

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10090

研究課題名(和文) 免疫チェックポイント阻害剤に耐性を示す口腔癌に対する腫瘍溶解ウイルス療法の新戦略

研究課題名(英文) New Strategy for Oncolytic Virus Therapy for Oral Cancer Resistant to Immune Checkpoint Inhibitors

研究代表者

齋藤 謙悟 (Kengo, Saito)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：70451755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：免疫チェックポイント阻害剤による癌免疫療法の効果は2割程度で大きな障害の原因は、腫瘍抗原の免疫原性が低下し免疫応答が不活化する事、腫瘍微小環境が免疫抑制状態になるためである。そこで、本研究は腫瘍溶解ウイルス療法の利点である、腫瘍溶解により腫瘍抗原を放出し免疫応答を活性化する事と、炎症性サイトカイン惹起し免疫細胞を誘導する事を応用し、腫瘍の免疫抑制状態を解除することで免疫チェックポイント阻害の腫瘍免疫療法に対する障害を克服する治療法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌において免疫チェックポイント阻害剤による腫瘍免疫療法に対し腫瘍の免疫抑制機構により治療耐性になっていることが障害である。この耐性状態を解除する方法として腫瘍溶解ウイルス療法を応用した治療法の報告はなく新しい挑戦である。また、腫瘍溶解ウイルスは腫瘍溶解により直接個々の腫瘍から様々な腫瘍抗原を放出させるため、免疫原性が高い腫瘍免疫を誘導しやすい。最終的に、耐性機構を解除する方法を解明することは学術的意義がある。また、それにより、腫瘍溶解ウイルス療法以外の化学療法でも腫瘍免疫療法の治療効果を向上させる可能性があり社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：The efficacy of cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors is only about 20%, and the major cause of failure is that the immunogenicity of tumour antigens is reduced, the immune response is inactivated and the tumour microenvironment becomes immunosuppressive. Therefore, in this study, the advantages of Oncolytic Virus Therapy, such as the release of tumour antigens by tumour lysis to activate the immune response and the induction of immune cells by inducing inflammatory cytokines, were applied to develop a treatment method to overcome the obstacles to tumour immunotherapy with immune checkpoint inhibition by lifting the immunosuppressive state of the tumour. The development of a new treatment method to overcome the obstacles to tumour immunotherapy with immune checkpoint inhibition.

研究分野：ウイルス学、腫瘍学

キーワード：腫瘍溶解ウイルス 口腔癌 免疫チェックポイント阻害剤 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

1) 免疫チェックポイント阻害剤(腫瘍免疫療法)に対する耐性

免疫チェックポイント阻害剤の奏功は2割のみで多くは治療耐性を示す。その大きな要因として、癌細胞において腫瘍抗原の免疫原性が低下し免疫応答が不活化する事、宿主側において腫瘍微小環境が免疫抑制状態になることである。

腫瘍抗原の免疫原性の低下の要因は、免疫原性の低い癌細胞がセレクションされて腫瘍を形成している事がある。また、腫瘍では異常が多いはずの DNA 損傷応答機構 [細胞に加わる刺激(紫外線、放射線、抗がん剤、ウイルスの複製)により DNA 損傷を受けた際に、DNA 損傷修復かアポトーシス誘導を行う] が正常に働き、アミノ酸変異した腫瘍抗原が発現しない事がある。

また、免疫チェックポイント阻害剤による腫瘍免疫療法と腫瘍微小環境の免疫抑制状態との関連は、治療奏功例では腫瘍微小環境内に活性系免疫細胞(細胞障害性 T 細胞、NK 細胞、抗原提示細胞)が存在する事、あるいは、抑制系免疫細胞(T 制御性細胞、MDSC、腫瘍関連マクロファージ)が存在しない事から判明している(Charlene M., ASCO Educ. Book, 2019, 39:147-164)。

