

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03434

研究課題名(和文) 腸内細菌叢の変化は腫瘍溶解性ウイルスの抗腫瘍免疫作用にどのように影響を与えるか

研究課題名(英文) Role of intestinal flora on the antitumor immunity of oncolytic viruses

研究代表者

直江 吉則 (Naoe, Yoshinori)

名古屋大学・医学系研究科・特任准教授

研究者番号：50392048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：腹腔内移植モデルおよび皮下移植モデルにおいて抗生剤処理マウスにC-REV投与することによって腸内細菌叢の変化が認められた。4つの抗生物質Ampicillin (A)、Metronidazole (M)、Neomycin (N)、または、Vancomycin (V)の組み合わせの違いでC-REVの抗腫瘍効果が変化し、その効果は(効果大) AMNV = AMV > MNV > ANV = AMN (効果小)の順番であった。それら抗生物質カクテル処理によるマウスの菌叢の違いを調べ、抗生剤カクテル処理の有無で菌叢に大きな変化が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌叢の変化により化学療法、免疫チェックポイント阻害剤の抗腫瘍効果が変化することが報告されているが、腫瘍溶解性ウイルスの抗腫瘍効果が変化するかは不明であった。今回の研究結果から抗生剤処理により腫瘍溶解性ウイルスの抗腫瘍効果が変化することを見出し、その抗腫瘍効果の変化に腸内細菌叢が関与する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Changes in the intestinal flora were observed by administration of C-REV to antibiotic-treated mice in the intraperitoneal transplant model and the subcutaneous transplant model. The antitumor effect of C-REV changes depending on the combination of the four antibiotics Ampicillin (A), Metronidazole (M), Neomycin (N), or Vancomycin (V), and the order of the effect is (large effect) AMNV = AMV > MNV > ANV = AMN (small effect). The difference in the bacterial flora of the mice by the antibiotic cocktail treatment was found, and a large change was observed in the bacterial flora with and without the antibiotic cocktail treatment.

研究分野：免疫学

キーワード：腫瘍溶解性ウイルス C-REV 腸内細菌叢 抗生物質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍溶解性ウイルスは、ウイルス感染によって破壊された腫瘍から放出される癌抗原によって腫瘍特異的リンパ球の活性化が起きる。この活性化リンパ球は強い癌免疫応答を有することから、ウイルスを投与された腫瘍だけでなく、ウイルスを投与されていない転移腫瘍に対しても強い抗腫瘍効果を発揮することが報告されている。この癌免疫は、活性化リンパ球だけでなく、破壊された腫瘍から放出された癌抗原やウイルス関連産物などにより腫瘍周辺の炎症が起きることから、多くの免疫細胞の浸潤により癌微小環境が変化し、さらに、腫瘍血管からの漏出・白血球浸潤が増加し、癌抗原提示能を有する樹状細胞のリンパ節への移動が増加することにより起きることが考えられる。

腸管の表面積はテニスコートの約 1.5 倍にものぼり、そこに存在するリンパ球は 100 億個にもおよび、全末梢リンパ球の 60~70% が集積することから腸管は体内最大級のリンパ器官といえる。また、腸管は常に食物の摂取などを通して外来抗原に接するうえに、100 兆個にも達する腸内細菌と共存するなど独特な環境にある。腸内には 1000 種を超える細菌が存在する。主なものは、Firmicutes、Bacteroidetes、および Actinobacteria であり、含まれる遺伝子は 500 万種類と推定されている。人体の細菌叢の大部分は腸内に存在するが、その構成は一生の中で変化し、乳幼児および高齢者では多様性が低い。女性の腸内細菌叢は、妊娠中にも変化する。近年、腸内細菌叢は腸管局所のみならず、免疫系や肥満など全身的な現象にも大きな影響を与えていることが明らかになりつつある。具体的には、腸内細菌叢の種類・多様性の変化は、肥満症や、炎症性腸疾患、がん、心血管疾患などの免疫関連・炎症性疾患との関連があるという報告がある。また、無菌下で飼育したマウスでは免疫組織の発達が悪いということからも、免疫組織の発達にも重要である。近年、自然免疫研究の進歩に加え、シーケンス技術の進歩による培養によらない腸内細菌叢の網羅的遺伝子解析などが可能となり、常在細菌による免疫反応の調節に関する研究に関心が高まっている。

