

令和 4 年 4 月 29 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08988

研究課題名(和文) 不活化ウイルス粒子を用いたグリオーマに対する多角的免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of multifaceted immunotherapy for glioma using inactivated viral particle

研究代表者

松田 真秀 (Matsuda, Masahide)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30614333

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)：HVJ-E (HVJ envelope) はセンダイウイルス (HVJ: hemagglutinating virus of Japan) のゲノムRNAを破壊し複製能力を失わせた不活化粒子である。HVJ-Eは内部に封入した治療分子を標的細胞に導入することが可能なベクターであるとともに、それ自身が抗腫瘍免疫を誘導するという特徴を有する。本研究では、HVJ-EをベクターとしてPD-L1発現阻害分子を腫瘍へ届けることにより、HVJ-E自身の抗腫瘍免疫活性化作用と導入した核酸による腫瘍PD-L1分子発現阻害を組み合わせることで、グリオーマに対する相乗的な抗腫瘍免疫の活性化を誘導する新規免疫療法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリオーマに対する免疫療法研究において、腫瘍局所での免疫逃避機構の制御が重要であることが明らかとなり、特にPD-1/PD-L1経路などの免疫逃避機構を標的とした治療法に関する研究がさかんに行われている。本研究は、PD-1/PD-L1経路のみならず制御性T細胞をも標的とし、腫瘍局所で免疫逃避機構を多角的に解除するというこれまでにない新たなアプローチであり、革新的な免疫療法といえる。不治の病であるグリオーマに対して、このような新規性の高い治療法の開発は、グリオーマ治療のブレイクスルーとなりうることから社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E) is a replication-defective inactivated virus particle made from Sendai virus (HVJ) by treating with ultraviolet irradiation to destroy the viral genome RNA. HVJ-E enhances anti-tumor immunity through activation of effector T cells and natural killer cells and inhibition of regulatory T cells (Treg), although it was originally developed as a versatile drug delivery system. In the present study, we incorporated siRNA targeting PD-L1 into HVJ-E to suppress tumor PD-L1 expression and demonstrated significant antitumoral effects in mouse brain glioma models due to synergistic activation of anti-tumor immunity. We developed a novel immunotherapeutic approach against glioma to combine the immune-activating and Treg suppressive features of HVJ-E itself with siRNA-mediated PD-L1 inhibition.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：不活化ウイルス粒子 グリオーマ 制御性T細胞 免疫チェックポイント PD-L1

1. 研究開始当初の背景

(1) グリオーマは、脳の支持組織であるグリア細胞が発生起源とされる原発性脳腫瘍であり、浸潤性の発育形態を示すことから手術での治癒的切除は不可能で、治療後も再発を繰り返す難治性疾患である。手術、放射線治療、化学療法、分子標的療法を併用した集学的治療を行っても治癒が見込めないことから、新たな治療戦略の開発が社会的課題となっている。そのなかで免疫療法は最も有望なアプローチとして期待され、様々な治療法開発が行われているものの、実臨床における治療効果ははまだ限定的である。その原因として、腫瘍の免疫逃避機構の存在に近年注目が集まっており、制御性 T 細胞の存在とともに、免疫チェックポイントの PD-1/PD-L1 経路が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。それらの知見を背景に、腫瘍局所での免疫逃避機構の制御という観点からの治療法開発が期待されている。

(2) HVJ-E は、センダイウイルス (HVJ) に紫外線を照射することで、ウイルスのゲノム RNA を破壊して複製能を消失させたウイルス由来不活化粒子である。HVJ-E は複製能を欠くものの、細胞表面のガングリオシドを介した膜融合にて標的細胞に取り込まれる能力を保持しており、内包した核酸・タンパク・薬剤などの物質を標的細胞の細胞質へと効率的に届けられることができる有用なベクターである。HVJ-E の注目すべき特徴として、HVJ-E 自身が抗腫瘍免疫を強力に誘導することが挙げられる。細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞を活性化させるのみでなく、制御性 T 細胞による免疫逃避機構を解除することにより抗腫瘍免疫反応を誘導する点が非常に特徴的である。