2) 腫瘍免疫療法における腫瘍溶解ウイルスの役割

腫瘍溶解ウイルスは、腫瘍溶解により腫瘍抗原を放出し免疫応答を活性化すると同時に、ウイルス感染による炎症サイトカインを惹起し免疫細胞(NK 細胞、T 細胞、抗原提示細胞)を腫瘍微小環境へ誘導する。

よって、免疫チェックポイント阻害剤による腫瘍免疫療法の耐性要因となっている

腫瘍抗原に対する免疫応答の不活化と腫瘍微小環境の免疫抑制状態を改善し、腫瘍免疫が獲得するまでのネットワークを活性化する事が期待できる。

さらに、この腫瘍微小環境の免疫抑制状態では抗ウイルス免疫も抑制されるため、腫瘍溶解ウイルスの増殖には有利な環境である。しかし、腫瘍溶解ウイルス療法を単独で行った臨床試験では十分な効果が得られないことがある。原因の一つに、腫瘍細胞内で抗ウイルス機構(DNA 損傷応答、IFN- α 誘導など)が働きウイルスの増殖、溶解性を低下させる事が考えられる(ASC infect. Dis., 10.1126/science.1159051, 2008, Nargi-Aizenman J.L., Virology, 293:164-171, 2002)。

2. 研究の目的

そこで本研究は、免疫チェックポイント阻害剤による腫瘍免疫療法に耐性を示す口腔癌に対して、我々が開発してきた腫瘍溶解性ウイルス(シンドビスウイルス)を応用し、腫瘍抗原に対する免疫応答と免疫細胞の誘導を活性化させる事でその耐性を解除し、治療効果の向上と腫瘍免疫の獲得を目指す。また、両療法の効果に対し DNA 損傷応答(DDR)が問題となる場合は、DDR 阻害剤も併用し腫瘍免疫療法の効果増強を図る。

3. 研究の方法

1) 担癌動物での投与方法と安全性

マウス扁平上皮癌細胞株 SCC7 と CH3 マウスを用いて担癌マウス(SCC7/CH3 マウス)を作成し、免疫チェックポイント阻害剤(抗 CTLA-4、PD-1、PD-L1)とシンドビスウイルス(SIN)を投与(腫瘍内、静脈)し、安全性を評価する。次に、シンドビスウイルスの投与時期、投与量等を検討し、まずは腫瘍の大きさで治療効果を判定する。

2) 担癌動物での腫瘍免疫誘導性

担癌マウス(SCC7-OVA/CH3 マウス)を作成し、免疫チェックポイント阻害剤とシンドビスウイルスを投与し、リンパ節、脾臓、腫瘍から免疫担当細胞を回収し、フローサイトメトリーにて CD4 陽性細胞(Th1, 2, 9, 17, Treg) CD8 陽性細胞、樹状細胞、NK 細胞、MDSC の分布をコントロール群と比較検討する。

3) 担癌動物での腫瘍免疫の評価とその免疫細胞の抗腫瘍効果の解析

免疫チェックポイント阻害剤とシンドビスウイルス(SIN)を投与した担癌マウスの脾臓から、各 CD4 陽性細胞(Th1, 2, 9) CD8 陽性細胞を精製し、抗原に対する活性化や、同系の担癌マウスに移植した際の抗腫瘍効果を検討する。さらに、シンドビスウイルスを投与する前に、各免疫担当細胞特異抗体を投与し、免疫担当細胞の機能を抑制し、抗腫瘍効果の免疫学的メカニズムを比較解析する。

4. 研究成果

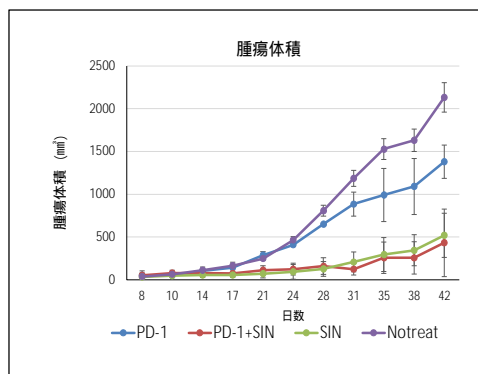
(1) 免疫チェックポイント阻害剤に治療耐性を示す担癌マウスモデルの構築と安全性評価

