

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461992

研究課題名 (和文) 胃癌治療用個別化対応ウイルスの改良と効果予測モデルの確立

研究課題名 (英文) Establishment of therapeutic models using oncolytic viruses 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・准教授

研究者番号：10322372

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,600,000 円

研究成果の概要 (和文) : 癌治療用ウイルスは次世代の癌治療のひとつとして期待されている。本研究において、SOCS-3発現癌治療用ヘルペスウイルス (T-SOCS-3) と、第4世代型のヒトテロメラーゼプロモーターの下流にリボヌクレオチドレダクターゼを発現するT-hTERTを開発し、ヒト胃癌細胞での治療効果を検討した。

T-hTERTはすべてのヒト胃癌細胞株に対して、コントロールウイルスのT-01やT-SOCS-3に比べて、高い抗腫瘍活性を示した。今後は、胃癌切除標本を用いた治療効果予測モデルの確立に向けて最終段階である。

研究成果の概要 (英文) : One of the promising therapeutic strategies for malignancies is an oncolytic virotherapy. We have conducted a study of oncolytic herpes simplex viruses (oHSVs) against gastric cancer. In this project, we examined the antitumor effect of fourth-generation oHSVs, which contains ICP6 gene driven human TERT (telomerase reverse transcriptase) promoter (T-hTERT) and T-SOCS-3 expressing suppressor of cytokine signaling-3. For human gastric cancer cell line, we examined the expression of ribonucleotide reductase (RR) activity and their telomerase activity in gastric cancer cell line, and also evaluated the cytotoxicity of T-hTERT and T-SOCS-3. T-hTERT was more effective than T-01 and T-SOCS-3 for all gastric cancer cell lines including MKN1. In addition, we are going to establish the predictive models for therapeutic efficacy using freshly surgical specimens of gastric cancer patients.

研究分野：消化器外科学

キーワード：癌治療用ウイルス ヘルペスウイルス 胃癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国の胃悪性腫瘍に対する治療成績は一定の向上を示してきた。特に、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、標準治療としてのエビデンスの転換、いわゆるパラダイムシフトが起こった。さらに、我が国も参加した多国籍臨床試験の ToGA 試験では、HER2/neu (c-erbB-2)陽性の進行胃癌に対してファースト・ライン治療に HER2 特異的抗体である trastuzumab (Herceptin®) の上乘せ効果が報告され (Lancet, 2010)、胃癌領域においても大腸癌同様、分子標的治療剤が展開されていくものと期待されたが、それ以降の有望な分子標的治療薬の報告はない。

そこで、分子標的治療剤だけに注目して良いのか?という疑問に対して、申請者らは現在までに、臨床面では、胃癌に対する補助化学療法の感受性試験の有用性(Iwahashi M et al. Anticancer Res, 2005, Noguchi K et al. Anticancer Res, 2005) の検証に加え、新しい治療法の開発として、科学研究費補助金の助成により、生体の免疫応答を惹起させる免疫遺伝子治療 (Nakamori M et al. Clin Cancer Res, 2003)や、薬剤感受性遺伝子を用いた自殺遺伝子治療の開発(Ueda K et al. Cancer Res, 2001, Nakamori M et al. Jpn J Cancer Res, 2002)を行ってきた。また、腫瘍抗原提示能に優れている樹状細胞(DC: dendritic cell)を用いた免疫(遺伝子)治療の研究開発 (Nakamura M et al. Clin Cancer

Res, 2002, Nakamura M et al. Oncology, 2005, Ojima T et al. Int J Oncol, 2006, Ojima T et al. Int J Cancer, 2007, Naka T et al. Cancer Sci, 2008) にも着手し、膵臓癌や食道癌に対するペプチドワクチン療法の第 I 相臨床試験を実現可能にした (Miyazawa M et al. Cancer Sci, 2009, Iwahashi M et al. Cancer Sci, 2010, Miyazawa M et al. Cancer Lett., 2011, Katsuda M et al. Int J Oncol., 2012)。

これらの研究とほぼ平行する形で、腫瘍特異的に溶解を誘導するウイルス療法に注目し、中でも治療効果と安全性の高いヘルペスウイルスを用いて、申請者自身もその開発に参画した(Nakamori M et al, Clin Cancer Res, 2003, Molecular Ther, 2004)。

