

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007-2008
課題番号：19591930
研究課題名 (和文) 卵巣癌・腹膜癌を標的とした新規がんウイルス療法の開発
研究課題名 (英文) Development of a novel oncolytic virotherapy for ovarian cancer and primary peritoneal serous carcinoma.
研究代表者 那波明宏 (NAWA AKIHIRO) 名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授 研究者番号：90242859

研究成果の概要：

上皮性卵巣癌の治療成績は向上したが、進行卵巣癌(III、IV期)での5年生存率は、未だ30%程度である。特に、腹腔内病変IIIc期の5年生存率が約20%であり、治療成績改善のためには腹腔内病変のコントロールが最重要となるため、腹膜播種病変に対する治療の研究・開発は、まず検討されるべき重要課題である。さらに、2006年ASCOで発表されたGOG182の検討では、卵巣癌に有用とされる薬剤の組み合わせだけでは長期生存は改善されず、化学療法以外の新規治療戦略の導入が早急に必要であることが判明してきた。我々は、その新規治療戦略として、世界に先駆けて卵巣癌を標的とした増殖型ヘルペスウイルスを用いたウイルス療法に着目し(*Gynecol Oncol* 91:81-8, 2003)、現在までに腹腔内播種腫瘍治療に有望なヒト単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1): *HF10*を同定している(*Arch Virol* 148:813-25, 2003)。このウイルスを用いた卵巣癌・腹膜癌に対する新規ウイルス治療開発を目的として、以下の点につき研究を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：ウイルス療法、HSVアンプリコン、GM-CSF、Carrier Cell、抗VEGF療法

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌患者に対してウイルス療法を適応するという試みは、研究開始時米国メイヨークリニックで始まっており、これは卵巣癌を標的にした世界初の臨床試験であった。投与されるワクチン株のMeasles Virusはウイルス量エスカレーション試験の段階にあるよ

うだが、CR症例は未だ出ていない。また、RNAウイルスはDNAウイルスに比べて変異率が高い問題点も指摘されている。本大学が有する*HF10*は、DNAウイルスであり、ワクチン株に相当するものと考えられている。パイロットスタディではあるが、乳癌、頭頸部腫瘍患者に局注投与され、病変部の著効退縮も確認で

きていた。また、これまで報告のある他の Oncolytic virus と比較してみると、我々の実験特に腹腔内投与をするにあたっては、腫瘍内増殖性・クリアランスの点で最良の治療特性を示した。したがって、このウイルスを使用して、新たなウイルス療法を検討することは実際の卵巣癌治療へトランスレイショナルするための基盤として必要であると考えられた。

2. 研究の目的

このウイルスを用いた卵巣癌・腹膜癌に対する新規ウイルス治療開発を目的として、以下の点につき研究を行った。

- (1) HF-10の腫瘍・正常組織での選択増殖性を確認するために、まずヌードマウス皮下腫瘍移植モデルをもちいて、その選択性を検討した。HF-10とWild typeHSVとの生物学的挙動は何か違うのだろうか？
- (2) ヒト大網中皮細胞を用いたHF-10投与法の至適性を腹水貯留型ヒト卵巣癌移植ヌードマウスモデルで検討をする。より効果的なウイルス投与法はあるのか？
- (3) 我々が確立したHSVアンプリコンシステムを利用して、GM-CSFといった、免疫学的に腫瘍免疫の増強が期待されるサイトカインの発現系を新たに作成し、HF10によるウイルス療法の抗腫瘍性の増強とそのメカニズムをin vitro、in vivoにおいて詳細に検討する。どのサイトカインの組み合わせにより、腫瘍免疫を効率よく引き出し、ウイルス療法を増強するシステムが作れるのか？
- (4) 抗VEGF療法の前処理におけるウイルス療法の治療効果増強とそのメカニズムについて腹水貯留型ヒト卵巣癌移植ヌードマウスモデルを中心に検討する。血管新生阻害剤との相性は如何なるものなのか？

3. 研究の方法

- (1) ヌードマウス皮下に、卵巣癌 SKOV3 で腫瘍を形成させ、HF-10、KH-7をそれぞれ 10^7 pfu 腫瘍内局注し、3日目、7日目、14日目とウイルス抗原をトレースした。
- (2) 我々はヒト大網中皮細胞を carrier cell として使い、腫瘍溶解性ウイルスの効率のよい投与方法を開発するため、まず in vitro で検討した。なお、

ヒト大網中皮細胞樹立するにあたって、名古屋大学倫理委員会の承認を受けている。抗腫瘍効果が報告されている HSV1 HF10 を用いて、carrier cell となるヒト大網中皮細胞およびヒト卵巣癌由来 SKOV3 でのウイルス増殖を検討した。次に HF10 の UL39 欠損弱毒株である Hh101 を用いてウイルス直接およびウイルス感染細胞をそれぞれ単層培養した SKOV3 上加えた場合のウイルス増殖および細胞の生存実験を行った。