今研究では免疫チェックポイント阻害剤に治療抵抗性を示す、免疫を有する担癌マウスの

モデルを作成することで最も重要である。最初に、口腔癌において臨床応用がされている抗 PD-1 抗体で検討した。一回投与量は臨床基準の 3 mg/kg に設定し、治療回数は 1 週間に 2 回投与し、合計 4 回と 6 回の条件でマウス扁平上皮癌細胞株 SCC7 と CH3 マウスを用いて作成した担癌マウスモデル (SCC7/CH3) の腹腔内へ投与した。4 回、6 回ともに未治療群と比較し、腫瘍の増大が抑制されるが、最終的には治療抵抗性を示し、腫瘍が増大する抗 PD-1 抗体治療耐性担癌マウスモデルを作成できた。また、投与直後にアナフィラキシー様の症状はなかった。最終的に、呼吸器症状や皮膚症状等も無く、体重の変化も見られなかった。

(2) 免疫チェックポイント阻害剤とシンドビスウイルス療法の腫瘍抑制効果

CH3 マウスへ SCC7 を背部に移植した担癌マウスモデル (SCC7/CH3) の腫瘍容積が約 100 mm³ になったら、抗 PD-1 抗体 (PD-1) のみ、抗 PD-1 抗体と SIN の併用 (PD-1 + SIN) と SIN (SIN) のみ、無治療の 4 群に分類し治療を行った。抗 PD-1 抗体は腹腔に 1 回量を 3 mg/kg で週 2 回を 3 週間行った。シンドビスウイルスは 2.5x10⁴pfu で腫瘍内投与を行った。治療効果は腫瘍体積を測定し評価した。無治療群と比較したところ、抗 PD-1 抗体のみで治療では、腫瘍抑制効果はあったが、3 週目以降では増大率は無治療群と同等であった。以上から、今回の治療モデルは抗 PD-1 抗体療法だけは治療に耐性となる事が明らかになった。



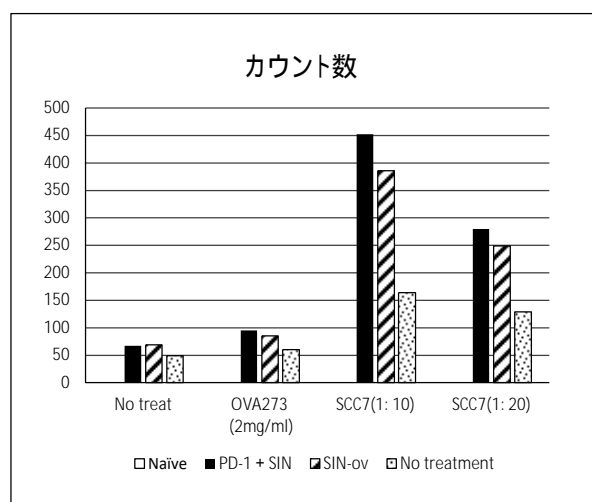
無治療群と比較して、抗 PD-1 と SIN の併用療法群と SIN のみでは有意に腫瘍抑制効果があった。しかし、併用療法群と SIN のみの間には有意な差は見られなかったが、併用療法群の方が治療効果は向上していた。

(3) 腫瘍免疫細胞評価

抗 PD-1 抗体 (PD-1) のみ、抗 PD-1 抗体と SIN の併用 (PD-1 + SIN) と SIN (SIN) のみ、無治療の 4 群の脾臓細胞を回収し、CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、Treg (Foxp3 陽性) 細胞、B 細胞、骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) の分布を解析した。抗 PD-1 抗体と SIN の併用 (PD-1 + SIN) では無治療群と比較し投与群と比較すると、CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の比率が、それぞれ 9.2% から 11.8%、4.6% から 6.1% と増加していた。また、CD4/8 比も 1.7 から 2.0 へ上昇していた。

