

令和元年6月11日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15711

研究課題名(和文) 卵巣がんにおける免疫逃避機構改善を目指した新規ウイルス療法の開発

研究課題名(英文) Development of new viral therapy for improvement of immune escape mechanism in ovarian cancer

研究代表者

利部 正裕 (Kagabu, Masahiro)

岩手医科大学・医学部・特任講師

研究者番号：30382609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、卵巣がんにおけるMHC class I発現低下による免疫逃避機構に着目し、腫瘍溶解性ヘルペスウイルス(oncolytic HSV)を用いて免疫逃避改善を目指した新規卵巣がん治療法開発である。抗がん剤や免疫チェックポイント阻害薬を併用する治療法をマウスモデルで検討した結果、腫瘍縮小効果はもちろんであるが腫瘍浸潤リンパ球を増加することが認められ、免疫逃避が改善される可能性が示された。しかし、抗腫瘍免疫と一緒にウイルスに対する免疫作用が亢進し、ウイルスの作用を減弱している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究成果は、卵巣がんをはじめとする婦人科悪性腫瘍に対する新規治療法の可能性が示されただけでなく、腫瘍溶解性ヘルペスウイルスが免疫チェックポイント阻害薬の効果を増強する方法の一つであることが示された。現在社会的に注目されている免疫チェックポイント阻害薬の新たな治療法のオプションとなりえるこの基礎実験成果は大きいものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a novel ovarian cancer treatment that aims to improve immune escape using oncolytic herpesvirus (oncolytic HSV), focusing on immune escape mechanism by lowering MHC class I expression in ovarian cancer. As a result of study the treatment using a cytotoxic agent and an immune checkpoint inhibitor in combination in a mouse model, not only the tumor reduction effect but also the increase of tumor infiltrating lymphocytes are recognized, and the immune escape may be improved. However, oncolytic HSV therapy has not only been enhanced anti-tumor immunity, but also the immune action against the virus. As a result, it has been shown that the action of the virus may be attenuated.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：腫瘍免疫 卵巣癌 子宮頸癌 腫瘍溶解性ヘルペスウイルス 免疫チェックポイント阻害薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

現在、がんの治療法と言えば、手術・放射線療法・化学療法の3つである。しかし、その効果は必ずしも十分ではない。婦人科領域においても、化学療法が奏効するとはいえ卵巣がんもその例外ではなく、新規治療法の開発が急務である。

そのような中、免疫療法が以前から新規治療法として試みられてきたが、その効果は十分ではなかった。しかしながら、T細胞共刺激分子を調節するチェックポイント阻害剤が最近開発され、その効果が実証されたことにより、あらためて免疫療法が注目を浴びている。濱西らはT細胞共刺激分子であるPD-1 (Programmed cell death 1) に注目し、卵巣がんに対する抗PD-1抗体 (Nivorumab) の有効性を報告 (JCO. 2015) した。PD-1受容体は細胞傷害性T細胞の表面に存在し、腫瘍細胞表面のPD-L1と結合することにより、細胞傷害性T細胞の機能を抑制すると言われている。抗PD-1抗体は、これらの機能を阻害し、細胞傷害性T細胞の抑制を解除して活性化し抗腫瘍効果を発揮する薬剤である。しかし、その効果は十分ではない。なぜなら、PD-1抗体自体は細胞傷害性T細胞を腫瘍浸潤させることができなく、細胞傷害性T細胞が腫瘍内に存在しないと効果を発揮できない。また卵巣がん組織での遺伝子網羅的解析で、予後不良群では細胞傷害性T細胞のターゲットとなるMHC class Ⅱ発現コントロール遺伝子の低下が報告 (Clin Cancer Res. 2012) されたことにより、細胞傷害性T細胞による抗腫瘍免疫反応から逃避していることが予後不良の一因であることが考えられる。