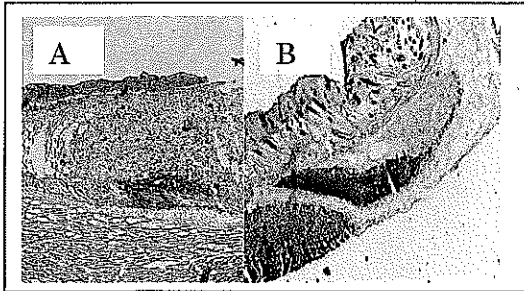
(3) Mouse GM-CSFを中心としたサイトカイン発現HSV-アンプリコンの作成 (in vitro) とウイルス治療併用による効果比較を行った (in vivo)。作製するMouse GM-CSFの遺伝子を搭載したアンプリコンプラスミドに対し、HF10をヘルパーウイルスとして使用して、粒子化する。具体的にMouse GM-CSFHSVアンプリコン作製は、以下の要領で行なった。Vero細胞に各種遺伝子挿入pHGCXプラスミド (GFP 挿入) をリポフェクトアミン 2000 (Invitrogen) により導入する。12h後、HF-10を 0.01 pfu/cell で感染させ、36h後 cell を培養上清と共に回収しドライアイスで凍結融解後超音波により3分間破碎、さらに遠心後、上清を回収する。この回収液にはHF10とHSVアンプリコンが約10:1で含まれているが、さらにこの溶液をプラーク assay 後、M.O.I.=0.01にて各遺伝子が導入されているCOS7に感染させ、48h後上述した方法で培養上清を回収する。この溶液をVero細胞に希釈感染させ、プラーク assay およびGFP蛍光細胞のカウントを行い、溶液中のHF10とHSVアンプリコンの titer を決定する。このHF10、HSVアンプリコン溶液は実験当日まで、 -80°C でストックする。今回、腫瘍径の評価と allograft の径が存在する理由により、BALB/c雌マウスにCT26大腸癌を 1×10^6 皮下移植したモデルで治療効果を検討した。

(4) VEGF 抑制のための薬剤として、Avastin を使用する。またヌードマウスでは HF10 単独投与による死亡例が生じたため、今回は、別の Oncolytic virus である hrR3 を使用した。

① 卵巣癌 SKOV3 に Avastin (10ng/ml, 100ng/ml, 1000ng/ml, 10000ng/ml) を各濃度で添加し、growth 抑制を MTS assay にて評価した。② 卵巣癌 SKOV3 に各抗 VEGF 薬剤添加したまま、或は前処理後における hrR3 の増殖能および CPE につき検討した。③ Balb/c nunu (メス、6-8 週齢) に SKOV3 細胞、胃ガン細胞株 MKL45 細胞を 10^7 個/0.5ml/body で皮下および腹腔内接種する。以下スケジュール

表に従い、治療を行う。皮下腫瘍に関しては移植後 30 日目より、腹腔内腫瘍に対しては移植後 7 日目より治療を開始し、週に 2 度、2 週間治療を行った。Avastin (AV) は 1 回につき $100 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}/\text{body}$ で投与した。hrR3 は 1 回につき $10^7 \text{ pfu}/\text{body}$ 使用した。以上の治療後、AV, hrR3+AV, hrR3 単独, Mock の 4 群において治療成績を検討・検定した。

4. 研究成果



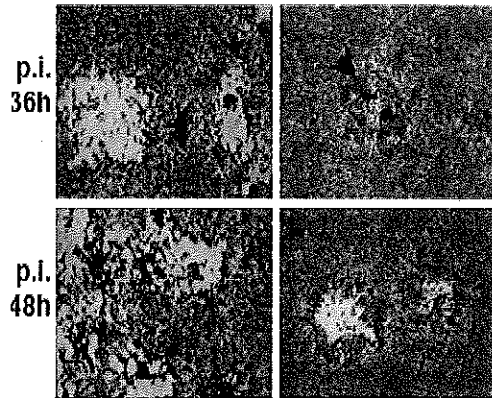
(1) 上図に示すように、*HF-10* は腫瘍接種後、14 日目においても、腫瘍に局限していたが (B)、Wild type である KH7 は腫瘍外にその抗原を認め (A)、腫瘍特異的な増殖のメカニズムは認められなかった。これには、*HF-10* がマウスマクロファージの増殖実験において、抗 IFN 抗体により増殖による細胞破壊が阻止されたことをふまえると、局所の IFN 産生とウイルス増殖特異性の間に関連がある可能性が示唆された。

(2) 両ウイルスとも、ウイルスを直接感染させた群に比べて、感染細胞群では SKOV3 に約 6 時間早く強い細胞変性効果が認められた。Hh101 の場合、感染 24 時間目の培養上清中の放出ウイルス量は、ウイルス直接感染群に比べて、ウイルス感染細胞群では 300 倍のウイルス量を示した (2×10^2 vs 6×10^4 pfu/ml)。in vitro での感染実験において、ウイルス単独感染させた場合に比べて、carrier cell を通して等量のウイルスを感染させた方が、より腫瘍細胞の破壊を認めた。さらに、Hh101 ウイルス液或いは Hh101 感染 carrier cell 腹腔内治療モデルにおいて抗腫瘍効果を検討したところ、治療後 21 日目でのウイルス感染 carrier cell 投与群において明らかな腫瘍量の減少が認められており (Mann-Whitney U-test, $p < 0.05$) 抗腫瘍性をより増強させる手段になり得ることが示唆された。