2. 研究の目的

腫瘍溶解性ウイルス C-REV (旧称 HF10) は名古屋大学ウイルス学教室で開発されたバイオ製剤であり、医師主導の臨床研究が乳癌、頭頸部癌、膀胱癌を対象に名古屋大学医学部附属病院で行われ、当研究室は投与経路・併用療法のトランスレーショナルリサーチを継続的に行っている。C-REV は腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス(HSV)であり、遺伝子変異により腫瘍のみに感染し腫瘍を破壊する。腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍特異的なリンパ球の誘導など、癌ワクチンすなわち全身療法としての効果も明らかにされつつある (Caroline JB, et al. Nature2011)。当院の臨床研究においても、ウイルスに誘導された細胞障害性 T 細胞、ヘルパー T 細胞、樹状細胞等の抗原提示細胞の浸潤を腫瘍内に認め、強い抗腫瘍免疫の関連が示唆されている (Nakao A, Kasuya H, et al. Cancer Gene Therapy 2011)。

ヒトには 1000 種、100 兆個を超える腸内細菌が存在する。これらが構成する腸内細菌叢は免疫や代謝を介して宿主であるヒトと複雑な相互作用を形成し恒常性を維持している。腸内細菌叢の構成菌種の変容や異常増殖、減少は dysbiosis と呼ばれ、ヒトの腸管のみならず、全身の免疫系、代謝機構に異常を引き起こす。脂肪肝やメタボリックシンドローム、関節リウマチ、自閉症、多発性硬化症などさまざまな疾患に dysbiosis が寄与している可能性が示唆されている。さらに、腸内細菌叢の変化により化学療法、免疫チェックポイント阻害剤の抗腫瘍効果が変化することが報告されている。そこで、担癌マウスに抗生物質を投与し、C-REV の抗腫瘍効果がどのように影響するか検討した。

3. 研究の方法

(1) 腸内細菌叢の変化による C-REV 抗腫瘍効果

腹腔内移植モデル

マウスに 0.5 g/L Ampicillin (A)、1 g/L Metronidazole (M)、1 g/L Neomycin (N) および、0.5 g/L Vancomycin (V) の抗生物質を含む 1% Sucrose 溶液をマウスに自由に飲水させた。14 日後にマウスの腹腔内にマウス膀胱癌細胞 Pan02 を 1×10^6 個移植した (Day 0)。その後、3 回、C-REV 1×10^6 pfu を腹腔内に投与した (Day 3, 4, 5)。マウスの生存を観察し、抗腫瘍効果を評価した。その間、抗生物質を含む 1% Sucrose 溶液をマウスに自由に飲水させた。

皮下移植モデル

マウスに 0.5 g/L Ampicillin (A)、1 g/L Metronidazole (M)、1 g/L Neomycin (N) および、0.5 g/L Vancomycin (V) の抗生物質を含む 1% Sucrose 溶液をマウスに自由に飲水させた。7 日後にマウスの皮下に 2 mm 角に細切したマウス膀胱癌細胞 Pan02 を腫瘍移植針により 2 個移植した (両側側腹部移植モデル) (Day -8)。腫瘍の大きさが 100mm³ の大きさに達した時点で群分けを行い (Day 0)、C-REV の投与を腫瘍内に 3 日毎に 3 回、 1×10^6 pfu 投与した (Day 0, 3, 6)。週 2 回、投与側ならびに非投与側腫瘍サイズおよび体重を測定し、抗腫瘍効果を評価した。その間、抗生物質を含む 1% Sucrose 溶液をマウスに自由に飲水させた。