そこで申請者は、抗腫瘍免疫を活性化および腫瘍細胞のMHC class Ⅱ発現を増強する方法として oncolytic HSV を使用したウイルス療法に注目した。oncolytic HSV 療法とは、分子生物学的手法を用いて弱毒化した単純ヘルペスウイルスが、選択的に腫瘍内だけで増殖し細胞を死に至らしめ、さらに抗腫瘍免疫を活性化することを利用した治療法であり (Martuza RL et al. 1991, Science) 以前より婦人科悪性腫瘍への使用へ向けて我々の施設で検討を行っている。今回我々の使用する oncolytic HSV は、従来型 oncolytic HSV と比較し 47 遺伝子の変異を加え、これにより従来のもものより安全性を保ちつつウイルスの腫瘍内複製能を増強させる効果があり、さらに感染細胞表面のMHC class Ⅱの発現抑制が解除され抗原提示能を可能にしたウイルスである (PNAS. 2001)。我々の共同研究者である藤堂らは、oncolytic HSV を使用し従来型 oncolytic HSV と比較して腫瘍内の細胞傷害性T細胞が増加していることを示している (PNAS. 2001)。我々も子宮頸がんモデルを使用して、oncolytic HSV(T-01)の抗腫瘍効果と細胞傷害性T細胞の増加を調べ、同様の結果を得ている (JIMA. 2014)。現在のチェックポイント阻害剤では、腫瘍内に細胞傷害性T細胞が存在し、かつMHC class Ⅱ発現がある状態で効果を発揮するものと考えられる。MHC class Ⅱ発現が低下した腫瘍に対して oncolytic HSV とチェックポイント阻害剤の併用は、新たな卵巣がんの治療戦略になりうると考える。

2. 研究の目的

本研究は、卵巣がんにおけるMHC class Ⅱ発現低下による免疫逃避に着目し、腫瘍溶解性ヘルペスウイルス (oncolytic HSV) を用いて免疫逃避改善を目指した新規卵巣がん治療法開発を目的とする基礎研究である。

当該申請課題では研究期間内に、oncolytic HSV により in vitro における卵巣がん培養細胞株でのMHC class Ⅱ発現低下改善を確認する。さらに in vivo において免疫チェックポイント阻害薬を併用することによる抗腫瘍効果を検証し、腫瘍免疫を中心にその詳細を検討する。

3. 研究の方法

1) フローサイトメーターを用いた培養細胞株での oncolytic HSV 感染後のMHC class ⅡおよびT細胞共刺激分子発現解析

培養細胞による検証

対象：ヒト由来培養細胞株 (卵巣癌 5 株、子宮頸癌 3 株)、マウス由来培養細胞株 (卵巣癌 1 株、子宮頸癌 1 株)

方法：培養細胞株に oncolytic HSV (T-01) を感染させ、感染前、感染後 24 時間、感染後 48 時間の培養細胞表面に発現したMHC class ⅡおよびT細胞共刺激分子をフローサイトメーターにて測定する。

C57BL/6 マウスを使用した担癌マウスモデルでのMHC class ⅡおよびT細胞共刺激分子発現の確認。

方法：マウス由来培養細胞株 (卵巣癌 1 株、子宮頸癌 1 株) を C57BL/6 マウスの皮下および腹腔内に植え、腫瘍形成を確認した後に腫瘍を採取。腫瘍細胞上の発現を確認。

2) C57BL/6 マウス使用した担癌マウスモデルでの抗腫瘍効果の検証：STEP2

平成 28 年度に in vitro で解析したT細胞共刺激分子から有用なチェックポイント阻害剤の候補を選定し使用する。

皮下腫瘍モデル

C57BL/6 マウスの皮下に ID 8 (マウス卵巣癌培養細胞株) を植え、腫瘍形成を確認した後 7 日毎に 2 回 oncolytic HSV (T-01) を投与 (腫瘍内投与)。抗体薬はウイルス接種後 2 日後に投与する。継時的に腫瘍体積や体重を測定し、治療終了後 4 週間後に生存数を計測する。また、腫瘍および血液・脾臓を採取し、腫瘍は免疫染色で検討し、脾臓・血液はフローサイトメーターにて検討する。(Molecular Therapy 12(5) 789-802 参照)

