

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17617

研究課題名（和文）腫瘍選択的融解アデノウイルスのエクソソームを介した直接的なアブスコパル効果の検討

研究課題名（英文）Local oncolytic adenovirotherapy inducing the direct abscopal effect via exosome

研究代表者

垣内 慶彦（Kakiuchi, Yoshihiko）

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：70868356

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腫瘍融解ウイルス（OBP-301）で治療後に分泌されるエクソソームにOBP-301が搭載（Exo301）されていることをまず確認した。そしてExo301はOBP-301と同様に強力な抗腫瘍効果を持ち、また同様の作用機序を示すことも確認した。その後免疫のあるマウスの背側に腫瘍を2個作成し、片側のみを治療したところ未治療の腫瘍でも抗腫瘍効果を示した。またエクソソーム分泌阻害剤を投与したところ、抗腫瘍効果は減弱した。同様の実験を免疫のないマウスで行ったところ完全に抗腫瘍効果が消失し、アブスコパル効果にエクソソームも関与していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、OBP-301のエクソソームを介した全身性の直接的な抗腫瘍効果メカニズムの解明した。OBP-301の投与は腫瘍への局所投与に限定されるため、遠隔転移部への治療効果は期待できないと考えられていたが、本研究での結果、エクソソームを介した直接的な全身性の治療効果は全く新しい治療メカニズムであり、本研究の成果はOBP-301のみならずウイルス療法全体の魅力をさらに高め、実臨床への応用へと役立つ研究結果であると言える。

研究成果の概要（英文）：Local administration of a telomerase specific oncolytic adenovirus, OBP-301, was sometimes occurred shrinkage of metastatic lymph nodes as well as directly-administered primary tumors. We used a bilateral subcutaneous tumor model in immunodeficient mice, and in immunocompetent mice. Local administration of OBP-301 on one side delivered their-derived substances to opposite side and produced potent therapeutic effects on untreated tumor as well, suggesting that immune modulation by viruses were involved in this abscopal effect. Interestingly, in the presence of an exosome production inhibitor, these phenomenon was not observed. These results suggested that involvement of exosome encapsulating adenoviruses were demonstrated. We conclude that OBP-301 local administration has remarkable and intriguing potential to cause the abscopal effect through exosome-mediated systemic delivery of OBP-301 in addition to immune activation.

研究分野：がん治療

キーワード：細胞外小胞 ウイルス療法 アブスコパル効果 アデノウイルス ドラッグデリバリーシステム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エクソソーム (Exo) は、細胞から分泌されるナノサイズの小胞体で、細胞間情報伝達に重要な役割を担っているとされる。一方、がんに対する新規治療法であるアデノウイルスを用いたがんウイルス療法は、局所投与による強力な抗腫瘍効果と全身性の抗腫瘍免疫の増強が期待される治療法であるが、遠隔部腫瘍に対する直接的な効果に関しては不明な点が多い。本研究では、申請者らが臨床応用に向けて開発中の腫瘍選択的融解アデノウイルス製剤 (OBP-301) を用い、局所投与した腫瘍から分泌されるエクソソームが、遠隔部腫瘍へと到達した後に及ぼす治療効果に関して、ヒト大腸がん細胞株を用いて検討を行い、OBP-301 のエクソソームを介した遠隔部腫瘍に対する直接的な新規治療メカニズムの解明を目指した。

### 2. 研究の目的

アデノウイルス製剤である OBP-301 の腫瘍への局所投与により全身性の抗腫瘍免疫を増強しアブスコパル効果を引き起こすことを、申請者らはマウスモデルにおいて確認しているが、同様のアブスコパル効果が、細胞性免疫の欠失したヌードマウスにおいても認められることを同様に確認していた (図 1)。これは、抗腫瘍免疫の増強を介しての間接的な効果によるものではなく、ウイルスによる直接的な効果により