2. 研究の目的

HVJ-E をベクターとして使用し、腫瘍細胞の PD-L1 発現を抑制する核酸を届けることで、HVJ-E 自身が持つ抗腫瘍免疫の誘導作用と制御性 T 細胞抑制による免疫抑制の解除、そして PD-1/PD-L1 経路阻害による免疫抑制の解除を組み合わせ、腫瘍局所で多角的に免疫逃避機構を解除するというグリオーマに対する新規免疫療法の開発を行うことである。

3. 研究の方法

・マウスグリオーマ細胞株 TS、GL261、RSV-M を用いて、HVJ-E をベクターとした PD-L1 発現抑制効率を評価し、複数作製した PD-L1 siRNA の候補選定と HVJ-E に封入する至適核酸量の検討を行った。

・マウス皮下腫瘍モデルにおいて、HVJ-E をベクターとした PD-L1 siRNA 投与による発現抑制効果を、Western blot および免疫組織化学染色 (IHC) を用いてタンパク発現で評価した。

・マウス皮下腫瘍モデルにおいて、治療後の腫瘍増大抑制効果を評価し、マウス脳腫瘍モデルにおいては、治療後の生存期間延長効果を評価した。

・マウス皮下腫瘍モデルおよび脳腫瘍モデルにおいて治療後に腫瘍検体を摘出し、IHC で腫瘍に浸潤している白血球の評価を行った。

・マウス脳腫瘍モデルにおいて、治療後にマウス脳を摘出し、flow cytometry を用いて脳に浸潤している白血球を評価した。

4. 研究成果

・3種の細胞株を用いて siRNA による PD-L1 mRNA 発現抑制効率を評価したところ、同一の候補 siRNA が最も強い発現抑制を発揮したため、これを動物実験で用いることとした。PD-L1 siRNA を内包させた HVJ-E の投与量を変化させて発現抑制効率を評価したところ、幅広い投与量で同等の発現抑制が生じることが判明した。

・動物実験では生着発育効率の最も良い TS 細胞株を用いることとした。はじめにマウス皮下腫瘍モデルでの PD-L1 発現抑制効果を評価したところ、コントロール群および HVJ-E 単独群に比べて著明なタンパク発現低下が確認された。

・マウス皮下腫瘍モデルで腫瘍体積の経時的変化を評価すると、PD-L1 siRNA 含有 HVJ-E 群は HVJ-E 単独群に比べて有意に体積が小さかった。IHC での腫瘍浸潤白血球評価では、PD-L1 siRNA 含有 HVJ-E 群において CD8+T リンパ球・CD4+T リンパ球・NK 細胞が増加していた。

・マウス脳腫瘍モデルで生存期間を観察すると、PD-L1 siRNA 含有 HVJ-E 群で他の 2 群と比べて有意に生存期間が延長していた。IHC での腫瘍浸潤白血球評価では、PD-L1 siRNA 含有 HVJ-E 群において浸潤している CD8+T リンパ球が増加している所見を認めた。

・flow cytometry での脳浸潤白血球の評価では、全白血球における CD8+T リンパ球と NK 細胞は、他の 2 群と比べて PD-L1 siRNA 含有 HVJ-E 群で有意に増加していた。リンパ球中の制御性 T 細胞比率は、HVJ-E を投与した 2 群 (PD-L1 siRNA 含有 HVJ-E 群および HVJ-E 単独群) で、コントロール群と比べて有意に低かった。制御性 T 細胞比率に関しては、PD-L1 siRNA 含有 HVJ-E 群と HVJ-E 単独群とでほぼ同等の結果だった。これらの結果より、PD-L1 siRNA 含有 HVJ-E 投与による抗腫瘍効果は CD8+T リンパ球と NK 細胞の上昇および制御性 T 細胞比率の減少によってもたらされていることが示唆された。

