

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号	24701
研究種目	挑戦的萌芽研究
研究期間	2011～2012
課題番号	23659622
研究課題名（和文）	消化器癌に対するオートファジー細胞死を誘導する分子標的機能搭載ウイルス療法の開発
研究課題名（英文）	Research and development of an armed oncolytic virus via autophagy for gastroenterological cancer
研究代表者	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

研究成果の概要（和文）：

用ウイルスに着目し、その中でも強力な殺細胞効果を有する腫瘍特異的ヘルペスウイルスを探索的研

難治性消化器癌（食道癌、スキルス胃癌、膵癌）の予後は非常に悪いために新しい治療の開発が必要である。本研究では、癌治療の候補とした。そこで、網羅的遺伝子解析と新しい細胞死の概念であるオートファジーに着目し、それらを標的とした癌治療用ウイルスの開発と、その治療効果について基礎的に検討した。オートファジー細胞死は難治性消化器癌におけるウイルスの複製能と殺細胞効果には相乗効果を有さない可能性が示唆されたが、ウイルスの複製能を増強させる分子である SOCS-3 (suppressor of cytokine signaling 3) を発現させることで効果の増強を示すことが出来た。これにより、複製能増強機能を有するウイルス療法が将来有望な治療ツールになることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Refractory gastroenterological cancer such as esophageal cancer, scirrhus gastric cancer, and pancreatic cancer is characterized by rapid cancer cell infiltration. Therefore, refractory gastroenterological cancer carries a worse prognosis than other types of cancers. Viral therapy for refractory gastroenterological cancer is a promising strategy. Viral therapy using herpes simplex virus-1 (HSV-1) is especially practical for clinical application when its safety and therapeutic potency are warranted. In our experiments, we developed new type of armed oncolytic herpes simplex viruses using global genetic analysis. In addition, we confirmed that the ICP34.5 protein of HSV-1 is involved in many aspects of viral pathogenesis; promoting neurovirulence, inhibiting interferon-induced shutoff of protein synthesis, inhibiting dendritic cell maturation, and binding to Beclin 1 to interfere with autophagy. Because of its key role in neuropathogenicity, the γ 34.5 gene is deleted in all oncolytic HSVs currently in clinical trial for treating malignant tumors. Unfortunately, deletion of γ 34.5 attenuates virus replication in cancer cells, especially refractory gastroenterological cancer. To develop new oncolytic HSVs for use in refractory gastroenterological cancer and that replicate in refractory gastroenterological cancer, we have recently explored an armed oncolytic herpes virus expressing SOCS-3 (suppressor of cytokine signaling 3).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学

キーワード：癌ウイルス療法, オートファジー細胞死, ヘルペスウイルス

1. 研究開始当初の背景

ウイルス療法に利用されるウイルスの種類は近年急速に増えている。今のところ臨床試験まで進んでいるのは、ヘルペスウイルス 1 型 (herpes simplex virus type1 : HSV-1), アデノウイルス, レオウイルス, ニューカッスル病ウイルスなどがある。我々は消化器癌に対する臨床応用を視野に入れ, 改良型 HSV-1 の開発をこれまでに展開してきた。本研究開始当初における oncolytic HSV-1 の特徴を以下に概説する。

(1)HSV-1 複製の腫瘍選択性

正常細胞に対する病原性を低く抑えて安全性を担保することは臨床応用に必須である。しかし, ウイルスを弱毒化したからと言っても, 癌治療のために安全なウイルスになるとは必ずしも限らない。しかも, ウイルスはゲノムに変異が生じると必ず弱毒化するという性質を持つ。癌細胞は, 元来ウイルス感染に対する防御機構が障害されているため, いかなる弱毒化ウイルスでも正常細胞と比較すると, 癌細胞では多少とも高いウイルス複製が得られる。そこで, 癌治療用ウイルス開発において重要なことは, 正常細胞に対する病原性を最小限に保ち, 癌細胞に対するウイルス複製能を最大限に生かして治療域を意図的に広くすることである。そのためには, 腫瘍生物学とウイルス学の知識に基づいて癌特異的なウイルス複製能が獲得できるように遺伝子工学を駆使したウイルスゲノムを設計することが極めて肝要である。我々が使用している HSV-1 は以下のようなウイルス遺伝子の改変を利用して開発されたものである。

