

令和元年6月13日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06568

研究課題名(和文) 口腔癌に対するIL-9発現腫瘍溶解性ウイルスの開発

研究課題名(英文) Development of Oncolytic Sindbis virus armed with IL-9 for Oral-cancer therapy

研究代表者

齋藤 謙悟 (Saito, Kengo)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：70451755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍溶解性ウイルスであるシンドビスウイルスが、安全に腫瘍免疫誘導能とその抗腫瘍効果を亢進させるため、腫瘍局所のみで免疫調節因子(Interleukin-9: IL-9)を発現する「IL-9発現シンドビスウイルス(SIN-IL9)」を開発した。SIN-IL9は癌細胞株内でIL-9を発現し、細胞傷害性を示した。同様に、免疫がある担癌動物において、IL-9を発現し腫瘍増殖抑制効果を示した。その際、正常臓器への障害は見られなかった。さらに、腫瘍に対する獲得免疫を脾臓細胞にて確認できた。今後、SIN-IL9は新規癌治療法の開発へ応用することが期待できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍溶解性ウイルスは、新規腫瘍療法あるいは補助療法として期待され、国内外で様々なウイルスが開発されている。また、腫瘍溶解ウイルスは腫瘍溶解性のみならず、腫瘍免疫誘導による抗腫瘍効果が解明されつつあり、近年、開発が進む腫瘍免疫療法の一つに分類されている。しかし、治療段階では宿主のウイルス免疫により治療効果の障害が問題であった。今回、初期免疫誘導能を強化した改変腫瘍溶解ウイルスを開発でき、免疫を有する動物実験にて効果が得られ、今後の腫瘍溶解ウイルスの臨床応用への可能性を示し学術的意義があった。また、従来の癌治療と併用することにより治療効果が上がることが予測され社会的意義を得た。

研究成果の概要(英文)：The oncolytic Sindbis virus safely expresses the immunomodulatory factor (Interleukin-9: IL-9) only at the local area of the tumor to induce the tumor immunity and its antitumor effect. We developed Sindbis virus armed with IL-9 (SIN-IL9) that expressed IL-9 in cancer cell lines and showed cytotoxicity. Similarly, in immunocompetent mouse bearing tumor, SIN-IL-9 expressed IL-9 in the tumor and show the tumor growth inhibitory effect. No damage to normal organs was found. The acquired immunity against the tumor could be confirmed in spleen cells. In the future, SIN-IL9 could be expected to be applied to the development of new cancer therapy.

研究分野：ウイルス学

キーワード：腫瘍溶解性ウイルス 口腔癌 腫瘍免疫療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍溶解性ウイルスは、新規腫瘍療法あるいは補助療法として期待され、国内外で様々なウイルスが開発されている。代表的なウイルスに、DNA ウイルスであるヘルペスウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、RNA ウイルスであるコクサッキーウイルス、VSV、麻疹ウイルス等があり、腫瘍特異的に増殖できるように改変し開発されてきた。特に、DNA ウイルスは、遺伝子改変が行い易いことから研究が発展し臨床試験も行われているが、十分な効果は得られていないのが現状である。RNA ウイルスは、腫瘍内での増殖効果が強く抗腫瘍効果が期待されている。

近年、腫瘍溶解ウイルスは腫瘍溶解性のみならず、腫瘍免疫誘導による抗腫瘍効果が期待されている。その腫瘍免疫を誘導する方法は、ウイルス自身がもつ免疫誘導能を応用する (Bell MP., Mol cancer Ther. 15: 523-30, 2016) ものと、免疫調節因子 (サイトカイン、腫瘍高原ペプチド等) を発現する遺伝子改変ウイルスを応用する (Quetglas JI., Cancer Immunol Res.3:449-54, 2015) ものがある。

Interleukin-9 (IL-9) は、肥満細胞の増殖や機能の亢進、CD4+T 細胞サブセットの分化や増殖、IgE 産生の増幅、造血発生の支持、気道および腸管上皮細胞への作用など多彩な機能を持ち、炎症やアレルギーに関与する。腫瘍においては、血液腫瘍の発生に関与する報告 (Renauld JC., Oncogene 9:1327-32, 1994) がある。しかし、近年、固形腫瘍 (悪性黒色腫、肺癌) では、前述の IL-9 の機能による自然免疫の活性化、NK 細胞、CD8 細胞の機能の促進による腫瘍免疫誘導とその抗腫瘍免疫効果を亢進する報告 (Purwar R., Nat. Med. 1-8: 1248-53, 2012) がされている。

