

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15553

研究課題名（和文）多核巨細胞形成型腫瘍溶解性HSVが誘導する細胞死に関与する細胞死メカニズムの同定

研究課題名（英文）Identification of cell death mechanism involved in multinucleated giant cell death induced by syncytial oncolytic HSV

研究代表者

鈴木 拓真（Suzuki, Takuma）

東京薬科大学・その他部局等・アルバイト職員

研究者番号：90867938

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、膜融合型の制限増殖型腫瘍溶解性HSV（CRsyn-oHSV）が誘導する多核巨細胞死にネクロプトーシスが関与しているか否かを検討した。ネクロプトーシスの実行分子であるMLKLは検討に用いた全てのがん細胞株において発現していたが、MLKLをリン酸化するRIPK3はほとんど発現していなかった。対照的に、RIPK3は線維芽細胞株においては発現していた。CRsyn-oHSVが感染したRIPK3欠損がん細胞株を線維芽細胞株と共培養したところ、RIPK3欠損がん細胞のみでは観察されなかったMLKLのリン酸化および多核巨細胞死が誘導され、ネクロプトーシスが関与することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜融合型腫瘍溶解性HSVは高い有効性が期待されているもののひとつである。本研究結果から、膜融合型腫瘍溶解性HSVの有用性を適切に評価するためには、ネクロプトーシスが正常に作動するような正常細胞をがん細胞と共培養した条件での評価が必要であることが明らかになった。より強力な膜融合型腫瘍溶解性HSVを開発するためには、例えば正常細胞は多核巨細胞形成に巻き込まず、がん細胞のみから成る多核巨細胞を形成することができる改変を組み合わせることが有用であると考えられる。本研究結果はHSV以外のウイルスを基盤とする膜融合型腫瘍溶解性ウイルスの開発においても重要な知見をもたらすことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether necroptosis is involved in death of the multinucleated giant cell formed by conditionally-replicating oncolytic herpes simplex virus (CRsyn-oHSV). MLKL, a molecule executing necroptosis, was expressed in all cancer cell lines examined, while RIPK3, which phosphorylates MLKL, was absent from most cell lines. In contrast, RIPK3 was expressed in fibroblast cell lines. When a CRsyn-oHSV-infected RIPK3-deficient cancer cell line was co-cultured with the fibroblast cell line, but not with the cancer cells themselves, MLKL was phosphorylated and syncytial death was induced. These results indicate that necroptosis is induced in multinucleated giant cells formed by CRsyn-oHSV.

研究分野：がん

キーワード：がん 細胞死 遺伝子治療 単純ヘルペスウイルス 多核巨細胞 ネクロプトーシス 腫瘍溶解性ウイルス療法 oHSV

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

腫瘍溶解性ウイルス (oncolytic virotherapy, OV) 療法は、正常細胞には感染せずがん細胞に対して選択的に感染するウイルスを治療薬として用いたがんに対する治療法である。2015 年に欧米にて腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス (oncolytic herpes simplex virus, oHSV) の T-VEC が世界で初めて医薬品承認され、本邦でも oHSV の G47 Δ が医薬品承認されるに至っている。これらの oHSV を含め、正常細胞において効率良く増殖するために必要な γ 34.5 等のウイルス遺伝子を欠失している制限増殖型 oHSV (conditionally replicating oHSV, CR-oHSV) は各国で実施された臨床試験の結果から安全性が高いことは認められているものの、高い有効性を発揮するに至るものは限られており、より高い治療効果を得るための改良が求められている。

HSV の制限増殖型への改変は、がん細胞に対する HSV の殺傷能をある程度低下させてしまうため、CR-oHSV は HSV 本来の細胞傷害性を発揮できないと考えられる。研究代表者が所属する研究グループの内田らは、治療標的として選択した細胞表面抗原に対する抗体を HSV の細胞内侵入を規定する外被糖タンパク質に組み込むことにより、標的抗原を発現するがん細胞にのみ感染する受容体標的化 oHSV (receptor-retargeted oHSV, RR-oHSV) を開発した。RR-oHSV の大きな特色は、 γ 34.5 遺伝子等の増殖に関与する遺伝子を欠失していないため、HSV 本来の細胞傷害性を保持している点と標的抗原を発現しない正常細胞に侵入しないため、正常細胞に侵入した際に生じる抗ウイルス応答を回避できる点にある。このように、RR-oHSV は CR-oHSV とは性質が大きく異なる oHSV であると位置付けられる。

