

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16219

研究課題名(和文)メラノーマ免疫療法の賦活化 - 抗PD-1抗体と腫瘍溶解性ウイルスの併用療法

研究課題名(英文)Activation of Melanoma Immunotherapy - Combination Therapy with Anti-PD-1 Antibody and Oncolytic Virus

研究代表者

前田 拓 (Maeda, Taku)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：80813542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Clone M-3メラノーマ細胞をマウス大腿部に皮下注入することで、メラノーマモデルを作成した。Clone M-3はfootpadなどの皮下組織の薄い部位では腫瘍を形成しない可能性が示唆された。フローサイトメトリーの結果、Clone M-3の播種によって、tumor-draining lymph node(TDLN)においてCD4-CD8+リンパ球が増加することが明らかになった。今回、リンパ節には肉眼的には転移を認めなかったが、TDLNにおいて腫瘍抗原に対してkiller T細胞が動員された可能性が考えられた。しかしながら、ウイルスや抗PD-1抗体の投与までは至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍溶解性ウイルスは宿主の抗腫瘍免疫活性を賦活化させることで、直接ウイルスを投与していない腫瘍に対しても治療効果を発揮することが示唆されている。腫瘍溶解性ウイルスと抗PD-1抗体の併用によって生じるリンパ球の変化を捉え、腫瘍溶解性ウイルスが持つ免疫賦活化の機序を検証することで、メラノーマ治療において新たな選択肢を増やすことに繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：A model of melanoma was established via the subcutaneous injection of Clone M-3 melanoma cells into the mouse thigh. It was hypothesized that Clone M-3 would not form masses in shallow subcutaneous tissue sites like the footpad. The implementation of flow cytometry unveiled an increase in CD4+CD8+ lymphocytes in tumor-draining lymph nodes (TDLN) upon seeding of Clone M-3. Although no obvious metastasis was detected in the lymph nodes during this study, the possibility that cytotoxic T cells were activated in response to tumor antigens in the TDLN cannot be dismissed. Notably, no virus or anti-PD-1 antibody was administered during the study.

研究分野：形成外科

キーワード：悪性黒色腫 腫瘍溶解性ウイルス 免疫 リンパ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫はメラノサイト由来の悪性腫瘍であり、その転移率の高さから進行期の予後は極めて不良である。悪性黒色腫に対する主な薬物療法は免疫チェックポイント阻害薬と分子標的薬の2つであり、これらの薬剤の単剤・併用は、術後補助療法や切除不能例、遠隔転移例に対して一定の効果が認められている。しかしながら、これらの薬物療法が効かない症例も存在し、最初には効果を認めても次第に耐性が形成されてしまうことから、次の選択肢としての新たな治療法が望まれる。

2015年、悪性黒色腫を対象に腫瘍溶解性ウイルスが初めてFDAで承認された。腫瘍溶解性ウイルスは、遺伝子改変によって癌細胞選択的に感染するよう開発されたウイルスであり、<sup>1</sup>現在転移性病変・切除困難例の2nd lineとしてNational Comprehensive Cancer Networkガイドラインにも追加されており、<sup>2</sup>悪性黒色腫薬物療法の新たな一手として大きな期待が寄せられている。腫瘍溶解性ウイルスは正常細胞内では増殖せず、癌細胞を内部から破壊・周囲の癌細胞に感染し、抗癌作用を発揮する。<sup>1</sup>さらに、免疫チェックポイント阻害薬との併用によって、相互作用により抗腫瘍免疫活性を賦活化させ、全身に抗癌作用を発揮することが明らかになっている。<sup>3</sup>しかしながら、この全身免疫賦活化効果について、免疫の司令塔であるリンパ組織(リンパ節、脾臓)でどのような変化が起こっているかを検証した報告はまだ少なく、さらなる研究が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究は、腫瘍溶解性ウイルスの持つ免疫賦活化作用を検証するために、マウスメラノーマモデルに対して腫瘍溶解性ウイルスおよび抗Programmed cell death protein 1 (PD-1)抗体を投与し、Tumor-draining lymph node (TDLN)や脾臓におけるリンパ球分布の変化を解析することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) Cell lines

