

機関番号：24701  
研究種目：基盤研究(C)  
研究期間：2008～2010  
課題番号：20591574  
研究課題名(和文) スキルス胃癌に対するハイブリッド型機能分子搭載ウイルスによる新規治療開発  
研究課題名(英文) Novel exploitation of hybrid-type armed oncolytic virus for scirrhous gastric cancer  
研究代表者 中森 幹人  
(NAKAMORI MIKIHITO)  
和歌山県立医科大学 医学部 講師  
研究者番号：10322372

## 研究成果の概要(和文)：

スキルス胃癌は未分化型が多く、びまん性に侵潤する。したがって、その予後は非常に悪いために新しい治療の開発が必要である。本研究では、ウイルス療法に着目し、その中でも強力な殺細胞効果を有する腫瘍特異的ヘルペスウイルスが探索的研究の候補とした。タキサン系薬剤の作用機序から、タキサンの治療効果の鍵となる分子を遺伝子工学的にヘルペスウイルスに導入し、その治療効果について検討した。

## 研究成果の概要(英文)：

Scirrhous gastric cancer, a diffusely infiltrating type of poorly differentiated gastric cancer also known as linitis plastica-type cancer is characterized by rapid cancer cell infiltration. Therefore, scirrhous gastric cancer carries a worse prognosis than other types of gastric cancers. Viral therapy for scirrhous gastric cancer is a promising strategy. Viral therapy using herpes simplex virus-1 (HSV-1) is especially practical for clinical application when its safety and therapeutic potency are warranted. We have recently investigated arming oncolytic herpes virus engineered by taxane-mediated molecule.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：スキルス胃癌，ウイルス療法，腹膜播種，探索的研究

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルス療法に利用されるウイルスの種類は近年急速に増えている。今のところ臨床試験まで進んでいるのは、HSV-1、アデノウイルス、レ

オウイルス、ニューカッスル病ウイルスなどがある。我々は臨床応用を視野に入れ、改良型 HSV-1 の開発を共同研究としてこれまでに展開してきた。研究開始当初における oncolytic HSV-1 の

特徴を以下に概説する。

#### ① HSV-1 複製の腫瘍選択性

正常細胞に対する病原性を低く抑えて安全性を担保することは臨床応用に必須である。しかし、ウイルスを弱毒化したからと言っても、癌治療のために安全なウイルスになるとは必ずしも限らない。しかも、ウイルスはゲノムに変異が生じると必ず弱毒化するという性質を持つ。癌細胞は、元来ウイルス感染に対する防御機構が障害されているため、いかなる弱毒化ウイルスでも正常細胞と比較すると、癌細胞では多少とも高いウイルス複製が得られる。そこで、癌治療用ウイルス開発において重要なことは、正常細胞に対する病原性を最小限に保ち、癌細胞に対するウイルス複製能を最大限に生かして治療域を意図的に広げることである。そのためには、腫瘍生物学とウイルス学の知識に基づいて癌特異的なウイルス複製能が獲得できるように遺伝子工学を駆使したウイルスゲノムを設計することが極めて肝要である。我々が共同研究で使用している HSV-1 は以下のようなウイルス遺伝子の改変を利用して開発されたものである。

#### ② $\gamma$ 34.5 遺伝子

$\gamma$ 34.5 遺伝子は HSV-1 の病原性に関連した遺伝子である。これを欠失させた変異株は正常細胞でのウイルス複製能が著しく減弱する。正常細胞では、ウイルスが感染すると、二本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼ (double stranded RNA-activated protein kinase: PKR) がリン酸化され、その翻訳開始因子 eIF-2a をリン酸化し、結果として、ウイルスのタンパク合成が遮断される。 $\gamma$ 34.5 遺伝子産物は PKR 機能に拮抗してウイルスのタンパク合成を可能にするが、 $\gamma$ 34.5 遺伝子欠失 HSV-1 は正常細胞では複製を不可能である。しかし、癌細胞では、PKR 活性が低下しているために  $\gamma$ 34.5 遺伝子欠失 HSV-1 でも複製可能である。この機構により、 $\gamma$ 34.5 遺伝子欠失 HSV-1 が癌細胞を破壊できることになる。

#### ③ DNA 合成関連酵素

リボヌクレオチド還元酵素 (ribonucleotide reductase: RR) やチミジンキナーゼ (thymidine kinase: TK) は HSV-1 の DNA 合成に必要な酵素である。これらの遺伝子を不活化することで、HSV-1 は正常細胞では複製出来なくなるが、癌細胞を含む増殖が活性化された細胞においては、細胞自体の RR や TK 活性が高いことが多く、これらの遺伝子が不活化された HSV-1 はこの遺伝子が代償されることで複製が可能となる。

