

令和 4 年 6 月 4 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：20K17690

研究課題名(和文) p53発現腫瘍融解アデノウイルス製剤と既存化学療法との免疫学的治療効果の比較

研究課題名(英文) the superiority of the p53 overexpressing oncolytic adenovirus mediated tumor-specific to chemotherapies in immunotherapy for a pancreatic cancer

研究代表者

橋本 将志 (Hashimoto, Masashi)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：10867477

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)：近年注目の免疫療法も予後不良な膵がんにおいてはその効果は限定的である。がんウイルス療法は、がん免疫療法との相性がよいと報告されている。我々が開発したp53発現腫瘍融解アデノウイルス製剤(OBP-702)を使用し、膵がんにおける治療効果と免疫学的効果をGemcitabine+nab-Paclitaxel療法との比較、併用療法で検証した。OBP-702は既存療法より強くCD8+T細胞を誘導した。またマウスを用いた遠隔転移モデルでアプスコパル効果を認め、術前治療モデルでは再投与腫瘍の増大抑制効果を認めた。この2つの治療効果はCD8を介した免疫学的治療効果の上乗せがあることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果はp53を誘導する腫瘍融解アデノウイルス製剤が既存化学療法薬剤より免疫を誘導し、併用療法においても薬剤の相乗効果のみならず免疫学的効果を発揮することをマウスモデルで示した。遠隔転移モデル、術前治療モデルそれぞれで有効な結果がでたため、難治性癌である膵癌の幅広い患者様に対する新規治療として、OBP-702を使用したウイルス療法の重要な前臨床データを作ることができた。また免疫チェックポイント阻害薬との併用効果が期待されるデータもでたため、今後膵癌の免疫療法応用にもつながるプロジェクトとなった。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is aggressive cancer with an immunologically “cold” microenvironment. We developed a telomerase-specific oncolytic adenovirus armed with p53 gene (OBP-702). Here, we investigated the immunological efficacy of OBP-702 for pancreatic cancer. Activation of CD8+ T cells by OBP-702 was retained in combination with gemcitabine+nab-paclitaxel (GN) in a PAN02 bilateral tumor model, and GN+OBP-702 showed significant anti-tumor effects and increased CD8+ T cells in OBP-702-un-injected tumors. Finally, GN+OBP-702 sustained long-term anti-tumor effects in a neoadjuvant model even after tumor resection. In conclusion, OBP-702 can be a long-term immunostimulant which brings sustained anti-tumor effects on immunologically cold pancreatic cancer.

研究分野：腫瘍融解ウイルス

キーワード：ウイルス療法 膵癌 免疫療法 腫瘍融解アデノウイルス p53

1. 研究開始当初の背景

【がん免疫療法】

がん免疫療法は免疫チェックポイント阻害剤の成功により、近年脚光を浴びるようになった。免疫活性反応の活性化にはがんワクチン療法や養子免疫療法などが、免疫抑制反応の抑制化には免疫チェックポイント阻害などが含まれる(Chen DS, et al. Immunity. 2013)。免疫活性反応の活性化による獲得免疫は、細胞障害性T細胞やB細胞を刺激し、がん細胞を攻撃することが知られる。これらの活性化につながる免疫原性細胞死(Immunogenic Cell Death: ICD)を誘発する程度は、治療法によって異なることが知られている(Workenhe ST, et al. Mol Ther. 2014)。

【膵がん治療の現状】

膵がんは最も予後不良な消化器がんの一つであり、その予後はいまだ5年生存率が10%を下回ると報告されている。ASCOガイドラインでは術前化学療法、またはそれが不可能な場合には術後化学療法が推奨され(Khorana AA, et al. J Clin Oncol. 2019)、本邦のガイドラインにおいても周術期治療が推奨されている。ただし3剤併用療法(FOLFIRINOX)や2剤併用療法(GEM + nabPTX)などさまざまなレジメンでの臨床試験が行われているものの、その予後はいまだ厳しいと言わざるを得ない。また免疫チェックポイント阻害剤などのがん免疫療法にも大きな期待が寄せられているが、Cold tumor (CD8陽性T細胞の腫瘍内浸潤が乏しい腫瘍)の代表的な疾患としてその有効性はきわめて限定的であり、本邦のガイドラインでも推奨されておらず、新規治療法の早期開発が望まれる領域である。

【ウイルス療法】

アデノウイルスやヘルペスウイルスなどを用いたウイルス療法(図1)はがんに対する有望な新規治療法のひとつとして、世界中でその研究・開発が進められている。腫瘍細胞内でのみ特異的に増殖するようにウイルス遺伝子が組み換えられており、細胞融解という独特のメカニズムを持ち、抗腫瘍免疫の活性に重要な免疫原性細胞死を誘導しやすい治療法としても注目されている(Howard L, et al. Nat Rev Drug Discov. 2015)。