(2) 菌叢解析

腹腔内移植および皮下移植モデルにおいて、C-REV 投与後 4 日後に糞便を採取した。DNA を抽出後、16S rRNA の V1-V2 領域に対する primer を用い PCR にて増幅した。次世代シーケンサーで塩基配列を決定し、配列をデータベースによりマッピングした。

4. 研究成果

(1) 抗生物質処理マウスにおける C-REV の Pan02 に対する抗腫瘍効果(腹腔内移植モデル)

抗生物質処理のマウスにおいて C-REV の抗腫瘍効果が増強されるか、Pan02 腹腔移植モデルを用いて検討した。C-REV 処理により担癌マウスの生存を増強する傾向があった(p = 0.07)。抗生物質処理されたマウスにおいて C-REV 処理により、コントロール群に比べ、生存を延長した。また、抗生物質の有無で C-REV の効果に有意な差は認められなかったが、生存延長の傾向が見られた (図 1)。

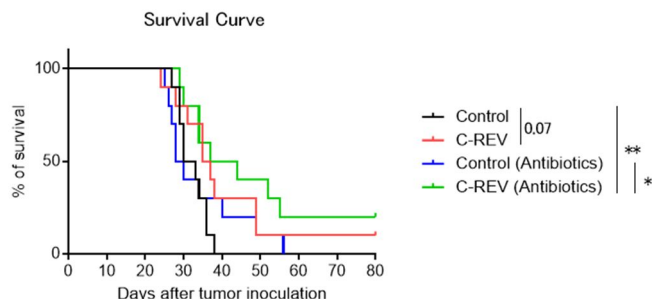


図 1 抗生物質処理マウスにおける C-REV の Pan02 に対する抗腫瘍効果 (腹腔内移植モデル)

(2) 抗生物質処理マウスにおける C-REV の Pan02 に対する抗腫瘍効果(皮下移植モデル)

C-REV は投与側の腫瘍の増大を明らかに抑制したが、C-REV 単独と比べて抗生物質と C-REV を併用しても投与側腫瘍の抗腫瘍効果には大きな差は見られなかった。一方、抗生物質処理によって C-REV の非投与側の腫瘍に対する抗腫瘍効果が明らかに増強した (図 2)。

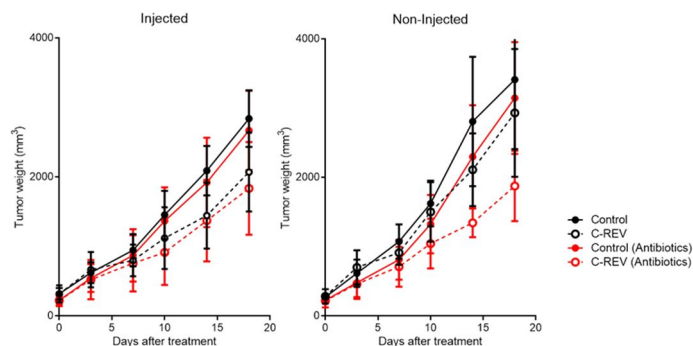


図 2 抗生物質処理マウスにおける C-REV の Pan02 に対する抗腫瘍効果 (皮下移植モデル)

Ampicillin (A)、Metronidazole (M)、Neomycin (N)、または、Vancomycin (V)の 4 つの抗生物質の中から 3 つの組み合わせ (抗生物質 3 剤カクテル) および、4 つすべての抗生物質 (抗生物質 4 剤カクテル) をマウスに投与し、マウスの腸内細菌叢を変化させた。AMV または AMNV 処理マウスにおいて、C-REV 投与側腫瘍で C-REV の抗腫瘍効果が強まる傾向が見られたが、統計的に有意ではなかった。一方、C-REV 非投与側の腫瘍では、AMV または AMNV 処理マウスにおいて、C-REV の抗腫瘍効果が明らかに増強した (図 3)。