#### ④ $\alpha$ 47 遺伝子

$\alpha$ 47 遺伝子のコードするタンパク質は、宿主細胞の抗原提示関連トランスポーター (TAP) を阻害することで、細胞表面の MHC class I の発現を抑制する。このことは感染細胞のウイルスタンパク質の提示を抑制し、宿主のウイルス感染に対する免疫監視機構から逃れる作用を有する。 $\alpha$ 47 遺伝子を欠失させた HSV-1 では、宿主細胞の MHC class I 発現が保持され、免疫細胞に対する応答が増強されると推察出来る。また、 $\alpha$ 47 遺伝子は US11 遺伝子プロモーター部分と重なるため、 $\alpha$ 47 遺伝子の欠失により、US11 遺伝子発現時期が早まることになる。これは  $\gamma$ 34.5 遺伝子欠失 HSV-1 において、減弱したウイルス複製能を腫瘍細胞に限り復元することになる。

#### ⑤ HSV-1 による腫瘍免疫の誘導

HSV-1 によるウイルス療法では、ウイルス複製に伴う癌細胞の破壊 (viral oncolysis) が腫瘍特異的免疫応答を誘導すると報告されてきた。ウイルス感染は感染局所での非特異的免疫反応の活性化のみならず、腫瘍細胞に発現したウイルスタンパクによるアジュバント効果や、ウイルスによる細胞破壊が抗原提示細胞による処理を促進することなどがその機序として考えられる。このことは、腫瘍細胞特異的細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) の誘導、腫瘍抗原分子の同定を必要としない腫瘍ワクチンとしての効果が期待でき、1 つの病巣に対する治療により、遠隔転

移に対しての治療効果を期待できる。

## ⑥ これまでに開発された oncolytic HSV-1

oncolytic HSV-1としての起源は, Martuza RL の報告に始まる. TK 遺伝子が不活化された第一世代 HSV-1 (dlsptk)を遺伝子工学的に作製し, 人為的に癌細胞に局限させたウイルス複製を実証した. しかし, TK 遺伝子を不活化していることで, 抗ヘルペスウイルス剤が効かないための安全性に問題を残した. さらに, R3616 や 1717 と呼ばれる  $\gamma$ 34.5 遺伝子欠失第 1 世代 HSV-1 も含めて, 正常組織における病原性の減弱性が徹底化されていないこと, 野生型への復元が問題で, 臨床応用に至らなかった. 次いで開発された第 2 世代 HSV-1 の G207 は, RR 遺伝子の不活化と  $\gamma$ 34.5 遺伝子欠失の二重変異を有し, 動物実験における有効性と安全性を徹底的に確認されたことから, 再発悪性グリオーマ患者を対象とした第 I 相臨床試験が行われ, G207 の腫瘍内投与が高力価でも安全であることが認められた. しかし, その抗腫瘍効果に対して改良の余地を残した. そこで,  $\alpha$ 47 遺伝子を欠失させた第 3 世代 HSV-1 の G47  $\Delta$  が開発された. 現在はこれを用いた脳腫瘍に対する臨床試験が東京大学附属病院で承認された.

## ⑦ 効果増強を目指したウイルス療法の開発

第 3 世代 HSV-1 の G47  $\Delta$  や T-01 は単独でも優れた治療効果が動物実験レベルで報告されているが, 次世代のウイルス療法の基礎研究開発も進んできた. HSV-1 には感染の際に宿主細胞を周囲の細胞と融合させる性質を有するいわゆるサブタイプが存在する. G207 から選別された融合垂系の Fu-10<sup>10)</sup>はそのひとつである. また, syncytium と呼ばれる細胞融合を誘導する遺伝子を発現するように遺伝子組み換えした Synco-2D は殺細胞効果が増強したが, 実用化には至っていないのが現状である. また, 腫瘍あ

るいは組織特異的プロモーターを用いることにより, ウイルス遺伝子を制御し, 癌特異的な殺細胞効果を獲得する試みをされている. さらに, 治療用 HSV-1 のゲノムに治療遺伝子を直接組み込み, 増幅型遺伝子発現ベクターの機能を持たせて治療に応用する試みが報告されている.