(2) γ 34.5 遺伝子

γ 34.5 遺伝子は HSV-1 の病原性に関連した遺伝子である。これを欠失させた変異株は正常細胞

でのウイルス複製能が著しく減弱する。正常細胞では, ウイルスが感染すると, 二本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼ (double stranded RNA-activated protein kinase: PKR) がリン酸化され, その翻訳開始因子 eIF-2a をリン酸化し, 結果として, ウイルスのタンパク合成が遮断される。 γ 34.5 遺伝子産物は PKR 機能に拮抗してウイルスのタンパク合成を可能にするが, γ 34.5 遺伝子欠失 HSV-1 は正常細胞では複製を不可能である。しかし, 癌細胞では, PKR 活性が低下しているために γ 34.5 遺伝子欠失 HSV-1 でも複製可能である。この機構により, γ 34.5 遺伝子欠失 HSV-1 が癌細胞を破壊できることになる。

(3)DNA 合成関連酵素

リボヌクレオチド還元酵素 (ribonucleotide reductase: RR) やチミジンキナーゼ (thymidine kinase: TK) は HSV-1 の DNA 合成に必要な酵素である。これらの遺伝子を不活化することで, HSV-1 は正常細胞では複製出来なくなるが, 癌細胞を含む増殖が活性化された細胞においては, 細胞自体の RR や TK 活性が高いことが多く, これらの遺伝子が不活化された HSV-1 はこの遺伝子が代償されることで複製が可能となる。

(4) α 47 遺伝子

α 47 遺伝子のコードするタンパク質は, 宿主細胞の抗原提示関連トランスポーター (TAP) を阻害することで, 細胞表面の MHC class I の発現を抑制する。このことは感染細胞のウイルスタンパク質の提示を抑制し, 宿主のウイルス感染に対する免疫監視機構から逃れる作用を有する。 α 47 遺伝子を欠失させた HSV-1 では, 宿主細胞の MHC class I 発現が保持され, 免疫細胞に対する応答が増強されると推察出来る。また, α 47 遺伝子は US11 遺伝子プロモーター部分と重な

るため、 $\alpha 47$ 遺伝子の欠失により、US11 遺伝子発現時期が早まることになる。これは $\gamma 34.5$ 遺伝子欠失 HSV-1 において、減弱したウイルス複製能を腫瘍細胞に限り復元することになる。

(5) HSV-1 による腫瘍免疫の誘導

HSV-1 によるウイルス療法では、ウイルス複製に伴う癌細胞の破壊 (viral oncolysis) が腫瘍特異的免疫応答を誘導すると報告されてきた。ウイルス感染は感染局所での非特異的免疫反応の活性化のみならず、腫瘍細胞に発現したウイルススタンパクによるアジュバント効果や、ウイルスによる細胞破壊が抗原提示細胞による処理を促進することなどがその機序として考えられる。このことは、腫瘍細胞特異的細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) の誘導、腫瘍抗原分子の同定を必要としない腫瘍ワクチンとしての効果が期待でき、1 つの病巣に対する治療により、遠隔転移に対しての治療効果を期待できる。

