

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06279

研究課題名(和文) HF10 アンプリコンベクター使用した樹状細胞による抗腫瘍免疫療法の研究

研究課題名(英文) A study of anti-tumor effect of the dendritic cells infected with HF10-packaged amplicon carrying tumor associated antigen

研究代表者

駱 晨虹 (Luo, Chenhong)

名古屋大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：40759627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：この研究が示した結果は以下の通りである。HF10-packageアンプリコンで樹状細胞に送入了GPC3が特異的な細胞性免疫を誘導し、該当腫瘍抗原が発現する腫瘍の増殖を抑制した。さらにリンパ節の転移への抑制効果があった。前投与で腹膜播種モデルでの評価は、腹内の投与が静脈投与と皮下より抗腫瘍効果がよかった。Lamp シグナルペプチドとGPC3とのキメラは樹状細胞で、抗原提示能力を高めることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, our results indicated that 1. HF10-package amplicon, which expresses tumor associated antigen glypican3 (GPC3), induced the antigen specific immune response through infected dendritic cells and inhibited the tumor growth in mouse ovarian cancer model. 2. In mouse peritoneal tumor seeding model, through prophylactic vaccination, we found that the dosing i.p. had the best antitumor effect among i.p., i.v., and s.c. dosing routes. 3. The chimera of Lamp-1 signal peptide and GPC3 induced GPC3 specific immune response through dendritic cell presentation more strongly than GCP3.

研究分野：ウイルス

キーワード：Glypican 3 dendritic cells Lamp-1 signal peptide

1. 研究開始当初の背景

腫瘍融解ウイルス療法とがん治療ワクチン療法はともに有望な治療法である。自然分離弱毒化単純ヘルペスウイルス HF10 は、腫瘍融解性ウイルスとして、同様に抗腫瘍免疫を誘導している事が示唆されて来ている。我々は臨床試験の進んでいる HF10 の特異的な抗腫瘍免疫を高めるため、HF10 をヘルパーウイルスとする amplicon を用いて、卵巣がん関連抗原 glypican3 遺伝子と LAMP-1 遺伝子とのキメラ cDNA(MutGPC3)を樹状細胞に導入して、その樹状細胞ワクチンの抗腫瘍効果を glypican3 が発現するマウス卵巣がんモデルで検討することを考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子工学により樹状細胞での腫瘍関連抗原提示を高め、さらに HSV oncolytic virus, (HF10), と抗腫瘍樹状細胞(DC)ワクチンとの併用による新たながん治療法の開発研究である。

3. 研究の方法

(1)LAMP-1シグナルペプチドとGPC3とのキメラとGPC3発現するアンプリコンの構築
逆転写PCRにより、マウスマクロファージ由来のcDNAからLAMP-1シグナルを増幅し、シグナルペプチドを無くしたC-末端にFLAG付のGPC3とキメラGPC3(MtGPC3)を構築した。蛍光染色によりvero細胞で確認した。同時、GPC3が発現するアンプリコンベクターを構築した。また、vero細胞にこのアンプリコンベクター1 μ g/35mm dishをLipofectamine 2000でtransfectionしてから24時間後、0.1MOIHF10でGPC3が発現するアンプリコンを作成した。

(2)骨髄由来樹状細胞の採集及び培養

マウスB6C3F1から大腿骨を採取し、骨髄を取り出し、1500rpmで5分間遠心する(2回ほどRPMIで細胞を洗浄する)。溶血バッファで赤血球を除去し、24-well plateで

1x10⁵cells/wellでRPMI-5(RPMI-1640, 5%FCS, 19mM HEPES, 20 μ g/ml gentamicin, 5uM 2-ME)+GM-CSF(20ng/ml)で、骨髄細胞を培養し、2日置き、培地を入れ替え、一週間で培養する。

(3)electroporation (NEPA21)でDNA導入
骨髄由来樹状細胞(DC)を回収し、Opti-MEMで3回wash, 1x10⁶DC cells/90ul+プラスミドDNA 20 μ g/10ulをNEPA21のキュベットに入れ、電圧175V、パルス幅5ms、パルス間隔50ms、回数2、減衰率10%、で、transfectionを行った。