### 2. 研究の目的

トガウイルス科アルファウイルスのシンドビスウイルス (SIN) は、多くの癌細胞に発現しているラミニンレセプターに吸着し、腫瘍特異的に複製し腫瘍を殺傷する低病原性腫瘍溶解性ウイルスである。しかし、臨床応用の際し、腫瘍溶解ウイルスに期待される腫瘍免疫の誘導とその抗腫瘍効果が課題として残されている。近年、IL-9 による腫瘍免疫誘導と抗腫瘍効果が注目されているが、口腔癌での解析は行われていない。そこで本研究は、シンドビスウイルスのゲノムへ IL-9 配列を組み込んだ IL-9 発現シンドビスウイルスを作成し、腫瘍局所に IL-9 を発現させることにより、安全に腫瘍免疫誘導とその抗腫瘍効果亢進させる腫瘍溶解ウイルスを開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) IL-9 発現シンドビスウイルスの作製

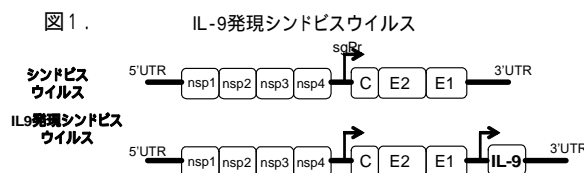
##### マウス IL-9 のクローニング

PCR によりシンドビスウイルスベクターの導入部位に適した末端配列を有するマウス IL-9 配列のクローニングを行う。プライマーは、マウス IL-9 のストップコドンを削除した部位に設定した (mIL9-F1: ATGTTGGTGACATACATCCTTGCC、mIL9-R1: TGGTCGGCTTTTCTGCCTTGG)。

##### IL-9 発現シンドビスウイルスのプラスミドベクターの作成

IL-9 の導入部位により、ウイルスの増殖率に差がある事が予測される。今回は、既にクローニングされているシンドビスウイルスプラスミドベクター (pSIN; 17kbp) の 3'UTR 部位に、サブジェノミックプロモーター (Subgp) とマウス IL-9 (mIL-9) 遺伝子を導入した。

まず、SIN の 3'UTR 部位を pGEM ベクター (プロメガ) にクローニングした pSIN-3'UTR ベクターを作成し、同ベクター上の SIN3'UTR に subgp+mIL-9 をライゲーションした。次に、subgp+mIL-9 が挿入された 3'UTR を pSIN へライゲーションし、mIL9 発現シンドビスウイルスプラスミドベクター (pSIN-mIL9) を作成した (図 1)。各ライゲーション後にシーケンスを行った。



##### IL-9 発現シンドビスウイルスの作成

リバースジェネティクス法で mIL9 発現シンドビスウイルスの作成を行った。まず、pSIN-mIL9 ベクターをライナー化し、SP6 ポリメラーゼ; RiboMAX™ Large Scale RNA Production System - SP6 (プロメガ) にて、SINmiRT のプラス鎖 RNA を転写した。次に、転写した、SINmiRT プラス鎖 RNA を、Lipofectamin3000 (invitrogen) にて、Vero 細胞株、あるいは、BHK21 ヘトランスフェクションをし、3-4 日後に細胞傷害を確認後に上清を回収した。

## (2) IL-9 発現シンドビスウイルスの本来のウイルス性質の評価

### IL-9 発現シンドビスウイルスの複製の評価

BHK21 細胞株で増殖し、Vero 細胞でウイルス力価を PFU 法にて測定した。

### IL-9 発現シンドビスウイルスの感受性の評価

扁平上皮癌細胞株 (SCC7) にて、シンドビスウイルスの感受性を、細胞傷害性で評価した。

### IL-9 発現量の評価

BHK 細胞、SCC7 細胞へ IL-9 発現シンドビスウイルスを感染し、ウイルスの増殖率、細胞傷害性を評価する。

## (3) IL-9 発現シンドビスウイルスの安全性と腫瘍溶解性の評価

### オボアルブミン発現癌細胞株の作成

マウス扁平上皮癌細胞株 SCC7 と CF3 マウス用いて作成した担癌マウスモデルで腫瘍獲得免疫を評価するために、SCC7 細胞株にオボアルブミン (ova) が恒常発現する細胞株 (SCC7-ova) を作成した。まず、オボアルブミン遺伝子を導入したレンチウイルスベクターを作成し、SCC7 へ ova を導入とセレクトクローニングをおこなった。

### 担癌動物での安全性評価

SCC7-ova 担癌マウスの腫瘍内へ、SIN-IL9 を  $2.5 \times 10^4$  pfu で投与し、身体変化、体重変化を測定し、安全性を評価した。また、癌部と正常臓器からウイルスを回収し、ウイルスの集積性を検討した。

### 腫瘍抑制効果

BALB/C マウスへ SCC7-ova を移植して、腫瘍容積が  $100 \text{ mm}^3$  になったら、週 1 回、SIN-IL9, SIN-ov、を各条件 5 匹ずつ、 $2.5 \times 10^4$  pfu で腫瘍内投与を行い、腫瘍体積量を測定した。DMEM のみ投与群をコントロールとした。