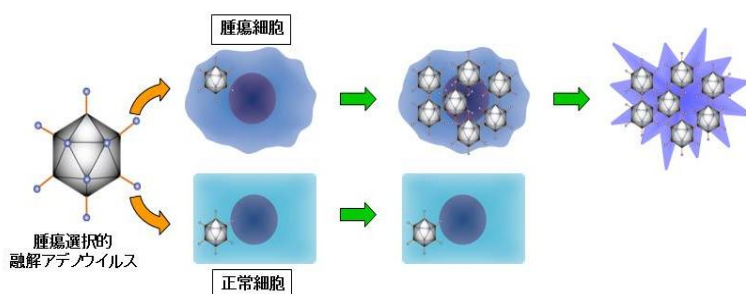


図1. ウイルス療法(腫瘍融解アデノウイルス)
腫瘍細胞内でのみ増殖し、細胞死を引き起こす。

申請者らは、腫瘍内で特異的に活性の高いヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)のプロモーターにより増殖が制御される腫瘍融解アデノウイルス製剤(テロメライシン)を開発し(Kawashima T, et al. Clin Cancer Res. 2004)、米国にて各種固形腫瘍に対する第相臨床試験を終え、その人体における安全性と体内動態を確認した(Nemunaitis J, et al. Mol Ther. 2010)。また国内では、国立がん研究センター東病院を中心に食道がんに対するテロメライシンと免疫チェックポイント阻害剤の併用療法に関する医師主導治験が進行中であり、2019年度は厚生労働省の先駆け審査指定制度品目に指定されるなど、現在テロメライシンは加速度的に臨床応用に向けた開発が進んでいる薬剤である。

さらに当研究室では、従来のテロメライシンでは効果が不十分な腫瘍に対する薬剤として、p53がん抑制遺伝子をテロメライシンに搭載したp53発現腫瘍融解アデノウイルス製剤(OBP-702)を開発した(Yamasaki Y, et al. Eur J Cancer. 2012)。p53はアポトーシスを誘導する

遺伝子であるため、OBP-702 はテロメライシンの持つ腫瘍融解による抗腫瘍効果に加え、アポトーシスによる強力な殺細胞効果を期待できる薬剤であり、実際種々のがん細胞株に対して高い抗腫瘍効果を発揮することを確認している。OBP-702 の用途として、現在では主に、膵がんや胃がん腹膜播種などの難治性がんに焦点を当てて、有効性の検討を行っている。

2. 研究の目的

本研究では、膵がんに対する OBP-702 の抗腫瘍免疫を活性化する薬剤としての有用性を、現在標準的に使用される既存の化学療法と比較、併用して、検証することを目的とする。

膵がんに対しては、様々な治療薬・治療法の開発が行われているが、がん免疫療法を含め極めて有効といえるものはないのが現状である。この Cold tumor の代表的な疾患である膵がんに対して、当研究室で開発した OBP-702 が抗腫瘍免疫を効率的に活性化し、Hot tumor (CD8 陽性 T 細胞の腫瘍内浸潤を多く認める腫瘍) に改変することが可能な薬剤であることが証明されれば、OBP-702 単剤での治療効果もさることながら、抗 PD-1 抗体などの免疫チェックポイント阻害剤との複合免疫療法にも大きな期待が高まることとなり、難治性がんである膵がんの予後延長に寄与できる可能性がある。

3. 研究の方法

(1). 膵がん細胞株に対する細胞外 ATP 誘導の比較検討

in vitro において、ヒト・マウス膵がん細胞株に対し、OBP-702 および抗がん剤で治療し、免疫原性細胞死の指標として知られ、代謝の観点からメモリー T 細胞の維持、誘導にかかわる細胞外 ATP の発現を ATP assay を用いて比較検討した。また ATP の p53 による誘導の上乗せについて AIF を介したミトコンドリア活性の経路についてウエスタンブロットで検討した。

(2). 膵がん細胞株に対する Gemcitabine+nab-Paclitaxel 療法(GN)との相乗効果の検討

細胞障害活性について相乗効果を検討した。GN を使用している中で OBP-702 が正常に p53 を発現、複製できることをウエスタンブロットで検討した。細胞周期への影響、アポトーシスマーカーである Active caspase3 の比較、ATP 放出への影響を検討した。

(3). 膵がん皮下腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果・免疫学的効果の比較検討

正常な免疫機能を有する C57BL/6 マウスに Pan02 背部皮下腫瘍を作成し、OBP-702 で治療し、コントロールと比較し以下の項目について検討した。OBP-702 は投与法が局所投与に限定されるため腫瘍内に投与し、その他の抗がん剤は全身投与とした。