さらに、申請者は、基盤研究 C-17591433、C-20591574、C-23591946 の助成により、抗腫瘍効果と安全性が担保された腫瘍溶解性ヘルペスウイルス(oncolytic HSV)を応用した癌治療用ウイルスの開発を行い、胃癌の腫瘍微小環境において優れた治療効果を有する thrombospondin-1 発現癌治療用ウイルス (T-TSP-1)の開発に成功した(Tsuji T et al. Int J Cancer, 2013)。この癌治療用ウイルス研究の基本骨格である T-01 は現在、我が国において新しい治療シーズとして臨床試験が行われているウイルス製剤である。

しかし、このウイルスは 3 領域の遺伝子を不活化・欠失させた変異型の遺伝子組換えヘルペスウイルス 1 型であり、安全性確保のため腫瘍細胞のみで制限増殖し、正常細胞では増殖しないため、既存の抗癌剤などと異なり腫瘍選択的に治療が行える利点があるものの、一部の胃癌細胞株に対して十分な抗腫瘍効果が得られないことが判明した。

本研究計画は多様性を有する胃癌細胞に

対応可能な癌治療用ヘルペスウイルスを研究開発し、このウイルスが胃癌細胞株のみならず、胃癌切除標本を用いた治療効果予測系モデルにより臨床応用に展開するための基盤研究計画とした。

(2) ヘルペスウイルスの細胞内複製に重要なシグナル SOCS-3 (suppressor of cytokine signaling-3)は、ほぼすべての胃癌細胞株で発現していた。また、SOCS-3 の発現強度と前述の癌治療用ヘルペスウイルス T-01 の抗腫瘍効果には関連は認めなかった。しかし、ヒト胃癌細胞株に対する T-01 の感染前後における SOCS-3 の発現強度を測定したところ、T-01 による治療効果が弱い胃癌細胞株 MKN45 における SOCS-3 の発現が抑制されていることを明らかにした。

癌幹細胞(cancer stem cell: CSC)のマーカースとして知られる ABCG2 (ATP-binding cassette, subfamily G, member 2)を発現するヒト胃癌細胞株は色素 Hoechst 33342 を強発現することからフローサイトメトリー上で SP (side population)細胞として区別可能であり、例えば、あるスキルス胃癌細胞株で 1-4%程度存在し、その腫瘍形成能が高く、先に述べた T-01 の殺細胞効果がやや弱いことを確認した。

T-01 のウイルス複製能増強に必要な ribonucleotide reductase (RR)は、種々の胃癌細胞株において、その発現程度が非常に異なることを明らかにした。

胃癌細胞株における細胞老化の指標である テロメラーゼ活性、hTERT (human telomerase reverse transcriptase)活性がそれぞれ異なることを確認した。

T-01 の感染により自食 (オートファジー; autophagy)作用が起こり、胃癌細胞が自身の身を守る傾向があることを明らかにした。

2. 研究の目的

研究期間内に以下に示したことを明らかにすることを目的とした。

SOCS-3 を強制発現する癌治療用ヘルペスウイルスを作成し、現状のウイルス製剤よりも複製能が増強すること示し、胃癌細胞にも抗腫瘍効果が増強することを明らかにする。

胃癌幹細胞における RR やテロメラーゼ活性、hTERT 活性を明らかにし、胃癌のテロメア維持を阻害可能な癌治療用ヘルペスウイルスを新規開発して、癌幹細胞にも適応可能なウイルス療法を目指す。未だ詳細に明らかにされていない癌治療様ヘルペスウイルスとオートファジー現象の関係を明らかにし、オートファジー制御型癌治療用ヘルペスウイルスの開発を目指す。

胃癌新鮮切除標本を用いて、胃癌治療用ヘルペスウイルスの治療効果予測モデルの基礎的検証を行う。

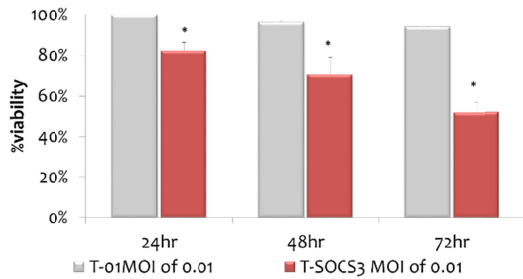
胃癌の分子生物学的プロファイルに対応した、多種の癌治療用ヘルペスウイルスをカクテル療法として応用可能か否かについても基礎的臨床的に検証する