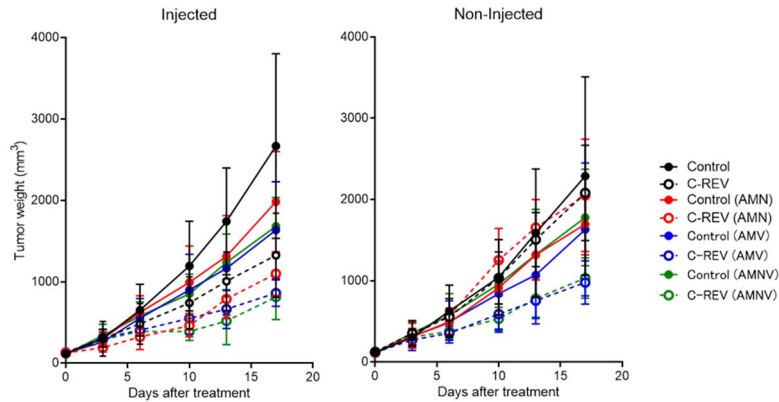


図3 抗生物質 AMN、AMV および AMNV 処理マウスにおける C-REV の抗腫瘍効果

また、ANV、MNV または AMNV 処理マウスにおいて、C-REV 投与側腫瘍で C-REV の抗腫瘍効果が明らかに強まった。C-REV 非投与側の腫瘍においても、MNV または AMNV 処理マウスにおいて、C-REV の抗腫瘍効果が明らかに増強した (図 4)。

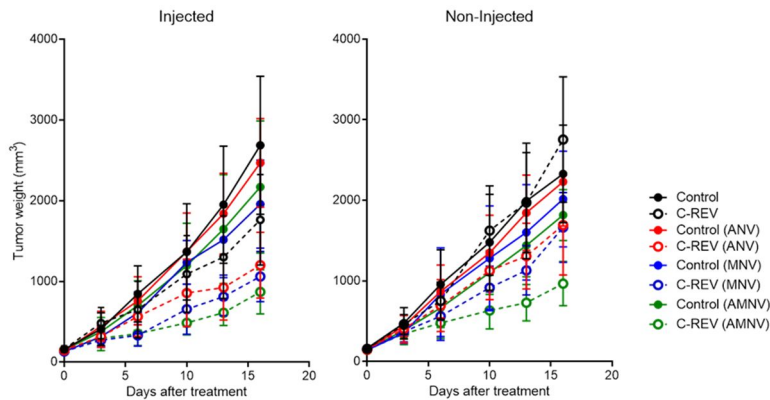


図4 抗生物質 ANV、MNV および AMNV 処理マウスにおける C-REV の抗腫瘍効果

以上より、3つの抗生物質 Ampicillin (A)、Metronidazole (M)、および、Vancomycin (V)カクテル、または、4つの抗生物質 Ampicillin (A)、Metronidazole (M)、Neomycin (N)、または、Vancomycin (V)カクテルにより処理されたマウスにおいて、C-REV の抗腫瘍効果が著しく増強された。これら抗生物質で処理させたマウスの腸内菌叢が変化することが報告されていることから、腸内細菌菌叢の変化が C-REV の抗腫瘍効果に影響を与えていることが示唆された。

(3) 菌叢解析 (腹腔内移植モデル vs 皮下移植モデル、および抗生剤組み合わせの違い)
それぞれのモデルにおける菌叢解析を行った。抗生物質処理により両モデルにおいて菌種が減少した (図 5)。

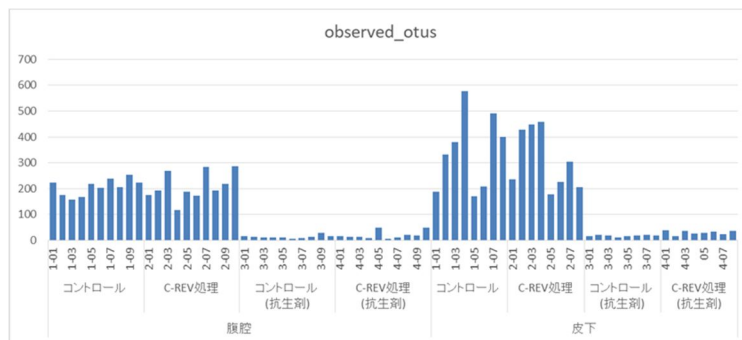


図5 抗生物質処理マウスにおける C-REV の菌種に対する作用(菌種)