一般的に、HSV は宿主細胞への侵入と細胞外への娘ウイルスの放出を繰り返す様式で感染を拡大させるが、特定のウイルスタンパク質に変異 (syn 変異) を有する HSV は感染細胞と周囲の非感染細胞の細胞膜を融合させることによる多核巨細胞形成を伴いながら感染を拡大させる。多核巨細胞形成型 HSV は通常の HSV よりも速やかに感染を拡大させるため、細胞傷害性が高いと考えられている。また、多核巨細胞形成を伴う細胞死は効率良く免疫反応を惹起させ、抗腫瘍免疫反応を増強すると考えられている。これらのことから、oHSV の多核巨細胞形成型への改変による治療効果の増強が試みられてきた。

2. 研究の目的

最近、研究代表者は RR-oHSV および γ 34.5 欠失型 CR-oHSV に syn 変異を導入することにより多核巨細胞形成型 oHSV (RRsyn-oHSV および CRsyn-oHSV) を作製し、syn 変異の導入がそれぞれの oHSV の感染性に及ぼす影響を比較した (Suzuki et al., Mol Ther Oncolytics, 2021)。その中で、in vitro においてはヒトがん細胞株に対して両ウイルスが同様の感染性を示す一方で、in vivo においては同細胞株の担がん免疫不全マウスモデルに対して RRsyn-oHSV が CRsyn-oHSV よりも顕著に高い抗腫瘍効果を発揮することを報告した (図 1)。加えて、がん細胞と正常細胞を共培養した条件において両ウイルスを感染させることにより、CRsyn-oHSV が形成する多核巨細胞は正常細胞を含み、比較的早期に細胞死に至る一方で、RRsyn-oHSV が形成する多核巨細胞は正常細胞を含まず、細胞死に至りにくいために感染拡大が長期的に持続することを明らかにした (図 2)。これらの結果から、感染後に生じる細胞死が遅ければ遅いほど、効率良く腫瘍内伝播し、強力な抗腫瘍効果を発揮することが可能であることが示唆された。

RRsyn-oHSV と CRsyn-oHSV が正常細胞とがん細胞が共存する環境において形成する多核巨細胞の細胞構成および細胞死に至るまでの速さが異なることから、これらのウイルスが誘導する細胞死のメカニズムは大きく異なると予想される。先行研究の結果から、細胞死の誘導を抑制することにより、腫瘍内の感染拡大効率を増強することができると考えられるが、細胞死のメカニズムが未解明のため、現時点で合理的な改変戦略を立案することは困難である。そこで、正常細胞とがん細胞が共存する環境において多核巨細胞形成型 oHSV が生じさせる多核巨細胞死に関与する細胞死メカニズムを同定することにより、細胞死を抑制する多核巨細胞形成型 oHSV を開発するための改変戦略の基盤となる知見を得ることを本研究の目的とした。

