

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591946

研究課題名(和文) 胃癌選択的殺細胞効果を強化した新しいウイルス療法の開発

研究課題名(英文) New development of a selective oncolytic virotherapy for gastric cancer

研究代表者

中森 幹人 (Nakamori, Mikihiro)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：10322372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌治療用遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス(T-01)の基本骨格に外来配列を直接組み込むことで、特殊機能を有し、かつ胃癌治療に臨床応用可能な遺伝子組換えウイルスの開発研究を施行した。我々がスクリーニングした分子であるサイトカインシグナリング3抑制(SOCS-3)発現癌治療用ヘルペスウイルスを作製して評価し、高い治療効果を実験モデルにおいて確認した。将来の臨床応用を見据えた胃癌治療用ヘルペスウイルス療法の基礎開発が進んだと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We developed recombinant oncolytic herpes simplex viruses that possess certain antitumor functions and are useful for gastric cancer therapy. A third-generation oncolytic herpes simplex virus type 1(T-01) was used as the backbone to insert foreign sequences. Oncolytic herpes simplex viruses expressing suppressor of cytokine signaling 3 (T-SOCS-3) were constructed, evaluated, and proved to be therapeutic potential. T-SOCS-3 may be a new agent against gastric cancer in the near future, and a progress has been made in the basic development of next generation oncolytic virotherapy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胃癌 ウイルス療法 オートファジー サイトカインシグナル

1. 研究の背景・目的と準備状況

我が国では臨床試験が始まった癌治療用アデノウイルスやヘルペスウイルスに関しては更なる改良が着々と進んでいる。まず、アデノウイルスでは、化学療法の効果判定やナビゲーション外科⁹⁾が可能となるような製剤としての可能性がすでに報告されている。ヘルペスウイルス研究開発においても、我々の施設では G47Δ を用いた消化器癌に対する臨床試験を目指しながら、基礎研究開発も行っている。まず、ヘルペスウイルスには感染の際に宿主細胞を周囲の細胞と融合させる性質を有するいわゆるサブタイプが存在する。G207 から選別された融合亜系の Fu-10 はそのひとつである。また、syncytium と呼ばれる細胞融合を誘導する遺伝子を発現するように遺伝子組換えした Synco-2D は殺細胞効果が増強することを確認した。最近では、G47Δ の改良型である T-01 のゲノムに治療遺伝子を直接組み込み、増幅型遺伝子発現ベクターの機能を持たせて治療に応用する試みを行っている。具体的には、bacterial artificial chromosome (BAC) を利用し、第 3 世代腫瘍溶解性ヘルペスウイルスである T-01 のゲノムに治療戦略に応じた遺伝子をと組み込むシステムを取り入れ、研究開発に努めている。その理由として、ウイルス療法は化学療法や放射線治療との併用により相乗効果が期待できるためである。例えば、低線量の放射線照射が RR 活性を上昇させ、その結果、ヘルペスウイルスの複製能を増強させたという報告や、ある種の抗癌剤が癌細胞の Growth Arrest and DNA damage inducible Protein 34 (GADD34) を誘導させることで腫瘍内でのウイルスの複製能を増強させることがわかっている。そこで我々は、胃癌に

感受性を有するタキサン (taxane) 系抗癌剤に注目し、これに関連する分子を T-01 に組み込む研究を行った。タキサン系抗癌剤は tubulin 重合形成や細胞周期に関連して抗癌作用を有することはよく知られているが、近年、タキサンによる thrombospondin-1 (TSP-1) が介する CD family に様々な形で関連していることがわかった。¹⁵⁾そこで、TSP-1 を癌治療用ヘルペスウイルスに遺伝子組み込みすることで TSP-1 発現 oncolytic HSV-1 として機能する T-TSP-1 の開発した。T-TSP-1 は癌治療用ヘルペスウイルスに感受性が低い胃癌細胞に関しても TSP-1 を介した抗腫瘍血管新生抑制効果を有することがわかり、このシステムを応用した新しいヘルペスウイルス開発が必要不可欠と考え、本研究課題を遂行した。