また、属レベルの解析において、Pan02 の腹腔移植群で Lactobacillus 属、抗生物質処理 Pan02 の腹腔移植群で Klebsiella 属および Cronobacter 属、Pan02 の皮下移植群で Lactobacillus 属および Clostridium 属、ならびに抗生物質処理 Pan02 の皮下移植群で Klebsiella 属、Citrobacter 属および Escherichia 属が観察された (図 6)。

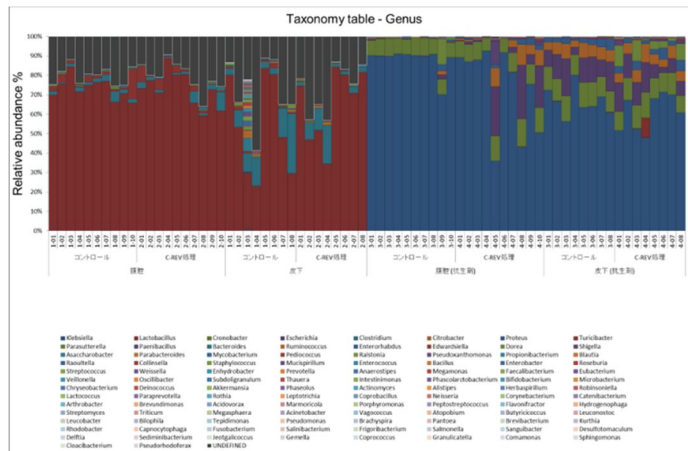


図6 抗生物質処理マウスにおける C-REV の菌種に対する作用(属レベル)

Unifrac 距離に基づく各群の分散分析を行ったところ、C-REV を投与しただけでは細菌叢に影響はあまり無いが、抗生剤を C-REV と併用すると、細菌叢が変化し、また、腫瘍の皮下移植と、腹腔内移植で、細菌叢に違い認められた (表 1)。

表 1 Unifrac 距離に基づく各群の分散分析

Category	No. subject	Weighted UniFrac		Unweighted UniFrac		
		R ²	P value	R ²	P value	
腫瘍	コントロール vs C-REV処理	コントロール: 10 C-REV処理: 10	0.04755	0.3926	0.05208	0.4685
	コントロール(抗生剤) vs C-REV処理(抗生剤)	コントロール(抗生剤): 10 C-REV処理(抗生剤): 10	0.16737	0.000999	0.11343	0.000999
皮下	コントロール vs C-REV処理	コントロール: 8 C-REV処理: 8	0.0884	0.2248	0.07817	0.1389
	コントロール(抗生剤) vs C-REV処理(抗生剤)	コントロール(抗生剤): 8 C-REV処理(抗生剤): 8	0.2217	0.000999	0.18294	0.000999
コントロール	腫瘍 vs 皮下	腫瘍: 10 皮下: 8	0.29307	0.002997	0.13321	0.000999
HF10処理	腫瘍 vs 皮下	腫瘍: 10 皮下: 8	0.36368	0.000999	0.12151	0.000999
コントロール(抗生剤)	腫瘍 vs 皮下	腫瘍: 10 皮下: 8	0.42607	0.000999	0.18562	0.000999
HF10処理(抗生剤)	腫瘍 vs 皮下	腫瘍: 10 皮下: 8	0.20126	0.000999	0.20338	0.000999