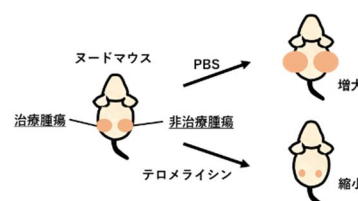


図 1 ヌードマウスの皮下腫瘍をテロメライシンにて治療した結果、未治療腫瘍においても腫瘍縮小を認める

もたらされている可能性を示唆しており、そこに細胞間の情報伝達に重要な役割を果たしているエクソソームが関与しているのではないかと考えた。

そこで本研究では、OBP-301 のエクソソームを介した全身性の抗腫瘍効果メカニズムの解明を目指すこととした。OBP-301 の投与は腫瘍への局所投与に限定されるため、遠隔転移部への治療効果は期待できないと考えられていたが、先述の通り、全身性の抗腫瘍免疫の増強を介した治療メカニズムの解明により、魅力的な新規治療薬として近年注目されるようになってきている。このような特徴は OBP-301 のみならず他のウイルス製剤でも指摘されているものであるが、本研究で解明を目指すエクソソームを介した直接的な全身性の治療効果は全く新しい治療メカニズムであり、本研究の成果は OBP-301 のみならずウイルス療法全体の魅力をさらに高めることにつながる可能性を秘めている。

### 3. 研究の方法

#### (1) OBP-301 含有エクソソーム (Exo301) の質的評価

本研究では、ヒト大腸がん細胞株 HCT116、SW48、RFP 発現 HCT116 (HCT116-RFP)、ルシフェラーゼ発現 HCT116 (HCT116-Luc)、マウス大腸がん細胞株 CT25、ヒト線維芽細胞 FEF3 を用いた。まず HCT116 を OBP-301 で治療し、培養上清から超遠心法にてエクソソームを回収した。エクソソーム (50-150nm) と OBP-301 (約 80nm) の大きさはほぼ同等であるため、この超遠心法にて回収した物質の中にはエクソソームの他に裸のウイルス自体も含まれている可能性があったためエクソソームの単離キットを用いて、純粋なエクソソーム (pure Exo301) の抽出を行い、そのエクソソーム内に OBP-301 自体あるいはその遺伝子が含まれていることを、電子顕微鏡や蛍光免疫染色、動的光散乱法、PCR を用いて検討した。

#### (2) Exo301 の抗腫瘍効果と作用機序の検討

in vitro の系において、HCT116、SW48 を Exo301 で治療し、XTT アッセイにてその抗腫瘍効果を検討した。pure Exo301 の効果を見るために、エクソソームの中和抗体を併用して実験を行い、pure Exo301 の治療効果を評価した。また、ウェスタンブロットや PCR にて Exo301 と OBP-301 の抗腫瘍メカニズムの相違を検討した。

### **( 3 ) エクソソームを介した遠隔部位へのウイルス送達に関する検討**

in vitro の系において、HCT116-RFP と HCT116 の分離式共培養を行った。HCT116-RFP に対して OBP-301 の治療を行った後に HCT116 に含まれる RFP やアデノウイルス由来タンパク (E1A) を、フローサイトメトリーやウェスタンブロットで測定した。エクソソーム合成阻害剤 (GW4869) を用いることで、エクソソームを介した現象であるか否かの評価が可能であると考え、直接治療した細胞由来のエクソソームを介した遠隔部へのウイルス送達を確認することが可能であった。

### **( 4 ) マウス両側背部皮下腫瘍モデルにおけるエクソソームを介した治療効果の検討**

上記 ( 3 ) の in vivo の系として細胞性免疫の欠失した BALB/c nu/nu マウスを用いて HCT116 と HCT116-RFP の両側背部皮下腫瘍モデルを作成し、HCT116-RFP 腫瘍のみ PBS 群、OBP-301 群 (局所投与)、OBP-301 (局所投与) + GW4869 (腹腔内投与) 群で治療し非治療腫瘍である HCT116 内に含まれる RFP および E1A、アデノウイルス 5 型タンパク (Ad5) に関して免疫組織化学染色にて解析・検討を行った。

また BALB/c nu/nu マウスを用いて、HCT116 の両側背部皮下腫瘍モデルを作成し、同様に上記 3 群で片側腫瘍のみ治療し、非治療腫瘍での治療効果を比較した。この非治療側での治療効果は、免疫以外の治療効果によるものと考えて矛盾しないと考えた。同様に BALB/c マウスを用いて CT26、NOD/SCID マウスを用いて CT26 で同様にマウスモデルを作成し同様の実験を行った。これらの実験は、治療部位に局所投与された OBP-301 が、エクソソームを介して遠隔部位へ送達され治療効果を発揮することの証拠となり得ると考えた。