(4)DNAを導入したDCの培養

発現ベクターを導入した後、RPMI-5+20ng/ml GM-CSF+LPS 1 μ g/mlで24hr培養してから、マウスに投与する。

(5)脾臓細胞の採集

マウスから脾臓を摘出後シリンジの柄で脾臓をつぶし、ナイロン性のメッシュを通した後0.16Mの塩化アンモニウムで赤血球の除去を行うというプロトコールで脾臓細胞を採取する。

(6)マウス卵巣がんモデル

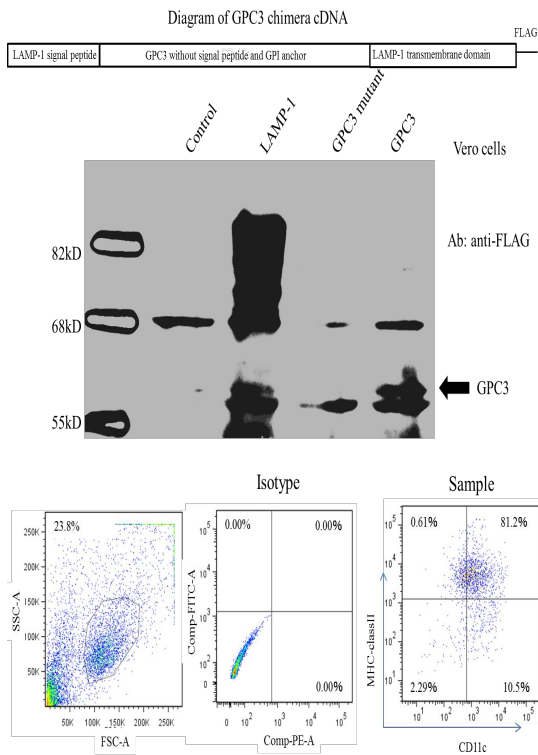
マウスGPC3遺伝子をマウス卵巣がん細胞株OV2944-HM-1(HM-1)に導入し、安定化マウスGPC3過剰発現細胞株を樹立した、本細胞株を1x10⁶cells/100ulを皮下に、1x10⁶cells/1mlを腹内に投与して、皮下モデルの場合、0.5mmx0.5mmになった後、治療が始まる。腹膜播種モデルの場合、三日後、治療を開始する。該当実験で、6~7週令B6C3F1マウスが使われている。

(7)フローサイトメトリーサンプルの染色

細胞を5%BSAで3回wash, 5x10⁶cells/100ul 5%BSA PBS+抗体(蛍光conjugated)避光、氷上で30分インキュベーション後、5%BSABPSで3回wash, 細胞を500 μ l 5%BSA PBSに浮遊させ、測定に持っていく。

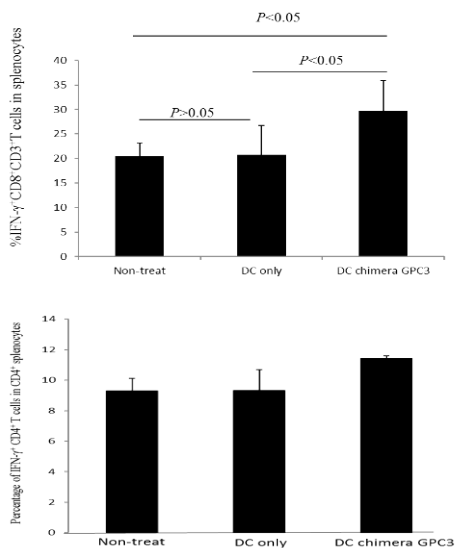
4. 研究成果

(1)キメラ GPC3 (MtGPC3)発現と骨髄由来の樹状細胞の確認



Vero 細胞に 1 μ g 発現ベクターを transfection してから、48 時間後、細胞を回収し、抗 FLAG 抗体により western blotting でタンパク質の発現を確認した。五日で培養した骨髄由来細胞を CD11c と HMC-11 抗体で二重染色した後、フローサイトメトリーで解析した。81%の細胞が樹状細胞に分化した。