## 2. 研究の目的

2007 年から 2009 年の間に胃癌外科領域の分野では, 我が国で行われた第 III 相臨床試験である (1): 大動脈周囲リンパ節郭清の意義 (JCOG9501 study, JCOG: Japan Clinical Oncology Group), (2): 胃癌術後補助化学療法の有用性 (ACTS-GC), (3): 進行・再発胃癌に対する化学療法の臨床試験 (SPIRITS trial, JCOG9912 study) などの重要な臨床試験の結果が主要欧文誌に認められ, 標準治療としての evidence の転換, いわゆるパラダイムシフトが起こった. しかし, 進行胃癌, 特に 4 型スキルス胃癌については, evidence を塗り替えるほどの臨床試験の報告はなく, 新たな治療法の開発が急務となっている. 我々の教室のデータでも, 3 型胃癌に比べて 5 年生存率では明らかな差を認め, 統計学的に有意な因子は術前の CEA 値だけであり, これを治療開発に応用するには独創的な発想が必要である. このように, スキルス胃癌に対する手術ならびに補助化学療法を含め治療成績についてはプラトーに達した感があり, 手術治療に連続した新規治療開発を模索している.

そこで, 我々はスキルス胃癌に対する新規治療開発のひとつとしてウイルス療法に注目している. ウイルスと発癌の関連は古くから研究されているが, ウイルスを癌の治療に応用する研究も 1960 年代からなされている. ウイルスは元来, 固有の性質として細胞に感染し, 細胞内の分子機構を巧みに使用することで自己を複製し, その過程で感染細胞を死滅させる. ウイルス療法 (oncolytic virotherapy) とは, ウイルスを癌細胞

に感染させ、ウイルスの直接的な殺細胞効果により癌の治療を図る治療法である。そこで、我々は、研究の背景でも述べた単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) をスキルス胃癌に応用することを目的とした。

### 3. 研究の方法

thombospondin-1(TSP-1)発現 oncolytic HSV-1 の開発

#### ① 腫瘍微小環境破壊に適した taxane 関連分子 TSP-1 の cloning と機能解析

スキルス胃癌の腫瘍微小環境の性格, taxane 系抗癌剤の現時点での胃癌症例への腹腔内投与の有効性の期待ならびに TSP-1 と taxane の作用機序との関連から, oncolytic HSV-1 で TSP-1 を overexpression 出来るシステムを作成する必要がある。そこで, SV-01 (東京大学脳神経外科藤堂具紀博士より供与) expression cassette を用いて, TSP-1 遺伝子発現 cassette を作成する。

方法: ヒト全血より total RNA を抽出 (QIAGEN 社 QIAamp RNA Blood Mini kit) し, TSP-1 の cloning のための specific maker: 5'-TAACCTAGGAACCCGGGAAG-3' を用いて total RNA より TSP-1 mRNA を逆転写 (cDNA 作製), これを増幅した。これを, cloning vector pTA2 に subcloning し, ABI 社 PRISM310 Genetic Analyzer を用いてシーケンスして確認した後に, SV-01 の multi-clonig site に ligation し, TSP-1 蛋白発現の確認を Western blotting, 免疫染色でそれぞれ確認した。さらに, ヒト胃癌細胞株である, MKN-1, MKN-45, TMN-1 を用いて, In vitro でのそれぞれの expression cassette の胃癌細胞に対する特性について検討する。この検討において, 治療効果は当然のこと, 病理組織学, 免疫組織学的検討に加えて, open imaging 法を用いた。

#### ② Hybrid typed-arming oncolytic HSV-1 の作成とその機能解析

我々はすでに, BAC (bacterial artificial chromosome) system を利用した oncolytic HSV-1 の作成には, その技術を会得していたので, 今回の研究方法では, より安全性の高い oncolytic HSV-1 として, G47Δ (*Proc Natl Acad Sci* 98(11): 6396-6401, 2001) を基本骨格とする第 3 世代 oncolytic HSV-1: T-01 の BAC である T-BAC system (*Cancer Res* 65: 10663-10668, 2005) を用いて機能分子搭載型ウイルス (Hybrid typed-arming oncolytic HSV-1) を作成し, スキルス胃癌に対する新規ウイルスの治療効果について検討した。HSV-1 の genome DNA の ICP6, ICP34.5 の 2 カ所を欠失させたものを用いてきたが, 本研究で用いた BAC system はこれらの欠失に加えて, ICP47 遺伝子も欠失させた triple gene deleted oncolytic HSV-1 の性格を有する。

(実験プロトコール概要):