- ・マウスメラノーマ細胞：Clone M-3 (Cloudman S91) 株
- ・抗PD-1抗体：Pembrolizumab (BioXCell)
- ・腫瘍溶解性ウイルス：C-REV (Canerpatrev、Takara Bio)

C-REVは単純ヘルペスウイルス1型の弱毒化株であり、タカラバイオ株式会社と資料提供契約を締結し供与を受けた。

#### (2) Plaque assay

Vero細胞を用いてC-REVのtitrationを行った。測定はPlaque assayに準じ、Plaque forming unit (PFU)で表した。

#### (3) 蛍光免疫染色

Clone M-3とC-REVを共培養し、HSV-1に対する蛍光免疫染色を行うことで、細胞への感染を確認した。

#### (4) Cell viability assay

異なる感染多重度 (Multiplicity of Infection: MOI) でClone M-3にC-REVを感染させ、パテントブルーによるcell viability測定を行った。

#### (5) マウスメラノーマモデルの作製

6-8週齢C57BL/6Nマウス(雄)を用いた。マウスの左後肢にClone M-3を注入することでメラノーマを発癌させた。

#### (6) モデルへの薬剤投与

(5)で作成したモデルに薬剤を投与した。コントロール薬剤としてPBSを使用した。投与する薬剤によって、Group A: PBS/PBS (コントロール群) Group B: C-REV/PBS (C-REV単独群) Group C: PBS/Pembrolizumab (Pembrolizumab単独群) Group D: C-REV/Pembrolizumab (併用群)の4群に分けた。

#### (7) TDLNの同定

TDLNの同定にはICG蛍光リンパ管造影を用いた。腫瘍注入部位近傍にジアグノグリーンを皮内注射し、赤外線観察カメラシステムを用いてリンパ管の蛍光造影を確認した。

#### (8) 組織採取

腫瘍移植後4-5週目にマウスを安楽死させ、TDLNおよび脾臓を採取した。採取した組織はリアルタイムPCRまたはフローサイトメトリーに使用した。

#### (9) リンパ節転移の評価

摘出したリンパ節におけるTyrosinase related protein 1の発現をリアルタイムPCR (StepOnePlus Real-Time PCR System, Applied Biosystems)で確認し、陽性であればリンパ節転移ありと判断した。

#### (10) リンパ組織におけるリンパ球分画の解析

当研究室での手法に基づき、採取した TDLN および脾臓を処理して細胞を単離し、蛍光抗体 (CD3, CD4, CD8, CD45R) で染色を行った。<sup>4</sup> フローサイトメトリー (FACS Aria, BD Bioscience) を用いてリンパ球分画を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 結果

C-REV のメラノーマ細胞への感染性について予備実験において、マウスメラノーマ細胞 B16-F10 を使用したが、Plaque assay において Plaque 形成を認めず、蛍光免疫染色においても感染は確認できなかった。そのため、メラノーマ細胞を Clone M-3 に変更した。蛍光免疫染色において Clone M-3 は FITC 標識した HSV-1 が陽性となり、感染を確認できた (図 1)。

##### Clone M-3 メラノーマモデルの検討

当研究室では従来、B16-F10 を後肢 footpad に注入することで腫瘍を形成させるモデルを用いてきた。<sup>4,5</sup> しかしながら、予備実験の段階で Clone M-3 では footpad に腫瘍を形成しなかった。そこで、先行研究を参考に側腹部、大腿部に腫瘍播種を行ったところ、大腿部において腫瘍発育が良好であったため、これを注入部位として選択した。<sup>6,7</sup>

##### Clone M-3 群 vs コントロール群の作成および組織採取

マウス左大腿部に Clone M-3 もしくは生理食塩水 (コントロール) を皮下注入し、Clone M-3 群とコントロール群を作成した。経時的に腫瘍の発育を観察し、腫瘍播種後 35 日目にマウスを安楽死させ、TDLN および脾臓を摘出した。肉眼的に明らかなリンパ節腫大や色調変化は認めなかった。

##### フローサイトメトリー

採取した TDLN および脾臓から細胞を単離・蛍光標識し、FACS AriaIII により CD45R (B 細胞) CD3 (T 細胞) CD4 (helper T 細胞) CD8 (Killer T 細胞) のリンパ球分画解析を行った。その結果、コントロール群と比較して Clone M-3 群では CD3+CD45R-リンパ球のうち CD4-CD8+リンパ球の割合が増加し、CD4+CD8-リンパ球の割合が減少していることが明らかになった (図 2)。

