS を不活性化する新規 RRV として、Dominant negative RAS 変異体 (N116Y/C-de12) を構築した。しかし Host 細胞のウイルス産生効率が上がらず、腫瘍縮小実験に用いる高い濃度のウイルス量を得ることができなかった。考察としては、N116Y/C-de12 そのものが Host 細胞に影響し、ウイルス産生の障害をもたらした可能性が指摘された。そこでデキサメタゾン誘導型発現システムを構築した。しかしこのシステムでは、発現誘導と非誘導の際の発現量の差が 20%程度に留まり、腫瘍縮小効果の差を見出すのは困難と判断した。現在テトラサイクリン誘導型を用いたコンストラクトを構築し、この課題を克服するよう研究を継続している。

以上 (5) (6) に関しては今後も研究継続を行う予定である。

図 5 抗PD-1抗体併用による治療効果の増強

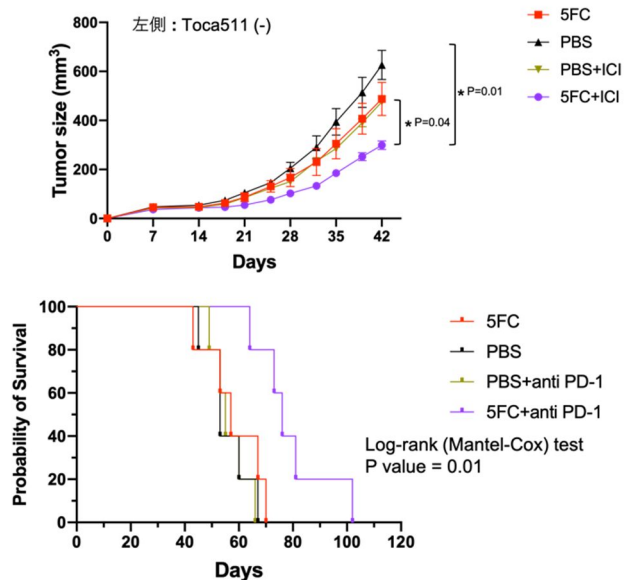
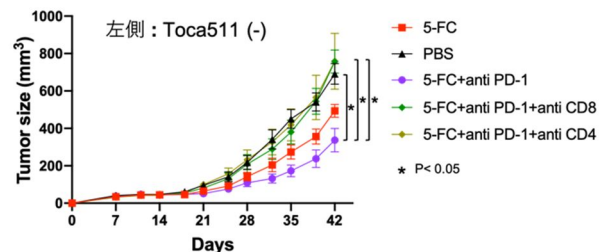


図 6 抗 CD4/CD8 抗体併用による治療効果の消失



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiroki Niwa, Toru Nakamura, Hiroki Kushiya, Kazuho Inoko, Kei Hiraoka, Akihito Inagaki, Takahiro Tsuchikawa, Toshiaki Shichinohe, Douglas J Jolly, Noriyuki Kasahara, Satoshi Hirano
2. 発表標題 プロドラッグ活性化遺伝子治療（Toca 511/5-FC治療）により誘導された抗腫瘍免疫応答の膀胱癌モデルに対する治療効果
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丹羽弘貴、中村透、櫛谷洋樹、猪子和穂、土川貴裕、平岡圭、七戸俊明、平野聡
2. 発表標題 膀胱癌に対するプロドラッグ活性化遺伝子治療（Toca 511/5-FC治療）で誘導された抗腫瘍免疫応答による腫瘍縮小効果
3. 学会等名 第100回北海道医学大会腫瘍系分科会・第122回北海道癌談話会
4. 発表年 2020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	七戸 俊明 (Shichinohe Toshiaki) (70374353)	北海道大学・医学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	土川 貴裕 (Tsuchikawa Takahiro) (50507572)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	中村 透 (Nakamura Toru) (70645796)	北海道大学・医学研究院・助教 (10101)	
研究分担者	平岡 圭 (Hiraoka Kei) (10719587)	北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関