Day 1: スキルス胃癌細胞株, 臨床症例 (倫理委員会承認) から樹立したスキルス胃癌細胞 ( $3 \times 10^6$  個) を 7 週齢 athymic female BALB/c nu/nu mice に腹腔内投与した。

Day 7: Hybrid typed-arming oncolytic HSV を  $1 \times 10^9$  pfu 腹腔内投与する (各治療群は  $n=10$  とする)。治療 7 日目に各群より 3 匹を sacrifice し, 腫瘍結節数, 腫瘍重量の測定, 腫瘍含む各臓器 (腹膜, 腸管, 肝臓, 脾臓) の組織学的診断を H&E 染色, anti-HSV antibody による免疫組織染色を行った。これに血管新生抑制の効果や oncolytic HSV-1 の投与回数の検討も合わせて行った。

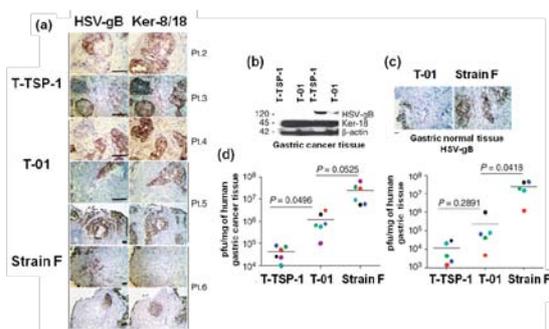
### 4. 研究成果

より安全性の高い oncolytic HSV として, 我が国で第 I 相臨床試験が開始されたばかりである第 3 世代 oncolytic HSV; G47Δ を基本骨格とする新規第 3 世代 oncolytic HSV: T-01 を BAC (bacterial artificial chromosome) 法を用いて短

期間で開発する技術を確立し、これまでに申請者らが行ってきた遺伝子治療のノウハウを機能分子搭載型ヘルペスウイルスという形で前臨床段階にまで応用可能としたが、スロンボスポンジン-1 遺伝子発現ヘルペスウイルス(T-TSP-1)では、以下の問題点も明らかになった。

#### 前臨床研究における問題点 (図1)

スロンボスポンジン-1遺伝子発現ヘルペスウイルス(T-TSP-1), 第3世代ヘルペスウイルス(T-01)はともに胃癌組織に感染(a)し, ウイルス関連蛋白も発現(b)する。また, 胃正常組織への感染は野生型のヘルペスウイルス(Strain F)よりも制御出来る。しかし, 胃癌組織におけるウイルス複製能はかなり抑制される(d)ことから, 今後の臨床応用, 治療法として確立して行くうえで, ヘルペスウイルスの機能増強, 分子標的化が必要であると考えられる。



胃癌切除標本に対するウイルス感染・複製能 (図1)

#### 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 12 件)

- 1: Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Ojima T, Naka T, Yamaue H. Optimal Period for the Prophylactic Administration of Neutrophil Elastase Inhibitor for Patients with Esophageal Cancer Undergoing Esophagectomy. World J Surg. 査読有 2011 in press
- 2: Miyazawa M, Iwahashi M, Ojima T, Katsuda M, Nakamura M, Nakamori M, Ueda K, Naka T, Hayata K, Iida T, Yamaue H. Dendritic cells

adenovirally-transduced with full-length mesothelin cDNA elicit mesothelin-specific cytotoxicity against pancreatic cancer cell lines in vitro. Cancer Lett. 査読有 2011, 305: 32-9.

- 3: Iida T, Iwahashi M, Katsuda M, Ishida K, Nakamori M, Nakamura M, Naka T, Ojima T, Ueda K, Hayata K, Nakamura Y, Yamaue H. Tumor-infiltrating CD4+ Th17 cells produce IL-17 in tumor microenvironment and promote tumor progression in human gastric cancer. Oncol Rep. 査読有 2011, 25(5): 1271-7.
- 4: Iwahashi M, Katsuda M, Nakamori M, Nakamura M, Naka T, Ojima T, Iida T, Yamaue H. Vaccination with peptides derived from cancer-testis antigens in combination with CpG-7909 elicits strong specific CD8+ T cell response in patients with metastatic esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Sci. 査読有 2010, 101(12): 2510-7.
- 5: Ojima T, Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Naka T, Katsuda M, Iida T, Tsuji T, Hayata K, Takifuji K, Yamaue H. Clinicopathological characteristics of remnant gastric cancer after a distal gastrectomy. J Gastrointest Surg. 査読有 2010, 14(2): 277-81.