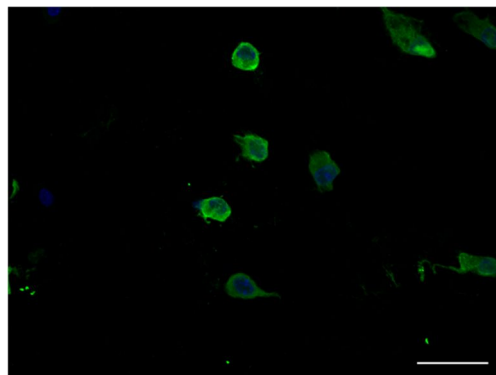


図 1. Clone M-3 への HSV-1 感染

##### (2) 考察

##### Cell line および動物モデルについて

C-REV (Canerparturev, Takara Bio) は単純ヘルペスウイルス 1 型の弱毒化株であり、タカラバイオ株式会社と資料提供契約を締結し供与を受けた。

当教室では、マウスメラノーマ細胞株 B16-F10 を用いてマウス後肢 footpad にメラノーマを発現させるモデルを考案した。<sup>5</sup> また、同モデルを用いてリンパ流に関する研究も行ってきた。<sup>4,5</sup> したがって、本研究でもこの手法に基づき、当初は B16-F10 マウス後肢 footpad モデルに C-REV を投与する計画であった。しかしながら、in vitro の段階で B16-F10 に対して C-REV の感染を認めなかったことから、他の先行研究で C-REV に感染性が確認されているマウスメラノーマ細胞株 Clone M-3 に cell line の変更を行った。<sup>6,7</sup> B16-F10 は HSV-1 に対する感受性が低いとされており、<sup>8</sup> これまでの先行研究では B16-F10 に遺伝子導入を行ったり、別の腫瘍溶解性ウイルスを用いるなどの対処を行っている。<sup>8,9</sup> また、Clone M-3 皮下注入によるマウスメラノーマモデルの報告はいくつかあるが、いずれも側腹部を注入部位として選択していた。<sup>6,7</sup> 当研究室では footpad を注入部位としてきたが、その利点としてリンパ流が明瞭で TDLN が特定しやすいことにある。しかしながら、今回予備実験の段階で footpad では腫瘍が定着しなかった。その原因として、皮下組織が薄いことに加え B16-F10 よりも Clone M-3 の増殖能が弱いことが考えられた。そこで、footpad よりも皮下組織が厚く、なおかつリンパ流が同定しやすい大腿部を注入部位として選択した。

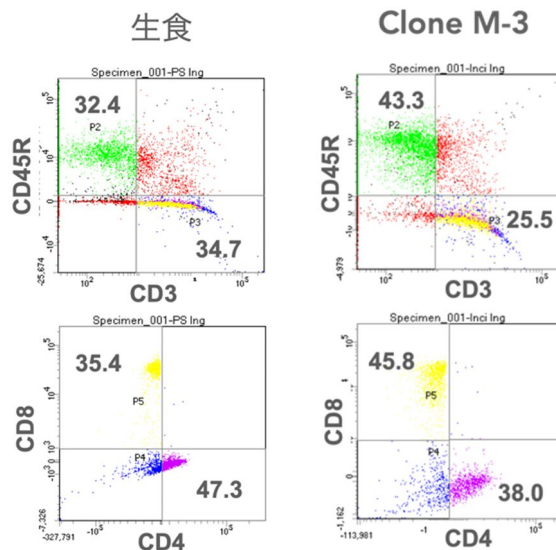


図 2. FACS によるリンパ球分画解析

##### TDLN におけるリンパ球の割合変化について

フローサイトメトリーの結果、Clone M-3 を注入することで TDLN において CD4-CD8+リン

パ球 (killer T 細胞) が増加することが明らかになった。当教室における先行研究でも、B16-F10 の存在下では免疫応答によって TDLN におけるリンパ球の構成割合が変化し、killer T 細胞の割合が増加することを明らかにしている。<sup>4</sup> 今回、リンパ節には肉眼的には転移を認めなかったが、リンパ節へ流れ込む腫瘍や抗原提示細胞由来の溶解性物質によって、TDLN において killer T 細胞が動員された可能性が考えられる。また、腫瘍存在下では免疫応答によって helper T 細胞の構成割合も変化する。すなわち、ナイーブ helper T 細胞の割合が減少し、より機能的なエフェクター helper T 細胞の割合が増加することで、抗腫瘍効果を発揮している。<sup>4</sup> ここに抗 PD-1 抗体や腫瘍溶解性ウイルスを投与することで、この応答がさらに変化することが期待される。しかしながら、今回の研究期間の範囲では、ウイルスや抗 PD-1 抗体の投与までは至らなかった。