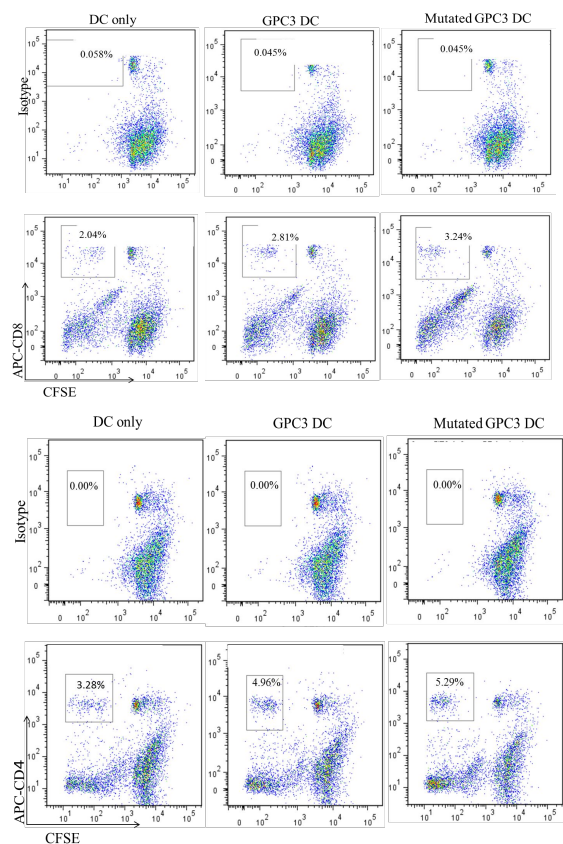
(2)MtGPC3-expressed DC による GPC3 特異的な細胞性免疫の確認



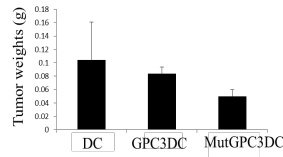
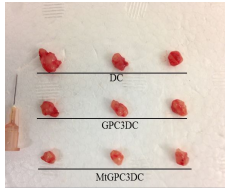
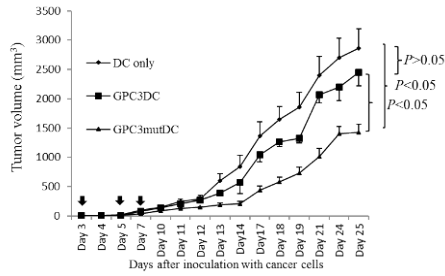
6週令 B6C3F1 マウスに 1×10^6 空ベクター又は MtGPC3 が発現するベクターを導入した樹状細胞をマウス腹内に一週間置き二回注射して、二回目注射の一週間後、脾臓細胞を採集し、GPC3 が発現する HM-1 細胞で一晩で刺激してから、細胞を回収し、IFN-gamma と CD8 抗体で二重染色を行って、フローサイトメトリーで解析した。その結果は、MtDC で免疫したマウスの脾臓細胞に IFN-gamma を分泌する CD8+細胞が有意に non-treatment と mock グループより高かった。同じ、IFN-gamma を分泌する CD4+細胞も有意に高かった。

(3) Memory CD4+と CD8+T 細胞の分化

DC 細胞で免疫したマウスから脾臓細胞を採集し、CFSE で染色後、GPC3 が発現する HM-1 細胞により 24hr で刺激してから、CD4 又は CD8 抗体で染色して、フローサイトメトリーで解析した。この結果は、抗原刺激後、MtGPC3DC が免疫したマウス脾臓細胞に CD4+と CD8+T 細胞の分化はほかの両グループより、高かった。

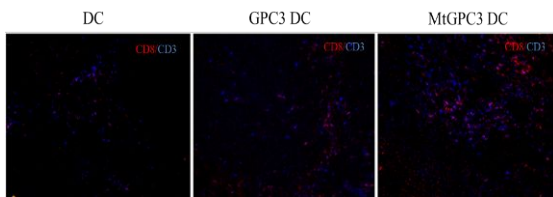


(4) MtGPC3 が発現する樹状細胞の抗腫瘍効果



6週令のB6C3F1マウス(N=7/group)にGPC3が発現するHM-1細胞 5×10^6 cells/100ul/匹をs.c.植えて、0.5mmx0.5mmになってから、 1×10^6 樹状細胞を一日置き三回腫瘍及び近傍に注射した。その後、腫瘍サイズを測定した。MtGPC3が発現するDCで治療した腫瘍がDC又はGPC3が発現するDCで治療した腫瘍より、腫瘍サイズが小さかった。腫瘍の増殖が抑えられた。腫瘍重さ(N=3)も測った。MtGPC3DCの治療で腫瘍重さが有意に軽かった。