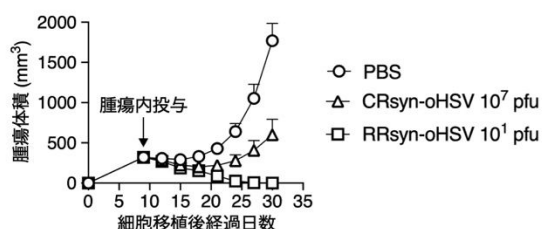


図1 ヒトがん細胞株の担がんマウスモデルに対するRRsyn-oHSVの抗腫瘍効果

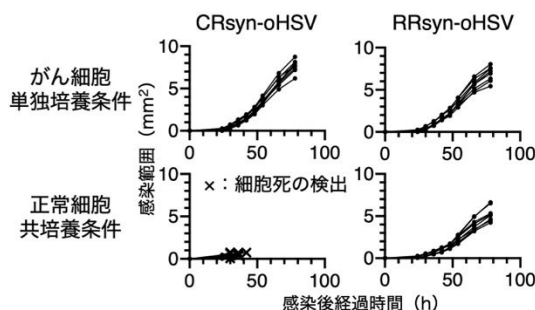


図2 正常細胞共培養条件下における多核巨細胞形成型oHSVの感染拡大

3. 研究の方法

(1) 細胞

がん細胞として、マウス肝がん細胞株 Hepa 1-6 および Hepa 1-6 細胞にヒト epithelial cell adhesion molecule (hEpCAM) を強制発現させた亜株 (Hepa 1-6-hEpCAM) マウス骨肉腫細胞株 K7M2-WT、マウス大腸がん細胞株 MC38、CT26.WT ならびに CT26.CL25、マウス神経芽腫細胞株 N18、マウス腎がん細胞株 MBT-2、マウス乳がん細胞株 4T1、マウス中皮腫細胞株 AB1、マウス線維肉腫細胞株 MCA205、マウス悪性黒色腫細胞株 Clone M-3 を用いた。非がん細胞として、マウス線維芽細胞株 3T6 および L-929 を用いた。RIPK3 の関与を評価するために、Hepa 1-6 細胞にマウス receptor-interacting protein kinase 3 (RIPK3) を強制発現させた亜株 (Hepa 1-6-RIPK3) および陰性対照細胞株 (Hepa 1-6-mock) を用いた。

(2) ウイルス

EpCAM 標的化 RRSyn-oHSV (KGNEp-BhKt) および CRsyn-oHSV (KGΔ-BhKt) は以前報告したものを使用した (Shibata et al., Gene Ther. 2016; Suzuki et al., Mol Ther Oncology. 2021)。これらのウイルスは CMV プロモーター制御下で緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を発現し、2 種類の膜融合誘導変異 (gB:R858H および gK:A40T) を有する。KGΔ-BhKt は正常細胞において効率良く増殖するために必要な γ 34.5 遺伝子を欠失しており、KGNEp-BhKt は細胞内侵入増強変異 (gB:D285N/A549T) および EpCAM 標的化 gD を有する。

(3) ネクロプトーシスの検出

プロテアーゼ阻害剤およびホスファターゼ阻害剤を添加した RIPA バッファーを用いて培養細胞あるいはウイルス感染細胞からタンパク質抽出液を調製し、抗 MLKL 抗体、抗リン酸化 MLKL 抗体ならびに抗 RIPK3 抗体を用いたウエスタンブロッティング解析にて各タンパク質の発現を評価した。

(4) がん細胞と非がん細胞の共培養条件におけるウイルス感染

Hepa 1-6-hEpCAM 細胞の単細胞懸濁液に KGNEp-BhKt あるいは KGΔ-BhKt を感染多重度 (MOI) が 0、0.003 もしくは 0.01 になるように加えて、37℃ で 2 時間転倒混和することにより感染させた。感染細胞を Hepa 1-6-hEpCAM 細胞あるいは 3T6 細胞と共に播種し、37℃ で 42 時間培養した。

(5) がん細胞と RIPK3 発現細胞の共培養条件における多核巨細胞死の検出

Hepa 1-6 細胞の単細胞懸濁液に KGΔ-BhKt を MOI が 0.001 あるいは 0.01 になるように加えて、37℃ で 2 時間転倒混和することにより感染させた。感染細胞を同数の Hepa 1-6-mock 細胞あるいは Hepa 1-6-RIPK3 細胞もしくは Hepa 1-6-mock 細胞の懸濁液と Hepa1-6-RIPK3 細胞の懸濁液を 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 の割合で混合した細胞懸濁液と共に播種し、1%メチルセルロース含有培地あるいは 0.5 μ M となるように死細胞染色試薬 SYTOX Orange を加えた培地を用いて 37℃ で 2~3 日間培養した。

