

令和 3 年 6 月 27 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16327

研究課題名(和文) 免疫チェックポイント阻害作用の長期維持を目指した抗がん免疫ウイルス療法の新規開発

研究課題名(英文) Development of oncolytic virotherapy for maintaining long period effects of the immune checkpoint inhibitor

研究代表者

辻 俊明 (Tsuji, Toshiaki)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：20549737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒトsoluble PD-1 (sPD-1)遺伝子を抗がんヘルペスウイルスに導入して免疫チェックポイント阻害作用を持つ抗がんヘルペスウイルス開発を目的とした研究を行った。ヒトcDNAライブラリーおよびヒト血液サンプルmRNAからのクローニング・シーケンスを行ったがいずれも目的とするsPD-1 cDNAの作成には至っていない。原因としてはsPD-1遺伝子はPD-1分子のsplice variantで、通常のPD-1遺伝子と比べてcDNAライブラリーおよびサンプル中の含有量が少ないためと考えられ、国内外からの研究施設からのcDNAの入手し研究を継続の予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではヒトsoluble PD-1 (sPD-1)遺伝子を抗がんヘルペスウイルスに導入して免疫チェックポイント阻害作用を持つ抗がんヘルペスウイルス開発を目的とし、sPD-1発現による抗腫瘍効果の増強が確認できれば動物実験を含めた前臨床的研究への発展が期待できるがsPD-1遺伝子のクローニングが予想よりも困難な状態で当初計画していた抗がんウイルス療法への応用が難しい。今後も研究継続を行うことにより抗がんウイルス療法の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Development of gastric cancer therapy using oncolytic virus armed with immune checkpoint inhibition is hopeful. We chose soluble PD-1 (sPD-1) gene for immune checkpoint inhibitory gene. We have started cloning of sPD-1 gene from cDNA library and blood sample, but we did not have obtained sPD-1 gene from neither of them. We are now continuing cloning of sPD-1.

研究分野：消化器外科学

キーワード：抗がんウイルス 胃がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌は世界で年間 98 万人が罹患し、84 万人が死亡しており、我が国においても進行がんでは死亡率は高く治療成績の向上が求められている。切除不能・進行再発胃癌での治療には従来からの抗がん剤治療、新規治療として Nivolumab に代表される免疫チェックポイント阻害剤による治療が開始されているが先行して使用が開始されている肺がん領域でもその効果は全例に効果があるわけではなく、従来型の抗がん剤とは異なる免疫関連副作用(irAE)も認められるというのが現状である。我々の教室では抗がんヘルペスウイルス療法によるがん治療開発をおこなっており、機能遺伝子をこのウイルスに搭載することにより効果増強を確認している(Int J Cancer 2013)。免疫チェックポイント阻害作用を持つ機能遺伝子を私たちがこれまで用いてきた抗がんヘルペスウイルスに搭載して腫瘍局所で発現させ、より強力な免疫誘導をもった抗がんウイルス療法を行い副作用の低減を行えると考えた。

2. 研究の目的

本研究では私たちがこれまで開発してきた武装型抗がんウイルス療法に免疫チェックポイント阻害作用を持つ可溶性 soluble PD-1 Programmed cell death protein (sPD)-1 分子を搭載して胃がん細胞内で発現させることにより腫瘍免疫の賦活化を行うことで抗がん作用を増強する抗がん免疫ウイルス療法を確立することを目的とした。sPD-1 は PD-1 の膜貫通ドメインのエクソン 3 が欠失したスプライシング変異で T 細胞性免疫を阻害する PD-L1、PD-L2 および B7-1 の全ての組み合わせを抑制でき(J Immunother 2011)、血清 sPD-1 レベルを低く維持されるため副作用を低減でき(Int J Cancer 2006)、高用量、頻回の投与が必要ないため費用対効果が高いと考えられている。そのため抗 PD-1 モノクローナル抗体よりも有効であると考えられている。これまでに抗がんウイルスと免疫チェックポイント阻害剤を併用した研究は存在するが抗がんヘルペスウイルスに免疫チェックポイント阻害作用をもつ sPD-1 分子を付加して治療を行う研究は本研究が初めてである。抗がんヘルペスウイルスが sPD-1 を発現することによりがんの局所で抗がんウイルスの増殖・がん細胞の破壊とともにがん由来の抗原が放出されてさらに免疫チェックポイント阻害作用のある sPD-1 の転写産物が産生されるため免疫賦活作用がより増幅され、抗がん作用が増強されると考えられる。