- ・ CD8+T リンパ球の治療効果への寄与度を評価するため、CD8 を除去したマウス脳腫瘍モデルを作成し、PD-L1 siRNA 含有 HVJ-E 群と HVJ-E 単独群の 2 群で生存期間を評価した。その結果、CD8 除去によって 2 群間の生存期間の差が消失したことから、HVJ-E に加えて PD-L1 阻害を行うことによる上乗せの抗腫瘍効果は、主に CD8+T リンパ球によってもたらされていると示唆された。
- ・ 本研究では、ベクター自身が免疫刺激性と制御性 T 細胞抑制性の特徴を併せ持つ HVJ-E に、siRNA を介した腫瘍 PD-L1 の阻害を組み合わせるという新たなアプローチによる、マウスの皮下および脳腫瘍モデルでの抗腫瘍効果を明らかにした。PD-L1 siRNA 含有 HVJ-E 投与により強力な抗腫瘍免疫反応が惹起されており、特に CD8+T リンパ球によって抗腫瘍効果がもたらされていた。この非増殖性ウイルス療法は、グリオーマ患者に対する新たな治療選択の一つになりうると期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sugii Narushi, Matsuda Masahide, Okumura Genki, Shibuya Akira, Ishikawa Eiichi, Kaneda Yasufumi, Matsumura Akira	4. 巻 112
2. 論文標題 Hemagglutinating virus of Japan envelope containing programmed cell death ligand 1 siRNA inhibits immunosuppressive activities and elicits antitumor immune responses in glioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 81～90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14721	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉井成志、松田真秀、奥村元紀、渋谷彰、石川栄一、松村明
2. 発表標題 不活化センダイウイルス粒子と腫瘍PD-L1発現阻害は局所での免疫抑制を二重に解除し神経膠腫に対する抗腫瘍免疫を惹起する
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第79回学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉井成志、松田真秀、奥村元紀、渋谷彰、石川栄一、松村明
2. 発表標題 腫瘍PD-L1発現阻害と制御性Tリンパ球抑制の併用による悪性神経膠腫に対する新規抗腫瘍免疫療法の開発
3. 学会等名 第57回ニューロ・オンコロジーの会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉井成志、松田真秀、奥村元紀、渋谷彰、石川栄一、松村明
2. 発表標題 制御性Tリンパ球抑制と腫瘍PD-L1発現阻害の併用による悪性神経膠腫に対する新たな抗腫瘍免疫療法の開発
3. 学会等名 第20回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉井成志、松田真秀、奥村元紀、渋谷 彰、石川栄一、松村 明
2. 発表標題 制御性Tリンパ球抑制と腫瘍PD-L1発現阻害の併用による悪性神経膠腫に対する免疫抑制的腫瘍微小環境の改善
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉井成志、松田真秀、奥村元紀、渋谷 彰、石川栄一、松村 明
2. 発表標題 腫瘍PD-L1発現阻害と制御性Tリンパ球抑制の併用による悪性神経膠腫に対する新たな抗腫瘍免疫療法の開発
3. 学会等名 第78回日本脳神経外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉井成志、松田真秀、奥村元紀、渋谷 彰、石川栄一、松村 明
2. 発表標題 腫瘍PD-L1発現阻害と制御性Tリンパ球抑制の併用による新たな抗腫瘍免疫療法の開発
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉井成志、松田真秀、奥村元紀、渋谷彰、石川栄一、松村明
2. 発表標題 腫瘍 PD-L1 発現阻害と制御性Tリンパ球抑制の併用による新たな抗腫瘍免疫療法の開発
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 杉井成志、松田真秀、奥村元紀、渋谷彰、石川栄一
2. 発表標題 PD-L1に対するsiRNAを封入したHVJ-Eはマウス神経膠腫に対し抗腫瘍免疫反応を惹起する
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021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	石川 栄一 (Ishikawa Eiichi) (30510169)	筑波大学・医学医療系・准教授 (12102)	

	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	杉井 成志 (Sugii Narushi) (10851090)	筑波大学・附属病院・病院講師 (12102)	

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
---------	---------