2. 研究の方法

「平成 23 年度」

(1) 胃癌に対する分子標的機能強化型ヘルペスウイルスの開発

スキルス胃癌細胞株 TMK-1 に対して腫瘍溶解ヘルペスウイルスが一定の殺細胞効果を有することを確認したうえで、腫瘍特異的感染能と増殖能を増強する必要があると考え、ウイルスの胃癌細胞に対する標的化を追求する。そこで、まず、ToGA study で報告された HER2/neu 陽性胃癌に対する分子標的薬 trastuzumab の併用効果の有用性を示した第 III 相試験の結果を考え、HER2/neu を標的とした分子標的能強化型腫瘍溶解ヘルペスウイルスの新規開発を行う。さらに、ヘルペスウイルス側の envelope glycoprotein である gD を遺伝子改変し、CEA 発現胃癌細胞株に対して特異的に感染するヘルペスウイルスを作成する。これ

らの少なくとも2種類の分子標的機能増強型ヘルペスウイルスの作成後, in vitro 系の実験系を用いて, 胃癌細胞株の HER2/neu, CEA の発現強度に分けて, これらのウイルスの感染能, 複製能, 殺細胞効果を検討する.

(2) 胃癌腹膜播種・リンパ節転移規定遺伝子の同定と, これを認識するヘルペスウイルス作成のスクリーニング

切除した胃癌切除標本の凍結組織 40 例 (腹膜播種陽性 10 例, 陰性 10 例, リンパ節転移陽性 10 例, 陰性 10 例) を対象に, マイクロダイセクション法により胃癌細胞のみを回収し RNA を抽出する. GeneChip Human U133 plus 2.0 array (Affymetrix 社) を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い, 腹膜播種陽性群と陰性群, リンパ節転移陽性群と陰性群で各遺伝子の発現量を dChip software を用いて比較 (fold change 1.5 倍以上 2 群間の平均強度差 100 以上の予定) し, 胃癌の再発形式として頻度の高い腹膜播種, もしくはリンパ節転移のバイオマーカーを推測し, これらのバイオマーカーを標的としたヘルペスウイルスが作成可能か否かを分子生物学的に確認する. さらに抽出できた分子の中から, 前述のヘルペスウイルスの gD に遺伝子工学的に組み込めるか否かを選択, 検討する.

「平成 24 年度以降」

(3) 平成 23 年度で作成したヘルペスウイルスの性能を確認の後, 胃癌モデル (予定モデル: HER2/neu 陽性, 陰性, CEA 陽性, 陰性) に対して担癌モデルでの検討

(以下に実験プロトコル概要を示す)
Day 1: 胃癌細胞株, 臨床症例 (倫理委員会承認) から樹立した胃癌細胞 (3×10^6 個) を 7 週齢 athymic female BALB/c ノードマウス

に腹腔内投与する.

Day 7: HER2/neu もしくは CEA retargeting 出来るように開発 (平成 23 年度研究計画 (1)) したヘルペスウイルス (1×10^9 ウイルス粒子) を腹腔内投与する (各治療群は $n=7$ とする治療 7 日目に各群より 3 匹を麻酔下に蛍光発色条件でナビゲーション仮想手術を行う. その後, 腫瘍含む各臓器 (腹膜, 腸管, 肝臓, 脾臓) の組織学的診断を H&E 染色と X-gal 染色により評価する. 残りの群に関しては生存期間をエンドポイントとして継続観察を行う.

(4) 癌幹細胞(CSC)に対しても強力な殺細胞効果を有するオートファジー誘導ヘルペスウイルスの効果の検証

抗癌剤感受性試験研究で用いた方法 (Anticancer Res, 2005) を用いて, 90% 以上純化胃癌細胞より, CSC のマーカーとしても知られる ABCG2 (ATP-binding cassette, subfamily G, member 2) を発現する胃癌細胞を色素 Hoechst 33342 を用いてフローサイトメトリー上で SP (side population) 細胞として区別し, 作成したオートファジー誘導ヘルペスウイルスに対する感受性を検討する.