3. 研究の方法

(1) ヒト soluble PD-1 遺伝子発現型抗がんヘルペスウイルスの作成とその複製能・抗腫瘍効果の確認

ヒト soluble PD-1(sPD-1) mRNA をヒト cDNA ライブラリーよりプライマーを用いて PCR 法にて増幅し電気泳動で回収し(Cancer Res.2017) TArget Clone plus (TOYOBO) を用いて TA クローニングして pTA2-sPD-1 を作成して増幅させる。シャトルベクターSV01 のクローニングサイトに作成した cDNA を挿入し SV-sPD-1 を作成する。作成した新たなシャトルベクターおよびシャトルベクターSV01 を BAC ベクター-T-BAC とともに Cre 組換えを用いて BAC ベクターに取り組み、Vero 細胞に FLP 組換え用ベクター-pOG44 (Invitrogen) とともにリポフェクションさせて FLP/FRT 組換えで遺伝子発現型ウイルス T-sPD-1、遺伝子発現のないウイルス T-01 を作成する。sPD-1 発現をウエスタンブロットで確認する。

Vero 細胞、胃がん細胞株に T-sPD-1、T-01 をそれぞれ感染させて回収し、Vero 細胞を用いてプラ

ーク数を測定し、ウイルス複製能を確認する。またウイルスを胃癌細胞株に感染させて抗腫瘍効果をセルカウントで確認する。

(2) 胃癌患者での免疫チェックポイント阻害薬への耐性遺伝子の確認

胃癌患者において免疫チェックポイント阻害薬への耐性遺伝子変異を確認するため患者サンプルを用いて droplet digital PCR 装置を用いて確認を行う。

4. 研究成果

(1) Clontech 社の各種ヒト cDNA ライブラリーからのプライマーを用いた増幅を行い、TA クローニングベクターへの導入を行いシーケンスを行ったが目的とする soluble PD-1 cDNA は増幅を確認できなかった。続いて健常ヒト血液サンプルからのクローニングを試みたがシーケンスでの目的配列の確認はできなかった。さらにがん患者サンプルでのクローニングも行っているが soluble PD-1 遺伝子は PD-1 分子の splice variant で、サンプル中の含有量が少ないためかクローニングしたサンプルのシーケンスでは目的とする遺伝子配列は認めず、soluble PD-1 mRNA からの cDNA 作成には未だ至っていない。現在、ヒト soluble PD-1 cDNA 遺伝子の購入または他施設からの入手を計画している。

(2) 患者サンプルでの droplet digital PCR による免疫チェックポイント阻害薬への耐性の原因となる遺伝子についても検討を行っているが候補となる遺伝子について droplet digital PCR の至適条件の検討を行っている。この結果を利用してさらなる候補遺伝子の検討を予定しているが検出が困難な場合には次世代シーケンスの利用による遺伝子変異の検出を検討することとしている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Matsumura Shuichi, Nakamori Mikihiro, Tsuji Toshiaki, Kato Tomoya, Nakamura Masaki, Ojima Toshiyasu, Fukuhara Hiroshi, Ino Yasushi, Todo Tomoki, Yamaue Hiroki	4. 巻 12
2. 論文標題 Oncolytic virotherapy with SOCS3 enhances viral replicative potency and oncolysis for gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 344 ~ 354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.27873	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 Tsuji Toshiaki, Ojima Toshiyasu, Nakamori Mikihiro, Nakamura Masaki, Katsuda Masahiro, Hayata Keiji, Kitadani Junya, Maruoka Shimpei, Shimokawa Toshio, Yamaue Hiroki	4. 巻 20
2. 論文標題 Triangulating stapling vs functional end-to-end stapling for cervical esophagogastric anastomosis after esophagectomy for thoracic esophageal cancer: study protocol for a randomized controlled trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trials	6. 最初と最後の頁 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13063-019-3201-2	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 Ojima Toshiyasu, Nakamura Masaki, Nakamori Mikihiro, Katsuda Masahiro, Hayata Keiji, Tsuji Toshiaki, Maruoka Shimpei, Yamaue Hiroki	4. 巻 6
2. 論文標題 Endoscopic treatment of esophageal fistulas after esophagectomy with injection of an alpha-cyanoacrylate monomer: a phase II study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endoscopy International Open	6. 最初と最後の頁 E1093 ~ E1099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/a-0581-9005	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 Nakamura Masaki, Ojima Toshiyasu, Nakamori Mikihiro, Katsuda Masahiro, Tsuji Toshiaki, Hayata Keiji, Kato Tomoya, Yamaue Hiroki	4. 巻 23
2. 論文標題 Conversion Surgery for Gastric Cancer with Peritoneal Metastasis Based on the Diagnosis of Second-Look Staging Laparoscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Gastrointestinal Surgery	6. 最初と最後の頁 1758 ~ 1766
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11605-018-3983-7	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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