3. 研究の方法

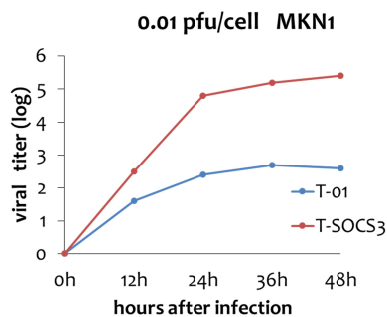
- SOCS-3 発現癌治療用ヘルペスウイルス (T-SOCS-3) の作成と、その複製能と抗腫瘍効果、メカニズムの解明
- hTERT プロモーター下に RR を発現する癌治療用ヘルペスウイルス (T-hTERT) の作成
- T-hTERT の胃癌細胞ならびに胃癌幹細胞に対する治療効果の検証
- T-SOCS-3, T-hTERT のオートファジー制御の検証と、その意義の解明
- 癌治療用ヘルペスウイルスの胃癌新鮮切除標本を用いた効果予測モデル確立のための基礎的検討

4. 研究成果

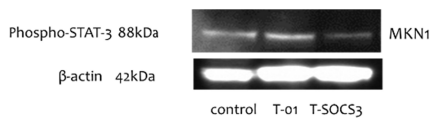
- SOCS-3 発現癌治療用ヘルペスウイルス (T-SOCS-3) の作成と、その複製能と抗腫瘍効果、メカニズムの解明



SOCS-3 を発現する癌治療用ウイルスはヒト胃癌細胞株 MKN-1 に対して、非常に強力な殺細胞効果を有することが判明した。(上図)



その理由として、MKN-1 に感染後のウイルスの複製能が向上していることを確認出来た(上グラフ)。

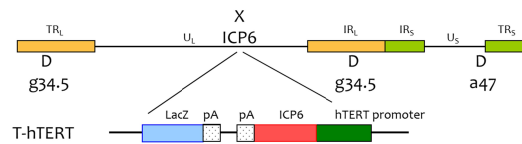


この作用機序を分子生物学的に検討した結果、SOCS のシグナル伝達系と関連していることの裏付けが検証出来た。(上図)

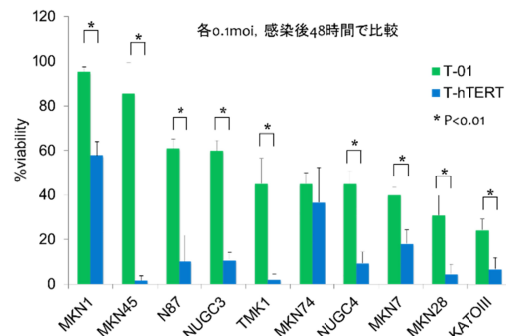
- hTERT プロモーター下に RR を発現する癌治療用ヘルペスウイルス (T-hTERT) の作成

T-BAC system と呼称する方法を用いて、hTERT プロモーターの下流に RR を発現する第 4 世代癌治療用ヘルペスウイルスうい

作成出来た。(下図)



- T-hTERT の胃癌細胞ならびに胃癌幹細胞に対する治療効果の検証

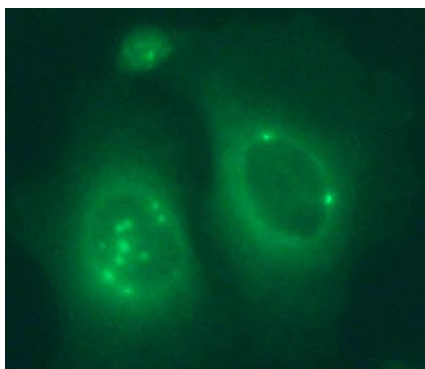


T-hTERT は上段のグラフに示すように、すべてのヒト胃癌細胞株に対して、コントロールの癌治療ウイルス T-01 よりも優れた殺細胞効果を示し、一部の胃癌幹細胞に対しても抗腫瘍効果を示した(データ未公開)。