(6) これまでに開発された oncolytic HSV-1

oncolytic HSV-1 としての起源は、Martuza RL の報告に始まる。TK 遺伝子が不活化された第一世代 HSV-1 (dlsp^{tk}) を遺伝子工学的に作製し、人為的に癌細胞に局限させたウイルス複製を実証した。しかし、TK 遺伝子を不活化していることで、抗ヘルペスウイルス剤が効かないための安全性に問題を残した。さらに、R3616 や 1717 と呼ばれる $\gamma 34.5$ 遺伝子欠失第 1 世代 HSV-1 も含めて、正常組織における病原性の減弱性が徹底化されていないこと、野生型への復元が問題で、臨床応用に至らなかった。次いで開発された第 2 世代 HSV-1 の G207 は、RR 遺伝子の不活化と $\gamma 34.5$ 遺伝子欠失の二重変異を有し、動物実験における有効性と安全性を徹底的に確認されたことから、再発悪性グリオーマ患者を対象とした第 I 相臨床試験が行われ、G207 の腫瘍内投与が高力価でも安全であることが認められた。しかし、その抗腫瘍効果に対して改良の余地を残した。そこで、 $\alpha 47$ 遺伝子を欠失させた

第 3 世代 HSV-1 の G47 Δ が開発された。現在はこれを用いた脳腫瘍に対する臨床試験が東京大学医科学研究所附属病院で実施されている。

(7) 効果増強を目指したウイルス療法の開発

第 3 世代 HSV-1 の G47 Δ や T-01 は単独でも優れた治療効果が動物実験レベルで報告されているが、次世代のウイルス療法の基礎研究開発も進んできた。HSV-1 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垂系の Fu-10¹ 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み換えした Synco-2D は殺細胞効果が増強したが、実用化には至っていないのが現状である。また、腫瘍あるいは組織特異的プロモーターを用いることにより、ウイルス遺伝子を制御し、癌特異的な殺細胞効果を獲得する試みをされている。さらに、治療用 HSV-1 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が報告されている。

2. 研究の目的

本研究は、難治性消化器癌 (食道癌、スキル死胃癌、膵癌) に対する新しい癌治療用ウイルスの開発を目的とした。例えば、胃癌治療の現状を要約すると、2007 年から 2009 年の間に胃癌外科領域の分野では、我が国で行われた第 III 相臨床試験である (1): 大動脈周囲リンパ節郭清の意義 (JCOG9501 study, JCOG: Japan Clinical Oncology Group), (2): 胃癌術後補助化学療法の有用性 (ACTS-GC), (3): 進行・再発胃癌に対する化学療法の臨床試験 (SPIRITS trial, JCOG9912 study) などの重要な臨床試験の結果が主要英文誌に認められ、標準治療としての evidence の転換、いわゆるパラダイムシフトが起こった。しかし、進行胃癌、特に 4 型スキル

ス胃癌については、evidence を塗り替えるほどの臨床試験の報告はなく、新たな治療法の開発が急務となっている。そこで、我々はスキルス胃癌に対する新規治療開発のひとつとしてウイルス療法に注目している。ウイルスと発癌の関連は古くから研究されているが、ウイルスを癌の治療に応用する研究も 1960 年代からなされている。ウイルスは元来、固有の性質として細胞に感染し、細胞内の分子機構を巧みに使用することで自己を複製し、その過程で感染細胞を死滅させる。ウイルス療法 (oncolytic virotherapy) とは、ウイルスを癌細胞に感染させ、ウイルスの直接的な殺細胞効果により癌の治療を図る治療法である。そこで、我々は、研究の背景でも述べた単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) をスキルス胃癌に応用することを目的とし、と同時に、この癌治療用ヘルペスウイルスが食道癌や膵癌に対しても同様あるいは、それ以上の効果を有することの検証も合わせて目的とした。

3. 研究の方法

スキルス胃癌に対する分子標的機能を有する thombospondin-1 (TSP-1) 発現 oncolytic HSV-1 の開発

(1) 腫瘍微小環境破壊に適した taxane 関連分子 TSP-1 の cloning と機能解析

スキルス胃癌の腫瘍微小環境的性格を網羅的遺伝子解析により、その標的分子を同定した。そこで、標的分子の候補となった TSP-1 が、taxane 系抗癌剤の現時点での胃癌症例への腹腔内投与の有効性の期待ならびに TSP-1 自体、と taxane の作用機序との関連から、oncolytic HSV-1 において TSP-1 を強発現出来るシステムを作成する必要性があり、SV-01 (東京大学医科学研究所藤堂具紀博士より供与) 発現カセットを用いて、TSP-1 遺伝子発現カセットを作製した。**方法:** ヒト全血より total RNA を抽出し、TSP-1 cDNA の cloning のための specific maker:

5'-TAACCTAGGAACCCGGGAAG-3'を用いて total RNA より TSP-1 mRNA を逆転写し、これを増幅した。これを、cloning vector pTA2 に subcloning し、ABI 社 PRISM310 Genetic Analyzer を用いてシーケンスして確認した後に、SV-01 の multi-cloning site に ligation し、TSP-1 蛋白発現の確認を Western blotting, 免疫染色でそれぞれ確認した。さらに、ヒト胃癌細胞株である、MKN-1, MKN-45, TMN-1 を用いて、In vitro でのそれぞれの expression cassette の胃癌細胞に対する特性について検討した。この検討において、治療効果は当然のこと、病理組織学、免疫組織学的に検討した。

(2) Hybrid typed-arming oncolytic HSV-1 の作製とその機能解析

我々はすでに、BAC (bacterial artificial chromosome) system を利用した oncolytic HSV-1 の作製には、その技術を会得していたので、今回の研究方法では、より安全性の高い oncolytic HSV-1 として、G47Δ (*Proc Natl Acad Sci*, 2001) を基本骨格とする第 3 世代 oncolytic HSV-1: T-01 の BAC である T-BAC system (*Cancer Res*, 2005)を用いて機能分子搭載型ウイルス (Hybrid typed-arming oncolytic HSV-1) を作成し、スキルス胃癌に対する新規ウイルスの治療効果について検討した。HSV-1 の genome DNA の ICP6, ICP34.5 の 2 カ所を欠失させたものを用いてきたが、本研究で用いた BAC system はこれらの欠失に加えて、ICP47 遺伝子も欠失させた triple gene deleted oncolytic HSV-1 の性格を有している。

(実験プロトコール概要):

Day 1: スキルス胃癌細胞株、臨床症例 (倫理委員会承認) から樹立したスキルス胃癌細胞 (3×10^6 個) を 7 週齢 athymic female BALB/c nu/nu mice に腹腔内投与した。

Day 7: Hybrid typed-arming oncolytic HSV を 1×10^9 pfu 腹腔内投与する (各治療群は $n=10$ と

する). 治療 7 日目に各群より 3 匹を sacrifice し, 腫瘍結節数, 腫瘍重量の測定, 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, anti-HSV antibody, による免疫組織染色を行った. これに血管新生抑制の効果や oncolytic HSV-1 の投与回数の検討も合わせて行った.

(3)オートファジー細胞死誘導型癌治療用ヘルペスウイルス作製の試みとその改良

オートファジー (Autophagy)は新しい細胞死の概念であり, この細胞死が癌治療用ウイルス開発に応用できないか否かについて検討した.

まず, ヒト胃癌細胞株 12 種類において, オートファジー現象が生じているかについて, 胃癌細胞を無血清培地で飢餓状態にし, オートファジーの指標である LC3 抗体を用いて蛍光染色し, 細胞内における Puncta formation の個数を計算した. さらに, oncolytic HSV-1 感染後における Puncta formation についても同様の検討を行った.

4. 研究成果

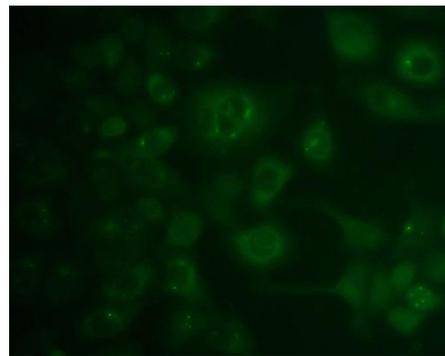
(1)網羅的遺伝子解析から作製する癌治療用ウイルスの開発とその効果

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-1; G47Δ を基本骨格とする新規第 3 世代 oncolytic HSV-1: T-01 を BAC (bacterial artificial chromosome) 法を用いて短期間で開発する技術を確立し, これまでに申請者らが行ってきた遺伝子治療のノウハウを機能分子搭載型ヘルペスウイルスという形で前臨床段階にまで応用可能としたが, スロンボスポンジン-1 遺伝子発現ヘルペスウイルス(T-TSP-1)では, 以下の問題点も明らかになった. スロンボスポンジン-1 遺伝子発現ヘルペスウイルス(T-TSP-1), 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)よりも制御出来る. 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更なる機能増強, 分子標的化が必要であると考えられる.