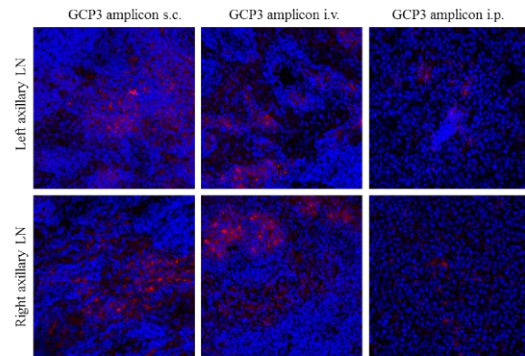
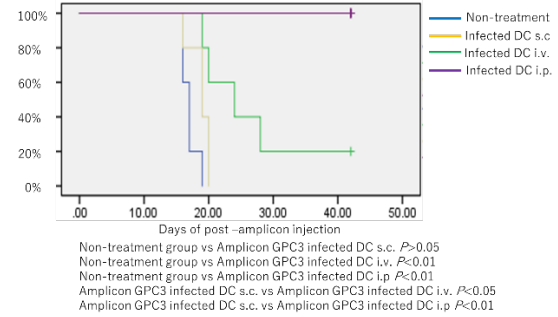
(5) 樹状細胞で治療後一週間、腫瘍内のCD8⁺T細胞の浸潤



腫瘍に樹状細胞を三回目注射してから、一週間後、腫瘍組織を採集し、凍結切片を作成し、CD3とCD8抗体で免疫染色を行った。MtGPC3DCでの治療群の腫瘍浸潤CD8⁺T細胞が他の二グループより、多かった。GPC3DCでの治療群の腫瘍浸潤CD8⁺T細胞がmockグループより多かった。

(6) HF10-packadge GPC3 アンプリコンを用い

て、投与経路の調べ



GPC3が発現するHM-1細胞 2×10^6 cells/ml/匹を6週令のB6C3F1マウス腹内に移植し、三日後、アンプリコン(HF10 8.4×10^6 pfu/GPC3amplicon 4.5×10^3)8時間で感染した 2×10^6 DC細胞を二回wash後、一日一回連続三回、i.p., s.c.,とi.v注射してから、生死を観察した。腹内投与群の生存率が100%で、静脈投与群の生存率が40日後20%で、対照群と皮下投与群の生存率は20日後、0%です。アンプリコンで感染した樹状細胞治療は対照群と比較、有意に腫瘍増殖を抑えた。HM-1腫瘍細胞がリンパ節転移の特性を持つので、我々は、腋リンパ節のGPC3免疫染色により、異なる投与方法で、がん転移の状況を観察した。腹内アンプリコン投与方法は皮下、静脈の投与方法より、腋リンパ節のGPC3が発現する細胞が少なかった。

考察：

抗原を輸送する小胞体をターゲットするLAMP-1のシグナルペプチドが樹状細胞内で、融合した腫瘍関連抗原GPC3をその小胞体をターゲットし、輸送したことを示唆した。そのことにより、高めた抗腫瘍免疫が腫瘍内のCD8⁺T細胞の浸潤を増加し、腫瘍増殖を有意

に抑制した。また、我々は、さらなる良い樹状細胞のがん治療の方法を検討するために、腫瘍溶解性ウイルス HF10-package GPC3 アンブリコンを用いて、樹状細胞の投与経路を検討した。腹膜播種マウスモデルの場合、皮下、静脈の投与より、腹内のほうの効果が良く、さらに腫瘍のリンパ節の転移を抑えることも示唆された。しかし、腹内投与法で腫瘍溶解性ウイルスの腫瘍溶解効果があるので、三経路の直接比較ができない。我々の最終目的は、腫瘍溶解性ウイルスとアンブリコンが感染した樹状細胞の腫瘍特異的な細胞性免疫の相乗効果の検討であったため、この腹膜播種マウスモデルの実験で、この相乗効果があることは示唆された。