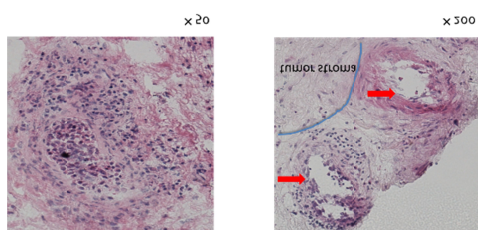
- T-SOCS-3, T-hTERT のオートファジー制御の検証と、その意義の解明

諸家の報告では、癌治療用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。今回の我々の研究では、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、癌治療用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。癌治療用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。(次写真は、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

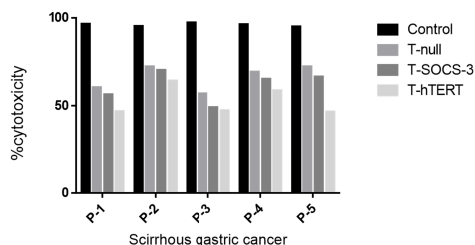
る。



- 癌治療用ヘルペスウイルスの胃癌新鮮切除標本を用いた効果予測モデル確立
胃癌手術新鮮切除標本を用いて、癌治療用ウイルスの直接注入による効果を検証したところ、下右図に示したように、ウイルスによる腫瘍の溶解効果を確認出来た。



このことを確認後、作成した T-SOCS-3, T-hTERT の胃癌組織に対する抗腫瘍効果を検討すると、難治性胃癌のひとつであるスキルス胃癌に対しては抗腫瘍効果に違いがあることが判明（下グラフ図）し、これらの効果予測に関する数学的解析とモデル作成を現在行っているところである。



スキルス胃癌切除標本に対する治療効果予測モデル
(ウイルス注入後48時間でのMTS assayで評価)

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5件)

1. Ojima T, Nakamori M, Nakamura M, Katsuda M, Hayata K, Yamaue H. Laparoscopic gastrojejunostomy for patients with unresectable gastric cancer with gastric outlet obstruction. J Gastrointest Surg. 2017 Feb 21. PMID: 28224464. 査読あり
2. Nakamura M, Nakamori M, Ojima T, Iwahashi M, Horiuchi T, Kobayashi Y, Yamade N, Shimada K, Oka M, Yamaue H. Randomized clinical trial comparing long-term quality of life for Billroth I versus Roux-en-Y reconstruction after distal gastrectomy for gastric cancer. Br J Surg. 2016; 103(4): 337-47. 査読あり
3. Nakamura M, Nakamori M, Ojima T, Katsuda M, Iida T, Hayata K, Matsumura S, Kato T, Kitadani J, Iwahashi M, Yamaue H. Reconstruction after proximal gastrectomy for early gastric cancer in the upper third of the stomach: an analysis of our 13-year experience. Surgery. 2014; 156(1): 57-63. 査読あり
4. Ojima T, Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Katsuda M, Iida T, Hayata K, Takifuji K, Yamaguchi S, Yamaue H. Is preoperative colonoscopy necessary for patients undergoing gastric cancer surgery? Ann Surg Oncol. 2014; 21 Suppl 3:S379-84. doi: PMID: 24562939. 査読あり

5. Iida T, Iwahashi M, Katsuda M, Ishida K, Nakamori M, Nakamura M, Naka T, Ojima T, Ueda K, Hayata K, Yasuoka H, Yamaue H. Prognostic significance of IL-17 mRNA expression in peritoneal lavage in gastric cancer patients who underwent curative resection. *Oncol Rep*. 2014; 31(2):605-12. 査読あり

(3)連携研究者 なし

〔学会発表〕(計2件)

国内学会

1. 中森幹人、加藤智也、松村修一、福原浩、稲生靖、藤堂具紀、山上裕機
「Antitumor efficacy of hTERT promoter regulated oncolytic herpes simplex viruses for human gastric cancer」第22回日本遺伝子細胞治療学会学術集会，2016年7月 東京
2. 中森幹人、加藤智也、松村修一、福原浩、稲生靖、藤堂具紀、山上裕機 「胃癌新鮮切除標本における癌治療用ウイルスの効果予測」第74回日本癌学会学術総会，2015年10月 名古屋市

〔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