### **( 5 ) 転移を有するマウス同所性腫瘍モデルにおけるエクソソームを介した治療効果と体内動態の検討**

次いで BALB/c nu/nu マウスを用いて HCT116-RFP を直腸に、HCT116 を経門脈的に投与して、肝転移を有する直腸がん同所性モデルを作成した。上記 ( 4 ) と同じ 3 群で直腸の HCT116-RFP 腫瘍を治療した後に、肝転移における治療効果を検討する。また、肝転移の他に、脳・肺・心臓・肝臓・腎臓・脾臓などの主要臓器を摘出し、免疫組織化学染色にて RFP および E1A の生体内分布を評価し、腫瘍由来エクソソームの腫瘍指向性について検討を行った。

## **4 . 研究成果**

### **( 1 ) Exo301 の質的評価**

回収された Exo301 は顕微鏡上、問題ない形状・大きさであり、内部にウイルスと思われる物質を含んでいた。また回収された Exo301 は遊離している OBP-301 も含んでいるが、回収されたものの内 pure Exo301 が約 7 割を占めることを PCR にて確認した。

### **( 2 ) Exo301 の抗腫瘍効果と作用機序の検討**

HCT116、SW48 から回収した Exo301 はそれぞれの細胞に対して非常に強力な抗腫瘍効果を示した。その一方で Exo301 を抗 CD63 抗体にて不活化させると、その抗腫瘍効果が約 7 割減弱したことから、( 1 ) の実験結果と矛盾しないことが示された。

また Exo301 は OBP-301 と同様の作用機序を示すことウエスタンブロットで確認し、その増殖についてもほぼ同様であることが PCR にて確認された。

### (3) エクソソームを介した遠隔部位へのウイルス送達に関する検討

OBP-301 で治療された HCT116-RFP の上清から回収されたエクソソーム内にはコントロール群と比較して RFP、E1A が多く含まれていた。またこのエクソソーム分泌量が GW4869 投与にて実際に用量依存的に減少することも確認した。そして、HCT116 に取り込まれた RFP は OBP-301 治療群で有意に高く、GW4869 でコントロールと同程度まで低下したことからエクソソームを介して治療細胞由来の物質が送達されていることが示唆された。

### (4) マウス両側背部皮下腫瘍モデルにおけるエクソソームを介した治療効果の検討

上記(3)の in vivo の系として行った HCT116-RFP、HCT116 背側腫瘍マウスモデル実験においても、上記(3)と同様の結果、すなわち OBP-301 治療群で有意に RFP の取り込みが増加し、GW4869 併用群では低下することが示された。また、2つの背側腫瘍を用いた実験では、非治療側腫瘍は OBP-301 投与群で有意に抗腫瘍効果を示し、GW4869 併用群でこの抗腫瘍効果が減弱していた。

以上から in vivo においてもエクソソームを介した物質送達を示され、実際に遠隔部腫瘍での抗腫瘍効果についてもエクソソームが関与していることが示された。

### (5) 転移を有するマウス同所性腫瘍モデルにおけるエクソソームを介した治療効果と体内動態の検討

In vivo での実験を行う前に、in vitro にて複数細胞での共培養を行い、その取り込みをみることにした。HCT116-RFP を下段、HCT116、FEF3 を上段で培養し下段のみを治療し上段での RFP の取り込みを見たところ HCT116、すなわち同種細胞で取り込みが多かった。また下段を GFP で染色した FEF3、上段を FEF3、HCT116 とし同様の実験を行ったところ FEF3 での GFP 取り込みが多かった。これはエクソソームの指向性を示唆した実験結果であると判断した。

次いで in vivo での実験を行ったところ、肝転移部でいずれも RFP、E1A、Ad5 の取り込みが高値であり、その他主要臓器ではほぼ取り込みが認められなかった。以上より、エクソソームは指向性を持っていることが示唆された。

図2に示すように、本研究では原発巣を治療した後に分泌されるエクソソームが OBP-301 を含んでおり、遠隔部の腫瘍へと到達した後に、取り込まれ、抗腫瘍効果を発揮する可能性を示す非常に有用な研究結果であると考えられた。またこのエクソソームは腫瘍指向性を持つ可能性があり、これは通常の全身投与薬剤よりも効率的にがん細胞へと取り込まれた結果、副作用を抑えた治療が可能になる可能性があるため、魅力的な治療であると考えられた。