抗生物質処理マウスに C-REV 投与することによって変化する菌叢は腹腔内移植モデルでは *Citrobacter youngae*, *Parasutterella excrementihominis*, *Pediococcus pentosaceus* および *Weissella cibaria*, また、皮下移植モデルにおいて *Parasutterella excrementihominis* および *Cronobacter dublinensis* が認められた。4つの抗生物質 Ampicillin (A)、Metronidazole (M)、Neomycin (N)、または、Vancomycin (V)の組み合わせの違いで C-REV の抗腫瘍効果が変化し、その効果は(効果大) AMNV = AMV > MNV > ANV = AMN (効果小)の順番であった。そこで、それら抗生物質カクテル処理によるマウスの菌叢の違いを調べることによって、C-REV の効果に影響を与える菌叢を見出せる可能性があると考え、各群の菌叢を比較した (図 7)。その結果、抗生物質カクテル処理の有無で菌叢に大きな変化が見られた。一方、各種抗生物質カクテル間で菌叢を比較したところ、C-REV の効果と明らかな相関関係を示す特定の菌叢を見出すことが出来なかった。

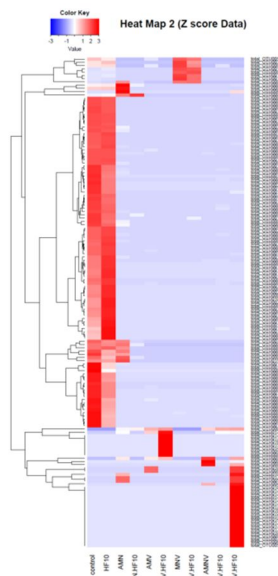


図7 抗生物質カクテル処理マウスにおける菌種の比較

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 2件）

1. 著者名 Eissa Ibrahim Ragab, Mukoyama Nobuaki, Abdelmoneim Mohamed, Naoe Yoshinori, Matsumura Shigeru, Bustos Villalobos Itzel, Ichinose Toru, Miyajima Noriyuki, Morimoto Daishi, Tanaka Maki, Fujimoto Yasushi, Sone Michihiko, Kodera Yasuhiro, Kasuya Hideki	4. 巻 -
2. 論文標題 Oncolytic herpes simplex virus HF10 (canerpaturev) promotes accumulation of CD8+ PD 1 tumor infiltrating T cells in PD L1 enriched tumor microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33550	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 Zhiwen Wu, Toru Ichinose, Yoshinori Naoe, Shigeru Matsumura, Itzel Bustos-Villalobos, Ibrahim Ragab Eissa, Suguru Yamada, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Nobuaki Mukoyama, Yoko Nishikawa, Yusuke Koide, Yasuhiro Kodera, Maki Tanaka, Hideki Kasuya	4. 巻 13
2. 論文標題 Combination of Cetuxmab and Oncolytic Virus Canerpaturev Synergistically Inhibits Human Colorectal Cancer Growth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Therapy-Oncolytics	6. 最初と最後の頁 107-115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2019.04.004	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 Morimoto Daishi, Matsumura Shigeru, Bustos-Villalobos Itzel, Sibal Patricia Angela, Ichinose Toru, Naoe Yoshinori, Eissa Ibrahim Ragab, Abdelmoneim Mohamed, Mukoyama Nobuaki, Miyajima Noriyuki, Tanaka Maki, Kodera Yasuhiro, Kasuya Hideki	4. 巻 10
2. 論文標題 C-REV Retains High Infectivity Regardless of the Expression Levels of cGAS and STING in Cultured Pancreatic Cancer Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1502 ~ 1502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10061502	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 Noriyuki Miyajima, Ibrahim Ragab Eissa, Mohamed Abdelmoneim, Yoshinori Naoe, Toru Ichinose, Shigeru Matsumura, Itzel Bustos-Villalobos, Nobuaki Mukoyama, Daishi Morimoto, Masahiro Shibata, Dai Takeuchi, Nobuyuki Tsunoda, Toyone Kikumori, Maki Tanaka, Yasuhiro Kodera, Hideki Kasuya	4. 巻 83
2. 論文標題 S-1 facilitates canerpaturev (C-REV)-induced antitumor efficacy in a triple-negative breast cancer model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nagoya J Med Sci .	6. 最初と最後の頁 683-696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18999/nagjms.83.4.683	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9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hideki Kasuya, Daishi Morimoto, Yoshinori Naoe, Shigeru Matsumura, Itzel Bustos, Ibrahim Eissa, Maki Tanaka