(4) 獲得腫瘍免疫の評価

抗 PD-1 抗体 (PD-1) のみ、抗 PD-1 抗体と SIN の併用 (PD-1 + SIN) と SIN (SIN) のみ、無治療の 4 群の脾臓細胞を回収し、各腫瘍抗原 (腫瘍細胞株 SCC7、オボアルブミンペプチド) による刺激に対する IFN を発現する細胞数を ELISPOT 法で評価した。抗 PD-1 抗体と SIN の併用 (PD-1 + SIN) では無治療群と比較し投与群と比較すると、腫瘍細胞 (SCC7) による刺激に対し、有意に INF を放出する細胞数が多かった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Saito Eriko Y., Saito Kengo, Hishiki Tomoro, Takenouchi Ayako, Saito Takeshi, Sato Yoshiharu, Terui Keita, Matsunaga Tadashi, Shirasawa Hiroshi, Yoshida Hideo	4. 巻 36
2. 論文標題 Sindbis viral structural protein cytotoxicity on human neuroblastoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1173 ~ 1180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-020-04719-8	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 Shiiba Masashi, Yokoe Hidetaka, Saito Kengo, Tanzawa Hideki etc.	4. 巻 6
2. 論文標題 Development of prediction models for the sensitivity of oral squamous cell carcinomas to preoperative S-1 administration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e04601 ~ e04601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e04601	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 Komatsu Mari, Saito Kengo, Miyamoto Isao, Koike Kazuyuki, Iyoda Manabu, Nakashima Dai, Kasamatsu Atsushi, Shiiba Masashi, Tanzawa Hideki, Uzawa Katsuhiko	4. 巻 23
2. 論文標題 Aberrant GIMAP2 expression affects oral squamous cell carcinoma progression by promoting cell cycle and inhibiting apoptosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.13167	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 Shinoda Kenta, Suganami Akiko, Moriya Yasumitsu, Yamashita Masamichi, Tanaka Tsutomu, Suzuki Akane S., Suito Hiroshi, Akutsu Yasunori, Saito Kengo, Shinozaki Yoko, Isojima Kazuoki, Nakamura Naohito, Miyauchi Yasushi, Shirasawa Hiroshi, Matsubara Hisahiro, Okamoto Yoshiharu, Nakayama Toshinori, Tamura Yutaka	4. 巻 39
2. 論文標題 Indocyanine green conjugated phototheranostic nanoparticle for photodiagnosis and photodynamic therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Photodiagnosis and Photodynamic Therapy	6. 最初と最後の頁 103041 ~ 103041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pdpdt.2022.103041	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 OHNO YOSHIFUMI、YI RUIRONG、SUGANAMI AKIKO、TAMURA YUTAKA、MATSUMOTO AKIO、MATSUMOTO SHOJI、SAITO KENGO、SHIRASAWA HIROSHI	4. 巻 41
2. 論文標題 CCL299, a Benzimidazole Derivative Induces G ₁ Phase Arrest and Apoptosis in Cancer Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 699 ~ 706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.14821	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 齋藤 謙悟
2. 発表標題 HDAC阻害剤はシンドビスウイルス蛋白の発現を亢進し腫瘍融解効果を増強する
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤 謙悟
2. 発表標題 The effect of oxazolidinone compound HL17-induced on HeLa cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野 吉史、齋藤 謙悟、李 斉森、馬 雪、齋藤 江里子、菱木 知郎、白澤 浩
2. 発表標題 Ani-tumor effect of UV-inactivated Sindbis virus on human neuroblastoma cells
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020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	白澤 浩 (Shirasawa Hiroshi) (00216194)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

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