腹腔内播種モデル

C57BL/6 マウスの腹腔内に I D 8 (マウス卵巣癌培養細胞株) を植え、21 日目と 25 日目に oncolytic HSV (T-01) を投与 (腹腔内投与)。抗体薬はウイルス接種後 2 日後に投与する。継続的に腫瘍接種後 6 週間までに生存数や体重および腹腔内所見や腹水などを計測する。また、腫瘍および腹水・血液・脾臓を採取し、腫瘍は免疫染色で検討し、脾臓・血液はフローサイトメーターにて検討する。(Molecular Therapy 12(5):789-80, 2005 および JIMA 65(4):293-305, 2013 参照)

4. 研究成果

本研究の目的は、卵巣がんにおける MHC class I 発現低下による免疫逃避機構に着目し、腫瘍溶解性ヘルペスウイルス (oncolytic HSV) を用いて免疫逃避改善を目指した新規卵巣がん治療法開発である。

平成 28 年度は、培養細胞系で oncolytic HSV 感染後の MHC class I 発現および T 細胞共刺激分子の発現解析を検証済みであるヒトパピローマウイルス (HPV) E6/7 に対する腫瘍抗原を細胞表面に発現する TC-1 細胞で T 細胞共刺激分子阻害薬や抗がん剤との併用用法の検討を行った。その結果、T-01 感染後に TC-1 細胞表面の T 細胞共刺激分子発現は、動物実験と培養細胞実験ともに変化を認めなかった。また、両側腫瘍形成モデルで検証を行った。マウスの背側左右に TC-1 細胞を移植し、右側にはウイルス接種、左側はウイルスを接種せずに腫瘍浸潤リンパ球の解析を行った結果、左側の腫瘍では未治療群と比較してウイルス治療群では腫瘍浸潤リンパ球数の増加を認めた。さらに T 細胞共刺激分子阻害薬を併用するとその傾向は顕著となったが、右側にはウイルス接種腫瘍に対する効果が減弱された。また、抗がん剤と腫瘍溶解性ヘルペスウイルスの併用の可能性についても検証を行った結果、一部の抗がん剤を併用すると腫瘍浸潤リンパ球が減少するにもかかわらず、腫瘍が縮小することが認められた。以上の結果より、腫瘍溶解性ウイルスにより免疫逃避が改善される可能性が示された一方、抗腫瘍免疫と一緒にウイルスに対する免疫作用が亢進し、ウイルスの作用を減弱している可能性が示された。

平成 29 年度は、平成 28 年度に動物実験と培養細胞実験にて検証した oncolytic HSV (T-01) 感染後の MHC class I 発現および T 細胞共刺激分子発現に変化を認めなかった結果より、動物実験において抗がん剤との併用用法の検討を行った。培養細胞実験の結果からシスプラチン (CDDP)、エトポシド (ETP)、フルオロウラシル (5-FU)、イリノテカン (CPT-11)、シクロホスファミド (CPA) をモデルマウスに投与し、抗腫瘍効果を認めた抗がん剤は T-01 との併用を行った。検証を行った結果、用いた全ての抗がん剤は無治療対照群と比し、有意な抗腫瘍効果を認めため T-01 との併用を行った。CPT-11、ETP、5-FU 併用群はいずれも抗腫瘍効果の増強を認めなかった。それに対し、CDDP、CPA 併用群は抗がん剤投与群、T-01 投与群と比し、有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた。その中でも CPA を併用すると腫瘍浸潤リンパ球が減少するにもかかわらず、腫瘍が縮小することが認められた。平成 28 年度および 29 年度の結果より、腫瘍溶解性ウイルスにより免疫逃避が改善される可能性が示された一方、抗腫瘍免疫と一緒にウイルスに対する免疫作用が亢進し、ウイルスの作用を減弱している可能性が示された。

平成 30 年度は免疫チェックポイント阻害薬 (抗 PD-L1 抗体) との併用を検討した。抗腫瘍効果はもちろんであったが、oncolytic HSV と抗 PD-L1 抗体を併用することによって抗 PD-L1 抗体単剤より腫瘍浸潤リンパ球を増加することが認められた。また卵巣癌患者は腹水が多量に貯留する症例が多いことから、治療への応用を模索するために腹水還流過を使用した症例における腹水中の免疫状態を解析した。