(5) 分子標的機能強化型ならびにオートファジー誘導ヘルペスウイルス療法の第 I 相臨床研究計画

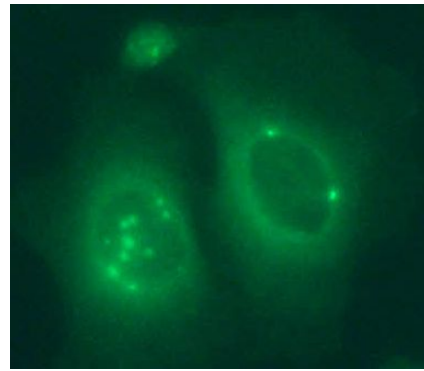
平成 24-25 年度内に達成が予想される胃癌に対する分子標的化ウイルス療法の基礎的検討の解析の結果, 安全性が確認出来た場合, 第 I 相臨床試験のプロトコル作成に取りかかる. 本研究は, ウイルス療法と遺伝子治療が組み合わせられた治療法であるため, 従来よりも詳細な計画書の作成が必要である. そこで, 我が国で臨床試験の経過が判明していると考えられる T-01 の臨床計画や, 国内外でのウイルス療法, 遺伝子

治療の実際の現場における情報収集も積極的に行う。

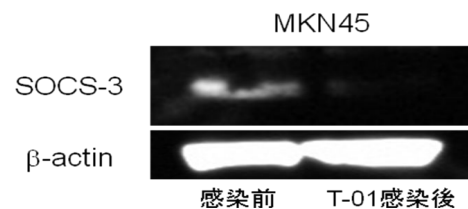
3. 研究成果

「平成 23 年度」

HER2 分子標的型ヘルペスウイルスの開発を主目的として、特に、ヘルペスウイルスの envelope glycoprotein である gD 部分の遺伝子工学的改変を主目的とした。まず、ヘルペスウイルスの gD 部分を含むシャトルベクターを用いて、HER2 分子に選択的に結合する分子の改変に取りかかったが、この遺伝子改変には相当の時間を要することが研究経過中に判明し、当該年度内を越えての目標達成が見込まれた。また、実地臨床応用を想定して、胃癌切除標本の HER2 分子の発現頻度を免疫染色して検討すると、全体の 10%程度の陽性率であり、欧米からの報告に比べて低頻度であることが判明した。一方、平行して進めていたオートファジーとヘルペスウイルス関連性の検証に関して、以下に示す新たな知見が得られた。諸家の報告では、腫瘍溶解型アデノウイルスの場合、オートファジーは腫瘍溶解においてオートファジーは正の効果作用とされている。我々の当該年度の研究では、胃癌細胞において、オートファジー現象はほぼ恒常的に認められてはいるものの、腫瘍溶解型ヘルペスウイルスの複製には、むしろ抑制的に関与している可能性が示唆された。腫瘍溶解型ヘルペスウイルスにオートファジー機能を付加することはむしろ逆効果となる可能性があり、非常に有用な知見であると考えられる。(右上図は、癌治療用ヘルペスウイルス感染後にオートファジーが強く誘導させている減少を示している)



そこで、研究計画(2)の結果、SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3)が胃癌組織において非常に重要な分子であることが判明し、これを応用したヘルペスウイルス療法のプロジェクトを次年度に立ち上げた。



(上図は、第3世代ヘルペスウイルス T-01 が胃癌細胞に感染後、SOCS-3 の発現を減弱させ、ウイルスの複製能を下げる減少を示唆する研究データの一部である)

「平成 24-25 年度」

平成 23 年度の研究成果より、安全性の高い oncolytic HSV として、我が国で第 I 相臨床試験が開始されたばかりである第 3 世代 oncolytic HSV; G47Δ を基本骨格とする新規第 3 世代 oncolytic HSV: T-01 を BAC (bacterial artificial chromosome) 法を用いて、SOCS-3 遺伝子発現ヘルペスウイルス (T-SOCS-3) を作成し、当初の研究計画(3)、(4)に関しては、すべて T-SOCS-3 を用いて行った。

ヒト胃癌細胞株を用いた担癌マウスに対する治療実験では、T-SOCS-3 は良好な抗腫瘍効果を示したが、胃癌新鮮切除標本を用いた前臨床実験では、以下の問題点も明らか

かになった T-SOCS-3 ,第 3 世代ヘルペスウイルス(T-01)はともに胃癌組織に感染し , ウイルス関連蛋白も発現する . また , 胃正常組織への感染は野生型のヘルペスウイルス(Strain F)よりも制御出来た . しかし , 胃癌組織におけるウイルス複製能はかなり抑制されることから , 今後の臨床応用 , 治療法として確立して行くうえで , ヘルペスウイルスの機能増強 , 分子標的化が必要であると考えられる .

