

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16392

研究課題名(和文) ミドカインプロモータ制御型がん治療用ウイルスによる肉腫に最適なウイルス療法の確立

研究課題名(英文) Development of oncolytic virus therapy for human sarcomas using midkine promoter-regulated oncolytic herpes simplex virus type 1

研究代表者

田口 慧 (Taguchi, Satoru)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40625737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、腫瘍特異蛋白であるミドカインをプロモータとして、G47 (第3世代がん治療用ヘルペスウイルス1型)のICP6遺伝子を制御する新規ウイルスを用いて、市販の肉腫細胞株における抗腫瘍効果(in vitroおよびin vivo)を検討した。これと平行して、患者由来肉腫細胞(patient-derived sarcoma cells)を用いたマウス皮下腫瘍モデル2種も確立した。今後はこれらを用いて、新規ウイルスによる腫瘍縮小効果の検討(in vivo)を実施していく予定であり、最終的に肉腫に対する最適なウイルス療法の確立を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肉腫は放射線や化学療法への感受性が低く難治であり、有効な新規治療法の開発が求められている。ウイルス療法は固形がんに対する新規治療であり、肉腫にも効果が期待できるが、これまで十分な検討がなされていない。本研究は、プロモータ制御型の新規ウイルスを用いて、市販の肉腫細胞株における効果を示すと同時に、患者由来肉腫細胞という臨床に即した材料における検討の準備段階まで行った。本研究により、肉腫に対する最適なウイルス療法戦略が確立できれば、肉腫治療におけるブレイクスルーとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：G47 is a third-generation oncolytic herpes simplex virus type 1, which has been shown to have high safety and antitumor efficacy in clinical trials against various cancers. We tested a novel G47 -based virus in which the wild-type ICP6 was deleted and a foreign ICP6 could be expressed under the control of the midkine promoter on commercially available human sarcoma cell lines both in vitro and in vivo. In addition, we established two murine subcutaneous tumor models based on patient-derived sarcoma cells. We will test the above-mentioned novel virus on these xenograft models in vivo and aim to establish the optimal oncolytic virotherapeutic strategy against human sarcomas.

研究分野：ウイルス療法

キーワード：肉腫 がん治療用ウイルス ヘルペスウイルス 患者由来肉腫細胞 ウイルス療法 ミドカイン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルス療法は固形がんに対する新規治療法であり、国内外で難治がんに対する臨床開発が進んでいる。G47Δは第3世代がん治療用ヘルペスウイルス1型であり、多くの癌腫に対する有効性が確認されるとともに、神経膠腫や前立腺癌などに対する臨床試験が実施されている(Taguchi, *Int J Urol* 2017; Taguchi, *Jpn J Clin Oncol* 2019)。

一方、肉腫は放射線・抗がん剤への感受性が低く難治であり新規治療の開発が求められている。理論上、ウイルス療法は肉腫にも有効であると考えられるが、肉腫に特化したウイルス療法の開発はほとんど行われて来なかった(Hatta, *Mol Ther Oncolytics* 2022)。一般に肉腫の研究が進みにくい理由として、肉腫は希少がんゆえに研究用の検体が得難いことが挙げられる。本研究ではこの問題を解決するため、市販の肉腫細胞株のみならず患者由来肉腫細胞(patient-derived sarcoma cells)も使用することとした。国立がん研究センター研究所では、患者由来肉腫細胞を継続的に樹立するプロジェクトを行っており、すでに複数の肉腫 PDX が利用可能な状況となっている(Oyama, *Sci Rep* 2017; Sakumoto, *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2018; etc.)。本研究ではこれらを用いることで、「研究材料の得難さ」という肉腫特有のハードルをクリアするとともに、より実臨床に即した材料におけるウイルス療法の効果の検討を計画した。

さらに本研究では、肉腫におけるウイルス療法の効果をより高めるため、G47Δをベースにした改変ウイルスを用いて、肉腫における有用性を確認する。肉腫などの緩徐増大性腫瘍ではG47Δの効果が減弱する可能性が指摘されている一方、肉腫の多くはミドカイン(MK)を高発現していることも知られている(Jin, *Clin Cancer Res* 2008)。そのため、腫瘍特異的蛋白であるMKをプロモータとしてG47ΔのDNA合成機能(ICP6 遺伝子)を復活させれば、安全性を担保しつつ効果を最大化できると考えられる。この着想に基づき、我々はG47Δを基本骨格としてMKプロモータの制御下にICP6 遺伝子を駆動する新規ウイルス T2-MK をすでに作製済みである。本研究では、この T2-MK の効果を、肉腫細胞株を用いて検討することを計画した。

以上の検討により、肉腫に対する最適なウイルス療法を確立することができれば、手術以外に根治治療のない肉腫の治療体系にブレイクスルーがもたらされることが期待された。

## 2. 研究の目的

上記の通り、本研究は、腫瘍特異蛋白であるMKをプロモータとしてG47ΔのICP6 遺伝子を制御する新規ウイルス T2-MK を用いて、肉腫により効果的なウイルス療法を確立することを目的とした。また、市販の肉腫細胞株のみならず、国立がん研究センター研究所で樹立された患者由来肉腫細胞(patient-derived sarcoma cells)を用いて、より実臨床に即した検討を行うことも目的とした。以上により、肉腫に対する最適なウイルス療法を確立し、肉腫の治療体系にブレイクスルーをもたらすことを最終目標とした。

## 3. 研究の方法

(1) G47Δを基本骨格としてMKプロモータの制御下にICP6 遺伝子を駆動するウイルス T2-MK、およびコントロールウイルスの T2-pro を用いた。まず市販の肉腫細胞株 6 種(SW872、RH30、HT1080、RD、Hs729T、SW684)を対象に、ウイルスの殺細胞効果(*in vitro*)・複製効率(*in vitro*)・腫瘍縮小効果(*in vivo*)などを以下の通り検討した。