腫瘍径を経時的に測定し、抗腫瘍効果を比較検討した。

脾臓・腫瘍組織を摘出し、それぞれの組織におけるリンパ球の組成、特に CD8、メモリー T 細胞の割合をフローサイトメトリーにて比較検討した。

(4). 遠隔転移モデルとしての両側皮下腫瘍モデルでの抗腫瘍効果・免疫学的効果の検討

上記(3)と同様に、正常な免疫機能を有する C57BL/6 マウスに Pan02 背部両側皮下腫瘍を作成し、OBP-702 および GN、その併用で治療した。OBP-702 は測定開始時大きい腫瘍の腫瘍内に投与し、GN は全身投与とした。また、宿主の細胞性免疫の影響を評価するために、抗 CD8 抗体を用いて同様の検討した。

(5). 術前治療モデルにおける有効性の比較検討

上記(3)と同様に、正常な免疫機能を有する C57BL/6 マウスに Pan02 背部皮下腫瘍を作成し、OBP-702 または GN、その併用で治療する。治療開始後 1 週間で腫瘍を切除し、その後 30 日間経過観察し、再発がなかったものに Pan02 細胞を皮下に再投与し、その後の増殖抑制効果を見る。また、宿主の細胞性免疫の影響を評価するために、抗 CD8 抗体を用いて同様の検討を行う。

4 . 研究成果

(1). 膵がん細胞株に対する細胞外 ATP 誘導の比較検討

免疫原性細胞死のマーカーの一つである細胞外ATPの放出は既存化学療法に比べてOBP-702が有意な差をもって放出することがわかった。またp53から誘導されるAIFというミトコンドリアを介したATPの産生メカニズムに関与するタンパクを誘導することが示唆された。

(2). 膵がん細胞株に対する Gemcitabine + nab-Paclitaxel 療法(GN)との相乗効果の検討

GNと併用する実験モデルでは、GNの併用時もOBP-702はp53、E1Aの発現することができ、効果を発揮することがわかった。抗腫瘍効果では併用治療でシナジー効果を認め、アポトーシスマーカーのActive caspase3の上昇も認めた。

(3). 膵がん皮下腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果・免疫学的効果の比較検討

In Vivoの実験ではControlに対してOBP-702 治療群で腫瘍増大抑制効果があり、レジデントメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞が腫瘍内、脾臓で増加することを確認した。

(4). 遠隔転移モデルとしての両側皮下腫瘍モデルでの抗腫瘍効果・免疫学的効果の検討

Control, GN, OBP-702, 併用の4群において、PAN02両側皮下腫瘍モデルの治療実験を行った実験では、OBP-702のアブスコパル効果の発現と、GN群に対しても併用群でアブスコパル効果の上乗せが観察された。腫瘍のリンパ球解析においてもCD8 + T細胞の増加、さらにCD8+, CD103+のレジデントメモリーT細胞の分画の増加も認められた。抗CD8抗体を使用してアブスコパル効果がCD8を介した免疫学的な治療効果であることも証明した。

(5). 術前治療モデルにおける有効性の比較検討

最後に術前治療が主流となりつつある膵癌の臨床デザインを意識し、同4群において治療開始後一週間で腫瘍を切除し、30日後に腫瘍を再投与し無治療で経過を観察するRe-challenge試験を行った。この試験においても併用治療を行った群は有意差を持って腫瘍増殖抑制効果が認められた。また抗CD8抗体を使用し、CD8T細胞を通した効果で増殖抑制が起きていることを示した。

OBP-702のウイルス局所療法をGN療法に加えることで、CD8を介した免疫が誘導され、さらにそれが長期に持続していること示唆された。特に(5)の結果は、多くの癌腫で適応になっている術前療法にこの局所療法を取り入れることで腫瘍特異的な免疫を形成でき、それが長期に持続する可能性を示唆したと考えられ、免疫チェックポイント阻害薬との相性を今後検討していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本 将志, 黒田 新士, 金谷 信彦, 八木 千晶, 津村 朋子, 公文 剣斗, 垣内 慶彦, 菊地 覚次, 田澤 大, 香川 俊輔, 水口 裕之, 浦田 泰生, 藤原 俊義.
2. 発表標題 テロメラゼ特異的腫瘍融解アデノウイルス製剤の併用による抗PD-1抗体治療効果の増強
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本 将志
2. 発表標題 膵癌に対するp53搭載腫瘍融解アデノウイルス製剤のCD8陽性エフェクターメモリー T細胞増加による長期的抗腫瘍免疫増強効果
3. 学会等名 癌免疫外科研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本 将志, 黒田 新士, 菊地 覚次, 田澤 大, 香川 俊輔, 浦田 泰生, 藤原 俊義
2. 発表標題 次世代型腫瘍融解アデノウイルス製剤の膵癌マウスモデルにおける長期免疫増強効果の解析.
3. 学会等名 日本バイオセラピー学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本 将志, 黒田 新士, 金谷信彦, 垣内慶彦, 菊地 覚次, 田澤 大, 香川 俊輔, 浦田 泰生, 藤原 俊義
2. 発表標題 p53搭載腫瘍融解アデノウイルス製剤の膵癌マウスモデルにおける長期抗腫瘍免疫増強効果
3. 学会等名 癌免疫外科研究会
4. 発表年 2022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
---------	---------