これまでの研究結果より、腫瘍溶解性ウイルスにより免疫逃避が改善される可能性が示された一方、抗腫瘍免疫と一緒にウイルスに対する免疫作用が亢進し、ウイルスの作用を減弱している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Masahiro Kagabu, Naoto Yoshino, Tatsunori Saito, Yuki Miura, Ryosuke Takeshita, Kazuyuki Murakami, Hideki Kawamura, Tsukasa Baba, Toru Sugiyama. The efficacy of oncolytic herpes simplex viral therapy for uterine cervical cancer. *OncoTargets and Therapy* 査読あり 2019(under revision)

Yoshino N, Takeshita R, Kawamura H, Murakami K, Sasaki Y, Sugiyama I, Sadzuka Y, Kagabu M, Sugiyama T, Muraki Y, Sato S. Critical micelle concentration and particle size determine adjuvant activity of cyclic lipopeptides. *Scand J Immunol*. 査読あり 2018 doi: 10.1111/sji.12698.

Yoshino N, Takeshita R, Kawamura H, Sasaki Y, Kagabu M, Sugiyama T, Muraki Y, Sato S. Mast cells partially contribute to mucosal adjuvant activity of surfactin in mice. *Immun Inflamm Dis*. 査読あり 6 2018 117-127.

川村 英生, 利部 正裕, 佐々木 裕, 村上 一行, 川村 花恵, 池田 浩, 阿保 亜希子, 吉野 直人, 村木 靖, 杉山 徹 腫瘍溶解性ヘルペスウイルスとシクロホスファミドを併用した子宮頸がん新規治療法の検討 岩手医学誌 査読あり 69 2017 75-88

村上 一行,利部 正裕,佐々木 裕,川村 花恵,川村 英生,吉野 直人,村木 靖,
杉山 徹 腫瘍溶解性ヘルペスウイルスと免疫チェックポイント阻害薬を併用した 子宮
頸がんに対する新規治療法の検討 岩手医学誌 査読あり 68 2016 113-130

〔学会発表〕(計 7 件)

利部正裕 癌治療における CART 婦人科悪性腫瘍患者における CART 療法 第 39 回日本ア
フェレシス学会学術講演会 2018 年

利部正裕 子宮頸がん検診によって発見された子宮頸部腺癌の検討 第 59 回日本臨床細
胞学会 2018 年

川村 英生, 利部 正裕, 他 子宮頸がんに対する化学療法とウイルス併用療法への基礎研
究 第 68 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 2017 年

村上 一行, 利部 正裕, 他 子宮頸がんに対する腫瘍溶解性ウイルスと免疫チェックポ
イント阻害剤を併用した新規療法の検討 第 34 回日本産婦人科感染症学会・学術集会 2017
年

川村 英生, 利部 正裕, 他 腫瘍溶解性ウイルスと化学療法を併用した子宮頸がん新規治
療法の検討 第 34 回日本産婦人科感染症学会・学術集会 2017 年

川村 英生, 利部 正裕, 他 子宮頸がんに対する単純ヘルペスウイルスを用いたウイルス
療法と抗がん剤併用療法における基礎研究 第 64 回北日本産科婦人科学会総会・学術講演
会 2016 年

村上 一行, 利部 正裕, 他 子宮頸がんに対する腫瘍溶解性ウイルスと免疫チェックポ
イント阻害剤療法についての検討 第 68 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：吉野 直人

ローマ字氏名：(Yoshino, Naoto)

所属研究機関名：岩手医科大学

部局名：医学部

職名：特任准教授

研究者番号(8桁)：20372881

研究分担者氏名：杉山 徹

ローマ字氏名：(Sugiyama, Toru)

所属研究機関名：岩手医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：40162903

研究分担者氏名：阿保 亜紀子

ローマ字氏名：(Abo, Akiko)

所属研究機関名：岩手医科大学

部局名：医学部

職名：特任講師

研究者番号（8桁）：80326686

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、研究者個人に帰属されます。