4. 研究成果

(1) がん細胞株におけるネクロプトーシス制御分子の発現

まず、がん細胞と非がん細胞が共存する条件において形成される多核巨細胞死の特徴を確認するために、がん細胞と非がん細胞の共培養条件における多核巨細胞死の様子を継続的に観察した。その結果、細胞膜の崩壊に伴って細胞内の EGFP が速やかに消失している様子が観察された。このことから、細胞膜の崩壊を伴うネクロプトーシスが関与する可能性があると考えられた。ネクロプトーシスは RIPK3 によって特異的にリン酸化された mixed-lineage kinase domain-like (MLKL) が細胞膜に小孔を形成することにより細胞膜の安定性が崩壊することで誘導される細胞死であり、野生型 HSV の感染により誘導されることが報告されている。そこで、ネクロプトーシスを制御する MLKL および RIPK3 のがん細胞における発現を確認した (図 3)。MLKL はすべてのがん細胞株において同程度発現していた一方で、RIPK3 はほとんどのがん細胞株において発現しておらず、ネクロプトーシスを効率良く誘導することが報告されている L-929 と同程度の RIPK3 を発現する細胞株は AB1 細胞のみであった。これらの結果から、がん細胞は RIPK3 の欠損によりネクロプトーシスが誘導されにくいことが示唆された。

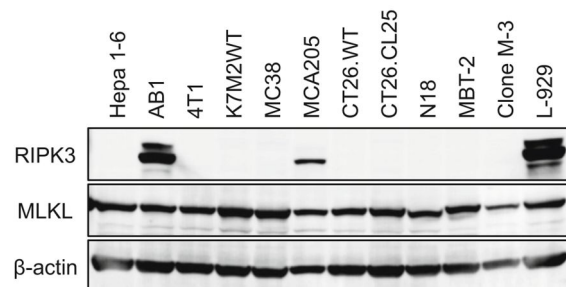


図 3 がん細胞株における RIPK3 および MLKL の発現

(2) がん細胞と非がん細胞の共培養下におけるネクロプトーシスの誘導

がん細胞と非がん細胞の融合が膜融合型 oHSV の感染により誘導された際にネクロプトーシスが誘導されているか否か確認するために、図 3 において用いたがん細胞のうち HSV の感染を最も許容し、RIPK3 を発現しない Hepa 1-6 細胞にヒト EpCAM を強制発現させた細胞 (Hepa 1-6-hEpCAM) をがん細胞のモデル細胞、CR-oHSV の正常細胞に対する感染性評価に頻用されており、RIPK3 を発現する線維芽細胞株 3T6 を非がん細胞のモデル細胞として用いて、がん細胞と非がん細胞の融合を誘導する CRsyn-oHSV である KGΔ-BhKt あるいはがん細胞と非がん細胞の融合を誘

導せずがん細胞のみから成る多核巨細胞を形成する EpCAM 標的化 RRSyn-oHSV である KGNEp-BhKt のがん細胞と非がん細胞の共培養下におけるネクロプトーシスの誘導の有無を評価した。KG Δ -BhKt あるいは KGNEp-BhKt をあらかじめ感染させた Hepa 1-6-hEpCAM 細胞を同細胞あるいは 3T6 細胞と共培養した細胞における EGFP の蛍光シグナルを観察したところ、Hepa 1-6-hEpCAM 細胞のみの培養条件ではいずれのウイルスも同程度の EGFP を発現する多核巨細胞型プラークを形成したが、3T6 細胞を共培養する条件では KGNEp-BhKt を感染させた条件でのみ Hepa 1-6-hEpCAM のみの培養条件と同様の EGFP 発現プラークが観察され、KG Δ -BhKt が形成するプラークにおいては極めて弱い蛍光シグナルしか観察されなかった (図 4A)。これらの結果から、KG Δ -BhKt を感染させたがん細胞と非がん細胞を共培養した条件において細胞膜の透過性亢進を伴う細胞死が誘導されることが示唆された。