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Nakamori M, Yamaue H. [Current state of oncolytic virotherapy in Japan]. Gan To Kagaku Ryoho. 2013, 40(5):553-8. Review. Japanese. 査読なし
2. Hayata K, Iwahashi M, Ojima T, Katsuda M, Iida T, Nakamori M, Ueda K, Nakamura M, Miyazawa M, Tsuji T, Yamaue H. Inhibition of IL-17A in tumor microenvironment augments cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes in tumor-bearing mice. PLoS One. 2013;8(1):e53131. doi:10.1371/journal.pone.0053131. 査読あり
3. Tsuji T, Nakamori M, Iwahashi M, Nakamura M, Ojima T, Iida T, Katsuda M, Hayata K, Ino Y, Todo T, Yamaue H. An armed oncolytic herpes simplex virus expressing thrombospondin-1 has an enhanced in vivo antitumor effect against human gastric cancer. Int J Cancer. 2013 ;132(2):485-94. 査読あり
4. Nakamura M, Iwahashi M, Nakamori M, Naka T, Ojima T, Iida T, Katsuda M, Tsuji T, Hayata K, Mastumura S, Yamaue H. Lower mediastinal lymph node metastasis is an independent survival factor of Siewert type II and III adenocarcinomas in the gastroesophageal junction. Am Surg. 2012, 78(5):567-73. 査読あり
5. Naka T, Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Ojima T, Iida T, Katsuda M, Toshiaki T, Keiji H, Yamaue H. The evaluation of surgical treatment for gastric cancer patients with noncurative resection. Langenbecks Arch Surg. 2012 Feb 1.[Epub ahead of print] PubMed PMID: 22294323. 査読あり
6. Ojima T, Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Takifuji K, Katsuda M, Iida T, Tsuji T, Hayata K, Yamaue H. The impact of abdominal shape index of patients on laparoscopy-assisted distal gastrectomy for early gastric cancer. Langenbecks Arch Surg. 2012 Mar;397(3):437-45. 査読あり
7. Katsuda M, Iwahashi M, Matsuda K, Miyazawa M, Nakamori M, Nakamura M, Ojima T, Iida T, Hayata K, Yamaue H. Comparison of different classes of CpG-ODN in augmenting the generation of human epitope peptide-specific CTLs. Int J Oncol. 2011 Nov;39(5):1295-302. 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

国内学会

1. 中森幹人, 辻 俊明, 岩橋 誠, 山上裕機 Combined therapy with taxane derivatives and armed oncolytic viruses has an enhanced antitumor effect for gastric cancer 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月 横浜
2. 中森幹人, 辻 俊明, 岩橋 誠, 藤堂具紀, 稲生 靖, 山上裕機 スキルス胃癌の分子生物学的特徴を付加したウイルス療法の開発 第50回日本癌治療学会総会, 2012年10月 横浜
3. 中森幹人, 岩橋 誠, 中村公紀, 尾島敏康, 飯田 武, 勝田将裕, 早田啓治, 辻 俊明, 山上裕機 ワークショップ「消化器癌に対する機能付加型ウイルス製剤の基礎的研究開発」第67回日本消化器外科学会総会, 2012年7月 富山
4. 中森幹人, 岩橋 誠, 中村公紀, 尾島敏康, 飯田 武, 勝田将裕, 早田啓治, 辻 俊明, 山上裕機 ワークショップ「胃癌に対するタキサン系薬剤の治療効果予測関連分子を応用した分子生物治療の開発」第66回日本消化器外科学会総会, 2011年7月 名古屋

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.wakayama-med.ac.jp/med/2nd-surgery/>

7. 研究組織

(1)研究代表者

中森 幹人 (NAKAMORI MIKIHITO)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：10322372

(2)研究分担者

山上 裕機 (YAMAUE HIROKI)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：20191190

(3)連携研究者 なし