今後、細胞毒性がない LAMP-1 シグナルペプチドと腫瘍関連抗原のキメラが発現するアンブリコンに腫瘍溶解性ウイルス HF10 を加えて、感染した樹状細胞を用いて、そのウイルスの腫瘍溶解とキメラプロテインが発現する樹状細胞による抗腫瘍免疫の抗腫瘍相乗効果を検討したい。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

Yoshinori Naoe, Toru Ichinose, Chenhong Luo, Wu Zhiwen, Nobuaki Mukoyama, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Maki Tanaka, Hideki Kasuya, Most recent clinical trial data using HF10 for 9 patients with non resectable pancreatic cancer, The 10th International Meeting on Replicating Oncolytic Virus Therapeutics, 2016/10/1~4、バンクーバー (カナダ)

Nobuaki Mukoyama, Toru Ichinose, Chenhong Luo, Yusuke Koide, Wu Zhiwen, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Maki Tanaka, Yasushi Fujimoto, Michihiko Sone, Yasuhiro Kodera, Hideki Kasuya, Combination therapy of squamous cell carcinoma mouse models with PD-L1 immune checkpoint inhibitor and oncolytic herpes simplex virus HF10, 第 22 回日本遺伝子細

胞治療学会学術集会、2016/7/28~30、虎ノ門ヒルズフォーラム (東京都港区)

Zhiwen Wu, Toru Ichinose, Chenhong Luo, Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Nobuaki Mukoyama, Yoko Nishikawa, Usuke Koide, Toshie Kuwahara, Yasuhiro Kodera, Maki Tanaka, Hideki Kasuya, ENHANCED ANTI-TUMORAL ACTIVITY OF ONCOLYTIC HERPES SIMPLEX VIRUS HF10 WITH CETUXIMAB AGAINST HUMAN COLORECTAL CANCER, 第 22 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2016/7/28~30、虎ノ門ヒルズフォーラム (東京都港区)

Toru Ichinose, Chenhong Luo, Yusuke Koide, Wu Zhiwen, Nobuaki Mukoyama, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Maki Tanaka, Yasuhiro Kodera, Hideki Kasuya, Systemic delivery strategy of oncolytic herpes simplex virus HF10 adsorbed on antigen-specific lymphocytes, 第 22 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2016/7/28~30、虎ノ門ヒルズフォーラム (東京都港区)

粕谷英樹、山村和生、藤井努、堀田佳宏、西山幸廣、小出悠介、田中舞紀、駱晨虹、一ノ瀬亨、宮嶋則行、向山宣昭、中尾昭公、小寺泰弘、腫瘍溶解性ヘルペスウイルス HF10 を使用した新規がん治療法の研究、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016/4/14 ~16、大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪 (大阪府大阪市)

Toru Ichinose, Akiyuki Kanzaki, Luo Chenhong, Yoshihiro Hotta, Koide Yusuke, Wu Zhiwen, Saori Fukuda, Toshie Kuwahara, Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Maki Tanaka, Yasuhiro Kodera, Hideki Kasuya, Systemic virotherapy using oncolytic herpes simplex virus adsorbed onto antigenspecific lymphocytes, 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015/11/22~24、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

Zhiwen Wu, Toru Ichinose, Chenhong Luo, Gewen Tan, Tevfik T. Sahin, Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Yoko Nishikawa, Usuke Koide, Saori Fukuda, Yasuhiro Kodera, Hideki Kasuya, Combination therapy against human pancreatic cancer with oncolytic herpes virus hrR3 and monoclonal antibody bevacizumab, 第 74 回日本癌学会学術総会、2015/10/8~10、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

Hideki Kasuya, Yoshihiro Hota,
Chenhong Luo, Toru Ichinose, Zhiwen Wu,
Noriyuki Miyazima, Nobuaki Mukoyama,
Yusuke Koide, Maki Tanaka, Yasuhiro Koderu,
Anti-tumor immunity with locally
administered HF10 effects to the liver and
peritoneal metastasis in mouse models、
第74回日本癌学会学術総会、2015/10/8～10、
名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

〔図書〕(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

名古屋大学大学院医学系研究科

癌免疫治療研究室 研究業績

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/intlexch/cancerimmuno/www/achievements/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

駱 晨虹 (LUO Chenhong)

名古屋大学・大学院医学系研究科・招へい
教員

研究者番号： 40759627