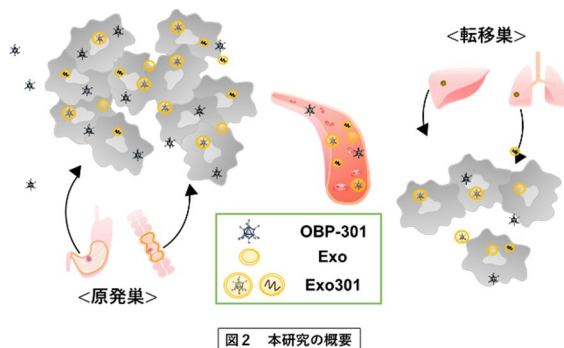


図2 本研究の概要

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kakiuchi Yoshihiko, Kuroda Shinji, Kanaya Nobuhiko, Kumon Kento, Tsumura Tomoko, Hashimoto Masashi, Yagi Chiaki, Sugimoto Ryoma, Hamada Yuki, Kikuchi Satoru, Nishizaki Masahiko, Kagawa Shunsuke, Tazawa Hiroshi, Urata Yasuo, Fujiwara Toshiyoshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Local oncolytic adenovirotherapy produces an abscopal effect via tumor-derived extracellular vesicles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 2920 ~ 2930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2021.05.015	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yoshihiko Kakiuchi, Shinji Kuroda, Nobuhiko Kanaya, Kento Kumon, Tomoko Tsumura, Masashi Hashimoto, Chiaki Yagi, Ryoma Sugimoto, Satoru Kikuchi, Masahiko Nishizaki, Shunsuke Kagawa, Hiroshi Tazawa, Yasuo Urata, Toshiyoshi Fujiwara
2. 発表標題 Innovative exosome-based therapeutics; Local oncolytic adenovirotherapy inducing the abscopal effect via exosome
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会総会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 垣内慶彦, 黒田新士, 津村朋子, 橋本将志, 八木千晶, 杉本龍馬, 菊地覚次, 西崎正彦, 香川俊輔, 田澤大, 浦田泰生, 藤原俊義
2. 発表標題 細胞外小胞がもたらす腫瘍融解アデノウイルス療法の全身性免疫賦活と局所細胞毒性
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshihiko Kakiuchi
2. 発表標題 Local oncolytic adenovirotherapy produces an abscopal effect via tumor-derived extracellular vesicles
3. 学会等名 第27回日本遺伝子細胞治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshihiko Kakiuchi, Shinji Kuroda, Nobuhiko Kanaya, Kento Kumon, Tomoko Tsumura, Masashi Hashimoto, Chiaki Yagi, Ryoma Sugimoto, Yuki Hamada, Satoru Kikuchi, Masahiko Nishizaki, Shunsuke Kagawa, Hiroshi Tazawa, Yasuo Urata, Toshiyoshi Fujiwara
2. 発表標題 Extracellular vesicle-mediated distant signaling; Systemic adenovirotherapy via immune activation and cytotoxicity
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術集会総会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 垣内慶彦、黒田新士、橋本将志、八木千晶、杉本龍馬、濱田侑紀、坂本真樹、吉田侑佑、菊地覚次、香川俊輔、田沢大、藤原俊義
2. 発表標題 外科医が思う「あったらいいな」をTranslational researchで解決する
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshihiko Kakiuchi, Shinji Kuroda, Nobuhiko Kanaya, Kento Kumon, Tomoko Tsumura, Masashi Hashimoto, Chiaki Yagi, Ryoma Sugimoto, Yuki Hamada, Masaki Sakamoto, Yusuke Yoshida, Satoru Kikuchi, Shunsuke Kagawa, Hiroshi Tazawa, Yasuo Urata, Toshiyoshi Fujiwara
2. 発表標題 Telomerase-specific oncolytic adenoviruses via extracellular vesicles plays an important role in the abscopal effect
3. 学会等名 2nd international congress of asian oncological society（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 腫瘍融解ウイルスを含有する生体由来の細胞外小胞	発明者 垣内慶彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-213874	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------