今後、臨床へ translational するにおいて有益な知見であり、よりよい carrier cell 同定・追求が必要と考えられた。

(下図左が carrier cell を使用した細胞障

害効果を示した。)



(3) 最終的に *HF-10* と Mouse GM-CSF 発現 HSV アンプリコンとの粒子比が約 1 : 2 で得られた。*HF-10* 単独治療群にくらべ、*HF-10*+mGM-CSF アンプリコン治療群は明らかな延命効果があり (図 1)、病理検索では、投与局所における免疫細胞の浸潤亢進を認めた (図 2b 矢印)。

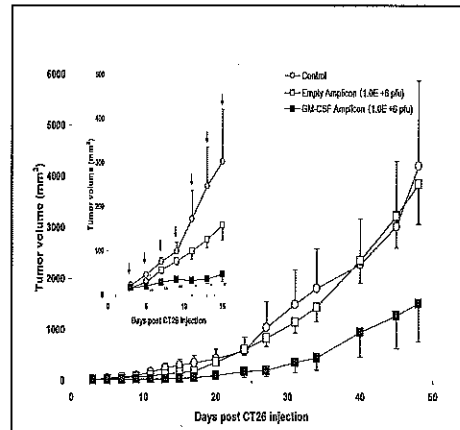


図 1

無治療群

アンプリコン添加

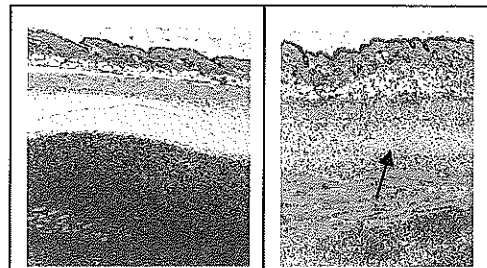


図 2 a

図 2 b

これまで、HSV oncolytic virus では GM-CSF 併用よりは、IL-12 との併用により抗腫瘍増強効果が認められたとの報告が、優位であったが、本実験においては、GM-CSF 使用によつ

ても、その増強効果が確認できた。この理由として、各 HSV の宿主免疫細胞に対する作用機序の違いが推察されよう。マウス腹腔内にこの HF-10 を投与した場合、IL-12 が産生されてくるが、その量は、同じ HSV である hrR3 投与された場合の約 3 倍の高値を示した。そのために、HSV の種類によって IL12 の補充が効果的である場合も考えられるが、この HF-10 株においては、GM-CSF 併用により、DC 細胞の maturation が進むだろうということが推察された。

(4) *in vitro* では腫瘍細胞の VEGF-A 産生量に関係なく、10000ng/ml の濃度まで、その癌細胞でのウイルス産生量、CPE ともに avastin 添加による効果は観察されなかった。一方、*in vivo* 皮下腫瘍の検討では、治療開始時の腫瘍サイズ以下になったのは、AV+hrR3 投与群のみであり、明らかに、併用効果が認められた (図 3)。

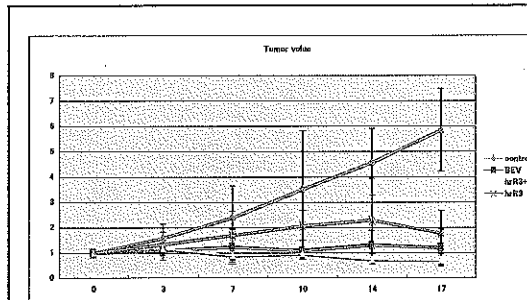


図 3

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Nawa A, Lou C, Zhang L, Ushijima Y, Ishida D, Kamakura M, Fujimoto Y, Goshima F, Kikkawa F, Nishiyama Y. Non-engineered, naturally oncolytic herpes simplex virus HSV1 HF10:

Applications for cancer gene therapy. *Curr Gene Ther*, 8, 2008,

208-210. 査読有り

2. Nawa A, Tanino T., Lou C., Iwaki M, Kajiyama H, Shibata K, Yamamoto E, Ino K, Nishiyama Y, Kikkawa F. Gene directed enzyme prodrug therapy for ovarian cancer: Could GDEPT become a promising treatment against ovarian cancer?

Anti-Cancer Agents Med Chem, 8, 2008, 232-239, 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

① 第 49 回日本臨床ウイルス学会
シンポジウム

拡大するウイルス性感染症とその対策

那波明宏

2008 年 6 月 14 日、犬山

② 第 11 回米国遺伝子治療学会

Non-Engineered, replication competent oncolytic herpes simplex virus HSV-1 HF10: unique pathogenicity and enhancement of cancer treatment in combination with an HSV amplicon system expressing granulocyte-macrophage colony-stimulation factor (GM-CSF)

NAWA Akihiro

2008 年 5 月 30 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那波明宏 (NAWA Akihiro)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90242859