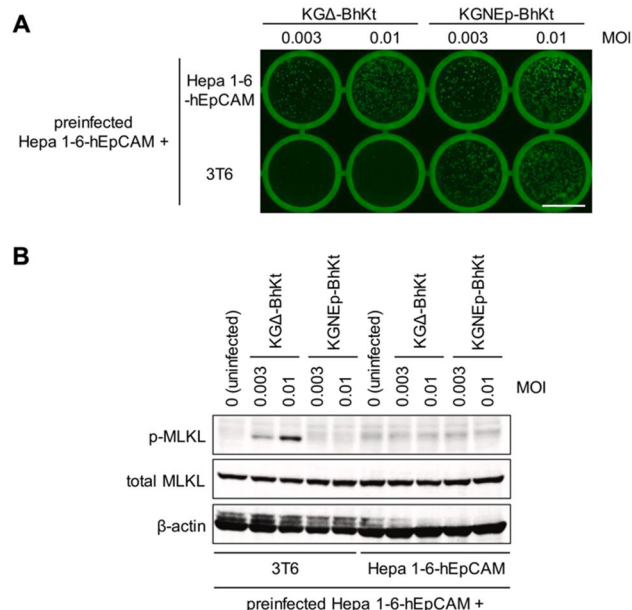


図 4 リン酸化 MLKL の検出によるネクロプトーシスの評価

次に、ネクロプトーシス誘導の指標となるリン酸化 MLKL に対して特異的に結合する抗体を用いたウエスタンブロッティング解析により、これらの細胞において、ネクロプトーシスが誘導されているか否かを検討した。いずれの条件においても MLKL は同程度検出されたが、リン酸化 MLKL は KG Δ -BhKt を感染させた Hepa 1-6-hEpCAM 細胞と 3T6 細胞を共培養した条件においてのみ検出され、検出量はウイルス量に依存して増加した (図 4B)。これらの結果から、KG Δ -BhKt が非がん細胞とがん細胞を融合した場合にのみ MLKL がリン酸化され、ネクロプトーシスが誘導されることが示唆された。興味深いことに、Hepa 1-6-hEpCAM 細胞において RIPK3 が欠損しているにもかかわらず、KG Δ -BhKt を感染させた Hepa 1-6-hEpCAM 細胞と 3T6 細胞を共培養した場合にネクロプトーシスが誘導されることが明らかになった。このことから、ネクロプトーシスは多核巨細胞形成に RIPK3 発現細胞が巻き込まれた際に誘導されることが示唆された。

(3) RIPK3 発現細胞を多核巨細胞形成に巻き込むことによるネクロプトーシスの誘導

多核巨細胞の早期のネクロプトーシスを誘導するための RIPK3 の供給源として RIPK3 発現細胞が機能するか否かを評価するために、KG Δ -BhKt を感染させた Hepa 1-6 を RIPK3 を Hepa 1-6 に強制発現させた細胞 (Hepa 1-6-RIPK3) あるいはその陰性対照細胞 (Hepa 1-6-mock) と細胞死検出試薬 SYTOX oranges 存在下に共培養した。Hepa 1-6-mock 細胞を共培養した条件では SYTOX orange の蛍光シグナルは観察されず、細胞死が誘導されていないことが示唆されなかった一方で、Hepa 1-6-RIPK3 細胞を共培養した条件では、共培養する Hepa 1-6-RIPK3 細胞の細胞数が多くなるほど SYTOX orange の蛍光シグナルが早期に観察された (図 5A)。これらの結果から、KG Δ -BhKt が感染した RIPK3 を欠損するがん細胞と RIPK3 を発現する細胞が融合することにより RIPK3 が供給され、早期の多核細胞死が誘導されたことが示唆された。加えて、RIPK3 を供給する細胞は非がん細胞である必要は無く、RIPK3 の発現量に依存して多核巨細胞死を誘導することが示唆された。同様の実験条件におけるリン酸化 MLKL の発現を確認したところ、Hepa 1-6-mock 細胞を共培養した条件ではリン酸化 MLKL は検出されなかった一方で、Hepa 1-6-RIPK3 細胞を共培養した条件では、共培養する Hepa 1-6-RIPK3 細胞の数が多くなるほど多くのリン酸化 MLKL が検出された (図 5B)。これらの結果から、RIPK3 発現細胞を多核巨細胞形成に巻き込むことにより早期のネクロプトーシスが誘導されることが確認できた。