6: Ojima T, Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Naka T, Katsuda M, Iida T, Hayata K, Yamaue H. Association of allogeneic blood transfusions and long-term survival of patients with gastric cancer after curative gastrectomy. J Gastrointest Surg. 査読有 2009, 13(10): 1821-30.

7: Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Naka T, Ojima T, Iida T, Katsuda M, Ueda K, Yamaue H. Evaluation of double tract reconstruction after total gastrectomy in patients with gastric cancer: prospective randomized controlled trial. World J Surg. 査読有 2009, 33(9): 1882-8.

- 8: Ojima T, Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Naka T, Ishida K, Ueda K, Katsuda M, Iida T, Tsuji T, Yamaue H. Influence of overweight on patients with gastric cancer after undergoing curative gastrectomy: an analysis of 689 consecutive cases managed by a single center. Arch Surg. 査読有 2009, 144(4): 351-8;
- 9: Ishida K, Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Yokoyama S, Iida T, Naka T, Nakamura Y, Yamaue H. High CCR7 mRNA expression of cancer cells is associated with lymph node involvement in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Int J Oncol. 査読有 2009, 34(4): 915-22.
- 10: 中森幹人, 山上裕機 腫瘍溶解ウイルスの癌治療への応用 Biotherapy 査読無, 23, 2009, 409-415
- 11: Nakamori M, Iwahashi M, Nakamura M, Tabuse K, Mori K, Taniguchi K, Aoki Y, Yamaue H. Laparoscopic resection for gastrointestinal stromal tumors of the stomach. Am J Surg. 査読有 2008, 196(3): 425-9.
- 12: 中森幹人 Taxane の作用機序を標的とした arming oncolytic herpes virus の改良 Biotherapy, 査読無 22, 2008, 227-232

[学会発表] (計 6 件)

#### 国際学会

- ① Mikihito Nakamori, Makoto Iwahashi, Toshiaki Tsuji, Masaki Nakamura, Toshiyasu Ojima, Takeshi Iida, Masahiro Katsuda, Keiji Hayata, and Hiroki Yamaue Postoperative adjuvant chemotherapy of oral S-1 has limited survival benefits for scirrhous gastric cancer patients – future

direction The 9th International Conference of Asian Clinical Oncology (ACOS), 2010. 年 8 月 28 日 岐阜

#### 国内学会

- ② 中森幹人, 岩橋 誠, 中村公紀, 中 禎二, 尾島敏康, 飯田 武, 勝田将裕, 早田啓治, 辻 俊明, 山上裕機 ワークショップ 「DPC 時代の医療経済を考慮した胃癌治療」当院における DPC の妥当性と方向性 第 82 回日本胃癌学会総会, 2010 年 3 月 4 日新潟
- ③ 中森幹人, 辻 俊明, 岩橋 誠, 藤堂具紀, 稲生 靖, 山上裕機 Analysis of an arming oncolytic herpes simplex virus in human gastric carcinoma specimen 第 69 回日本癌学会総会, 2010 年 9 月 23 日 大阪
- ④ 中森幹人, 辻 俊明, 岩橋 誠, 山上裕機 サージカルフォーラム 1 (消化器外科学会) 「消化器外科の基礎研究: 病態解明からの挑戦」 スキルス胃癌の外科臨床と 基礎研究のクロストーク 第 8 回日本消化器外科学会大会, 2010 年 10 月 15 日 横浜
- ⑤ 中森幹人, 岩橋 誠, 瀧藤克也, 中村公紀, 松村修一, 尾島敏康, 飯田 武, 勝田将裕, 辻 俊明, 山上裕機 早期胃癌に対する腹腔鏡補助下 噴門側胃切除の成績と諸問題 第 23 回日本内視鏡外科学会総会, 2010 年 10 月 19 日横浜
- ⑥ 中森幹人, 岩橋 誠, 中村公紀, 中 禎二, 尾島敏康, 飯田 武, 勝田将裕, 早田啓治, 辻 俊明, 山上裕機 スキルス胃癌 R0 切除症例後方視的 解析から考える治療の方向性 第 72 回日本臨床外科学会総会, 2010 年 11 月 21 日 横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.wakayama-med.ac.jp/med/2nd-surgery/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中森 幹人 (NAKAMORI MIKIHITO)  
和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10322372

### (2)研究分担者

山上 裕機 (YAMAUE HIROKI)  
和歌山県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20191190

岩橋 誠 (IWAHASHI MAKOTO)  
和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70244738

中村 公紀 (NAKAMURA MASAKI)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80364090

### (3)連携研究者 なし