(2)オートファジー誘導能を有する癌治療用ウイルス開発における問題点とその打開策

我々が仮説していたオートファジーと癌治療用ヘルペスウイルスの関連性について, 1 年余りの基礎的実験の結果, ウイルス感受性の低い胃癌細胞株において, dot plot assay の結果から, オートファジーがヘルペスウイルスの複製能を軽減させていることが示唆された(下図).



そこで, ウイルス複製能の増強をより強化することが, 本研究課題の最優先事項と考察し, SOCS-3 (suppressor of cytokine signaling 3) に着目し, これを発現する oncolytic HSV-1 を, 前述の BAC system を用いて作製し, T-SOCS-3 と命名した.

この T-SOCS-3 はすべての胃癌細胞株に対して非常に良好な殺細胞効果を有することが判明した.

このように, オートファジーがヘルペスウイルス複製において negative regulator としての役割をしていることが示唆されたが, autophagosome 形成による抗腫瘍免疫応答に対しては positive regulator である可能性が高く, 今後の研究に生かせると考察する.

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] (7件中3件記入) 全て査読有り

1. Yamaue H, Tani M, Kawai M, Hirono S, Okada K, Miyazawa M :

Pancreatic dissection in the procedure of pancreaticoduodenectomy (with videos) .
J Hepatobiliary Pancreat Sci 19 : 95-99,2012

2. Hirono S, Tani M, Kawai M, Okada K, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Yamaue H :

The carcinoembryonic antigen level in pancreatic juice and mural nodule size are predictors of malignancy for branch duct type intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas.
Ann Surg 255: 517-522,2012

3. Hirono S, Tani M, Kawai M, Okada K, Miyazawa M, Shimizu A, Uchiyama K, Yamaue H :

Identification of the Lymphatic Drainage Pathways from the Pancreatic Head Guided by Indocyanine Green Fluorescence Imaging during Pancreaticoduodenectomy.
Dig Surg 29:132-139,2012

[学会発表] (18件中3件記入))

1. Yamaue H :

How to accomplish the prospective study in HBP surgery and write the scientific paper?
4th Biennial Congress of the Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association A-PHPBA 2013
2013年03月27日～2013年03月30日
Shanghai, China

2. Yamaue H :

New surgical strategy for patients with pancreatic body /tail carcinoma -the impact of distal pancreatectomy with en_bloc celiac axis resection-.
Americas Hepato-Pancreato-Biliary Association AHPBA Annual Meeting 2013
2013年02月20日～2013年02月24日
Miami, U.S.A

3. Yamaue H :

New surgical strategy for patients with pancreatic body /tail carcinoma -the impact of distal pancreatectomy with en_bloc celiac axis resection-.
Americas Hepato-Pancreato-Biliary Association AHPBA Annual Meeting 2013

2013年02月20日～2013年02月24日
Miami, U.S.A

[図書] (計3件)

1. 宮澤基樹 :

第4のがん治療法への期待第1集 市民のためのがんペプチドワクチンの会編
136-149,2012 旬報社

2. 谷眞至:

癌の臨床 329-332,2012 篠原出版新社

3. 山上裕機 :

膵・胆道癌 FRONTIER4 59-60,2012
メディカルレビュー社

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

岩橋 誠 (IWAHASHI MAKOTO)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号 : 70244738

谷 眞至 (TANI MASAJI)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 60236677

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

川井 学 (KAWAI MANABU)

和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 40398459

廣野誠子 (HIRONO SEIKA)

和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 60468288

(3)連携研究者 なし