2. 発表標題 腫瘍溶解性ウイルスC-REV(HF10)に関連する抗腫瘍因子の検討
3. 学会等名 第21回外科分子細胞治療研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideki Kasuya, Yoshiki Hirooka, Yoshinori Naoe, Shigeru Matsumura, Daishi Morimoto, Ibrahim Eissa, Maki Tanaka
2. 発表標題 腫瘍溶解性ウイルスC-REVの膵臓癌に対する効果関連因子の探索
3. 学会等名 第50回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ibrahim Eissa, Nobuaki Mukoyama, Yoshinori Naoe, Shigeru Matsumura, Toru Ichinose, Itzel Bustos, Daishi Morimoto, Noriyuki Miyajima, Maki Tanaka, Hideki Kasuya
2. 発表標題 PD-L1 Blockade Enhanced the Therapeutic Efficacy of the Oncolytic Virus-Canerpaturev in Squamous Carcinoma
3. 学会等名 第25回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigeru Matsumura, Zhiwen Wu, Toru Ichinose, Yoshinori Naoe, Itzel Bustos, Ibrahim Eissa, Suguru Yamada, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto Nobuaki Mukoyama Yoko Nishikawa, Yusuke Koide, Yasuhiro Koderu, Maki Tanaka, Hideki Kasuya
2. 発表標題 Combination therapy of Cetuximab and CANERPATUREV suppresses human colorectal cancer growth
3. 学会等名 第25回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideki Kasuya, Yoshiki Hirooka, Masaya Suenaga, Daishi Morimoto, Yoshinori Naoe, Shigeru Matsumura, Maki Tanaka
2. 発表標題 Antitumor factors associated with oncolytic virus C-REV(formaly HF10)
3. 学会等名 The 17th IDDST conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ibrahim Eissa, Nobuaki Mukoyama, Yoshinori Naoe, Shigeru Matsumura, Toru Ichinose, Itzel Bustos, Daishi Morimoto, Noriyuki Miyajima, Maki Tanaka, Hideki Kasuya
2. 発表標題 PD-L1 Blockade Enhanced the Therapeutic Efficacy of Oncolytic Virus Canerpatuerev in Squamous Cell Carcinoma Model
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 Shigeru Matsumura, Zhiwen Wu, Toru Ichinose, Yoshinori Naoe, Itzel Bustos, Ibrahim Eissa, Suguru Yamada, Yasuhiro Koderu, Maki Tanaka, Hideki Kasuya
2. 発表標題 Combination of Cetuximab and oncolytic virus CANERPATUREV synergistically inhibits human colorectal cancer growth
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 Shigeru Matsumura, Zhiwen Wu, Toru Ichinose, Ibrahim Eissa, Yoshinori Naoe, Yasuhiro Koderu, Maki Tanaka, Hideki Kasuya
2. 発表標題 Combination of Cetuximab and oncolytic virus CANERPATUREV synergistically inhibits human colorectal cancer growth
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideki Kasuya, Yoshinori Naoe, Shigeru Matsumura, Maki Tanaka
2. 発表標題 Clinical development of Canerpaturev(formerly HF10)as the novel cancer therapy
3. 学会等名 The 12th International Oncolytic Virotherapy Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 1型単純ヘルペスウイルス	発明者 直江吉則	権利者 名古屋大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-051489	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 キメラ標的因子受容体	発明者 直江吉則	権利者 名古屋大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-005337	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

名古屋大学大学院医学系研究科 癌免疫治療研究室 https://www.med.nagoya-u.ac.jp/intlexch/cancerimmuno/www/index.html
--

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