### (3) まとめ

Clone M-3 によるマウス大腿部メラノーマモデルを確立した。Clone M-3 は footpad などの皮下組織の薄い部位では定着しない可能性が示唆された。フローサイトメトリーの結果、Clone M-3 の播種によって TDLN におけるリンパ球の分布に変化が生じることが明らかになった。しかしながら、今回の研究期間では C-REV および抗 PD-1 抗体の投与までは至らなかった。

#### <引用文献>

1. Mondal M, Guo J, He P, Zhou D. Recent advances of oncolytic virus in cancer therapy. *Hum Vaccin Immunother.* 2020 Oct 2;16(10):2389-2402.
2. National Comprehensive Cancer Network: NCCN clinical Practice Guidelines in Oncology: Melanoma: Cutaneous Version 2.2023 chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.nccn.org/professionals/physician\_gls/pdf/cutaneous\_melanoma.pdf accessed on May 8,2023
3. Andtbacka RH, Ross M, Puzanov I, Milhem M, Collichio F, Delman KA, Amatruda T, Zager JS, Cranmer L, Hsueh E, Chen L, Shilkrut M, Kaufman HL. Patterns of Clinical Response with Talimogene Laherparepvec (T-VEC) in Patients with Melanoma Treated in the OPTiM Phase III Clinical Trial. *Ann Surg Oncol.* 2016 Dec;23(13):4169-4177.
4. Maeda T, Hayashi T, Furukawa H, Iwasaki D, Ishikawa K, Funayama E, Murao N, Osawa M, Oyama A, Yamamoto Y. Immune-mediated antitumor effect of a transplanted lymph node. *Int J Cancer.* 2018 Sep 1;143(5):1224-1235. doi: 10.1002/ijc.31414. Epub 2018 Apr 17. PMID: 29603747.
5. Oashi K, Furukawa H, Nishihara H, Ozaki M, Oyama A, Funayama E, Hayashi T, Kuge Y, Yamamoto Y. Pathophysiological characteristics of melanoma in-transit metastasis in a lymphedema mouse model. *J Invest Dermatol.* 2013 Feb;133(2):537-44.
6. Watanabe D, Goshima F, Mori I, Tamada Y, Matsumoto Y, Nishiyama Y. Oncolytic virotherapy for malignant melanoma with herpes simplex virus type 1 mutant HF10. *J Dermatol Sci.* 2008 Jun;50(3):185-96. doi: 10.1016/j.jdermsci.2007.12.001.
7. Tanaka R, Goshima F, Esaki S, Sato Y, Murata T, Nishiyama Y, Watanabe D, Kimura H. The efficacy of combination therapy with oncolytic herpes simplex virus HF10 and dacarbazine in a mouse melanoma model. *Am J Cancer Res.* 2017 Aug 1;7(8):1693-1703.
8. Miller CG, Krummenacher C, Eisenberg RJ, Cohen GH, Fraser NW. Development of a syngenic murine B16 cell line-derived melanoma susceptible to destruction by neuroattenuated HSV-1. *Mol Ther.* 2001 Feb;3(2):160-8. doi: 10.1006/mthe.2000.0240.
9. Uche IK, Fowlkes N, Vu L, Watanabe T, Carossino M, Nabi R, Del Piero F, Rudd JS, Kousoulas KG, Rider PJF. Novel Oncolytic Herpes Simplex Virus 1 VC2 Promotes Long-Lasting, Systemic Anti-melanoma Tumor Immune Responses and Increased Survival in an Immunocompetent B16F10-Derived Mouse Melanoma Model. *J Virol.* 2021 Jan 13;95(3):e01359-20.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------