(1)-1 各細胞株のMK発現をmRNAレベル(qPCR)および蛋白レベル(Western blot)で確認を行い、MK高発現株と低発現株に群分けを行う。

(1)-2 各細胞株で、T2-MKの殺細胞効果を検討する。

(1)-3 各細胞株で、T2-MKの細胞内複製能比較試験(replication assay)を行う。

(1)-4 各細胞株でマウスの皮下移植モデルを作製し、MK高発現株とMK低発現株に対する、T2-MK vs. T2-proの抗腫瘍効果を検討する。

(2) さらに、国立がん研究センター研究所で樹立された患者由来肉腫細胞(patient-derived sarcoma cells; 平滑筋肉腫、未分化多形肉腫、明細胞肉腫、CIC-DUX4 肉腫、横紋筋肉腫など) に対する新規ウイルスの効果も検討すべく、上記と平行して *in vivo* モデルの確立も行った。

#### 4. 研究成果

(1)-1 市販の肉腫細胞株 6 種におけるミドカイン(MK)発現レベルの確認  
各細胞株のミドカイン(MK)発現レベルは、PCR・Western blot とともに脂肪肉腫(SW872)が最大で、線維肉腫(HT1080、SW684)は低発現であった。

(1)-2 市販の肉腫細胞株 6 種での新規ウイルスの殺細胞効果(*in vitro*)  
いずれの細胞株も、高力価 (MOI 0.1)のウイルス(T2-MK・T2-pro)を感染させると、day4 にはほぼ全ての細胞が死滅した。

(1)-3 市販の肉腫細胞株 6 種での新規ウイルスの複製効率(*in vitro*)  
ミドカイン(MK)高発現の細胞株において、T2-MK は T2-pro よりも有意に高い複製能を示した。

(1)-4 市販の肉腫細胞株 2 種での新規ウイルスの腫瘍縮小効果(*in vivo*)  
ミドカイン(MK)高発現の細胞株(SW872)および、ミドカイン(MK)低発現の細胞株(HT1080)のマウス皮下腫瘍モデルに対する腫瘍縮小効果を検討した。SW872 皮下腫瘍モデルでは、T2-MK は T2-pro より有意に高い抗腫瘍効果を示した(非常に緩徐増殖性の腫瘍であった)。一方、HT1080 皮下腫瘍モデルでは、T2-MK・T2-pro とともに十分な抗腫瘍効果を示し両者に有意差を認めなかった(SW872 に比べると増殖がやや速い腫瘍であった)。

(2) 患者由来肉腫細胞(patient-derived sarcoma cells)を用いたマウス皮下腫瘍モデルの確立  
市販の肉腫細胞株を用いた実験と平行して、患者由来肉腫細胞(patient-derived sarcoma cells)を用いたマウス皮下腫瘍モデル 2 種を確立した(横紋筋肉腫と明細胞肉腫)。今後はこれらを用いて、T2-MK・T2-pro による腫瘍縮小効果の検討(*in vivo*)を実施していく予定である。

#### <参考文献>

Taguchi S, Fukuhara H, Homma Y, Todo T. Current status of clinical trials assessing oncolytic virus therapy for urological cancers. *Int J Urol* 2017; 24: 342–51.

Taguchi S, Fukuhara H, Todo T. Oncolytic virus therapy in Japan: progress in clinical trials and future perspectives. *Jpn J Clin Oncol* 2019; 49: 201–9.

Hatta M, Kaibori M, Matsushima H, Yoshida T, Okumura T, Hayashi M, Yoshii K, Todo T, Sekimoto M. Efficacy of a third-generation oncolytic herpes simplex virus in refractory soft tissue sarcoma xenograft models. *Mol Ther Oncolytics* 2022;25:225–35.

Oyama R, Takahashi M, Yoshida A, Sakumoto M, Takai Y, Kito F, Shiozawa K, Qiao Z, Arai Y, Shibata T, Araki Y, Endo M, Kawai A, Kondo T. Generation of novel patient-derived CIC-DUX4 sarcoma xenografts and cell lines. *Sci Rep* 2017;7:4712.

Sakumoto M, Oyama R, Takahashi M, Takai Y, Kito F, Shiozawa K, Qiao Z, Endo M, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. Establishment and proteomic characterization of patient-derived clear cell sarcoma xenografts and cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2018;54:163–76.

Jin Z, Lahat G, Korchin B, Nguyen T, Zhu QS, Wang X, Lazar AJ, Trent J, Pollock RE, Lev D. Midkine enhances soft-tissue sarcoma growth: a possible novel therapeutic target. *Clin Cancer Res* 2008;14:5033–42.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 田口 慧、福原 浩、内藤 晶裕、齋藤 愛穂、小山 理恵子、久米 春喜、近藤 格、藤堂 具紀
2. 発表標題 患者由来肉腫細胞におけるがん治療用ヘルペスウイルスの効果の検討
3. 学会等名 第28回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoru Taguchi, Hiroshi Fukuhara, Akihiro Naito, Haruki Kume, Tadashi Kondo, Tomoki Todo
2. 発表標題 Development of oncolytic virus therapy for sarcomas using the patient-derived cells
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田口 慧、福原 浩、内藤 晶裕、齋藤 愛穂、小山 理恵子、久米 春喜、近藤 格、藤堂 具紀
2. 発表標題 後腹膜肉腫に対するウイルス療法の開発～患者由来肉腫細胞を用いた検討
3. 学会等名 第110回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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