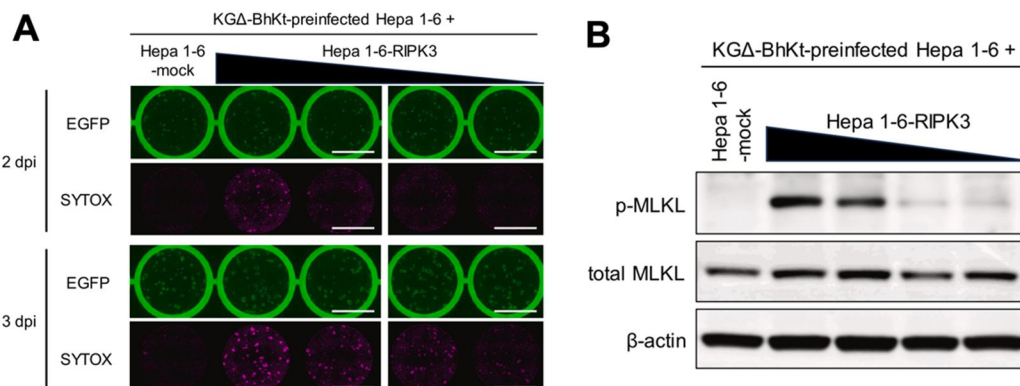


図 5 RIPK3 発現がん細胞を多核巨細胞形成に巻き込むことによるネクロプトーシスの誘導

本研究により、RIPK3 を発現する細胞（主に非がん細胞）がネクロプトーシスの誘導により CRsyn-oHSV の感染拡大を抑制する要因となることが明らかになった。CRsyn-oHSV は高い有効性が期待され、国内外で開発が進められてきたが、今後はその有効性評価において非がん細胞の存在を念頭に入れる必要があると考えられる。非がん細胞を多核巨細胞形成に巻き込むことにより誘導されるネクロプトーシスを回避する方法として、がん細胞のみから成る多核巨細胞を形成することが可能となる受容体標的化改変は有用であるため、すでに開発された CRsyn-oHSV に受容体標的化改変を施すことにより有効性のさらなる増強が期待できる。HSV 以外のウイルスを基盤とする腫瘍溶解性ウイルスにおいても多核巨細胞形成型に改変する方法は注目されているため、本研究成果は多核巨細胞形成型 oHSV の開発分野のみならず多核巨細胞形成型腫瘍溶解性ウイルスの開発分野に広く資するものであると考えられる。今後はネクロプトーシス以外の細胞死メカニズムの関与の有無や、早期のネクロプトーシス誘導を回避する方法の開発を試みる。

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 Suzuki Takuma、Uchida Hiroaki	4 . 巻 32
2 . 論文標題 Induction of necroptosis in multinucleated giant cells induced by conditionally replicating syncytial oHSV in co-cultures of cancer cells and non-cancerous cells	5 . 発行年 2024年
3 . 雑誌名 Molecular Therapy: Oncology	6 . 最初と最後の頁 200803 ~ 200803
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omton.2024.200803	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 Takuma Suzuki, Hideaki Tahara, Hiroaki Uchida
2 . 発表標題 Augmentation of anti-tumor effects of receptor-retargeted oncolytic HSV (RR-oHSV) through introduction of syn mutations
3 . 学会等名 第29回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 Takuma Suzuki, Hideaki Tahara, Hiroaki Uchida
2 . 発表標題 Development of IL13RA2-retargeted syncytial oncolytic herpes simplex virus (IL13RA2-specific RRsyn-oHSV)
3 . 学会等名 第96回日本生化学会大会
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 鈴木拓真、田原秀晃、内田宏昭
2 . 発表標題 受容体標的化腫瘍溶解性HSV(RR-oHSV)へのsyn変異の導入による抗腫瘍効果の増強
3 . 学会等名 第1回日本ウイルス療法学会学術集会
4 . 発表年 2023年

1．発表者名 鈴木拓真、内田宏昭
2．発表標題 多核巨細胞形成型腫瘍溶解性HSVの感染拡大はがん細胞と非がん細胞の融合により誘導される細胞死によって抑制される
3．学会等名 第1回日本ウイルス療法学会学術集会
4．発表年 2023年

1．発表者名 鈴木拓真、田原秀晃、内田宏昭
2．発表標題 受容体標的化腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス(RR- α HSV)へのsyn変異の導入による抗腫瘍効果の増強
3．学会等名 第46回日本分子生物学会年会
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
---------	---------