## (4) IL-9 発現シンドビスウイルスの腫瘍免疫誘導性とその抗腫瘍効果の評価

### 腫瘍免疫細胞評価

担癌マウスを作成し、IL-9 発現シンドビスウイルスを投与 (腫瘍内) し、脾臓から免疫担当細胞を回収し、CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、Treg (Foxp3 陽性) 細胞、B 細胞、骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) の分布を非投与群と比較検討する。

### 獲得腫瘍免疫の評価

担癌マウスを作成し、IL-9 発現シンドビスウイルスを投与 (腫瘍内) し、脾臓から免疫担当細胞を回収し、各腫瘍抗原 (腫瘍細胞、オボアルブミンペプチド) の刺激に対する IFN の発現量を ELISPOT 法で評価した。

以上から、安全性があり、腫瘍溶解性、腫瘍免疫誘導が高い IL-9 発現シンドビスウイルスを選定した。

## 4. 研究成果

### (1) IL-9 発現シンドビスウイルスの複製

リバースジェネティクス法で BHK 細胞より回収した IL-9 発現シンドビスウイルス (SIN-IL9) を、再度 BHK 細胞にて複製しウイルス力価を測定した。SIN-IL9 のウイルス力価は  $5 \times 10^5$  PFU/ml であった。改変前の親株であるシンドビスウイルス (SIN-ov) は  $5 \times 10^6$  PFU/ml となった。以上のように、SIN-IL9 は親株 SIN-ov より複製効率が低かったが、一般的に改変したウイルスの特徴であり、研究を進めるには十分な力価を得られた。

### (2) IL-9 の発現

SIN-IL9 を BHK 細胞、SCC7 細胞株に感染し、24 時間後に細胞蛋白を回収しウェスタンブロッティングにて IL-9 の発現を確認した (図 2)。

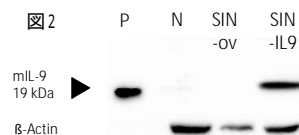
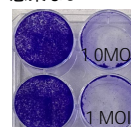


図 2. P: マウス IL9 蛋白, N: 感染なし

### (3) 細胞障害性

SIN-IL9 を SCC7 細胞株に感染させ、細胞障害性を確認した。親株である SIN-ov 同様に 100% の細胞障害性を示すことが確認できた (図 3) 。しかし、細胞障害性を示す時間が SIN-ov は 20-24 時間であるのに対し、36-48 時間と延長した。

図 3. 感染なし SIN-IL9



#### (4) 担癌動物での IL-9 発現シンドビスウイルスの安全性評価

マウス扁平上皮癌細胞株 SCC7 と CH3 マウスを用いて作成した担癌マウスモデルにて、腫瘍内に SIN-IL9、SIN-ov、DMEM を複数回投与し、安全性を評価した。1 回量は  $2.5 \times 10^4$  PFU とし、3 - 4 日毎に 6 回行った。SIN-IL9 は、SIN-ov は DMEM と同様に 3 回目以降の投与で 15 - 20% 割合のマウスでアナフィラキシー様の症状を 1 - 2 時間ほど示した。症状が 2 時間以上に及ぶものは、投与を中止した。しかし、投与期間中から投与後 4 週間は体重の変化はなかった。さらに、癌部と正常臓器からウイルスを回収し、ウイルスの集積性を検討したが検出はされなかった。以上から、治療方法は、1 回量を  $2.5 \times 10^6$  PFU とし、3 - 4 日毎に 6 回投与することにした。

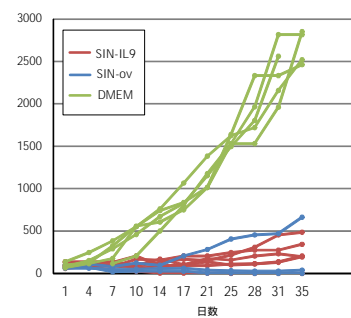
#### (5) オボアルブミン発現癌細胞株の作成

SCC7 にオボアルブミン (ova) が恒常発現する細胞株 (SCC7-ova) を作成した。オボアルブミン遺伝子を導入したレンチウイルスベクターで導入後とプラスタサイジン  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  でセレクションを行った。オボアルブミンの発現はウエスタンブロットにて確認した。

#### (6) IL9 発現シンドビスウイルスの腫瘍抑制効果

CH3 マウスへ SCC7-ova を移植して、腫瘍容積が  $100 \text{ mm}^3$  になったら、SIN-IL9、SIN-ov、DMEM を各条件 5 匹ずつ、 $2.5 \times 10^4$  pfu で腫瘍内投与を行い、腫瘍計を測定した。コントロールである DMEM と比較したところ、SIN-IL9 と SIN-ov では有意に腫瘍抑制効果があった。しかし、SIN-IL9 と SIN-ov の間には有意な差は見られなかった (図 4)。

図 4 . 腫瘍体積 (  $\text{mm}^3$  )



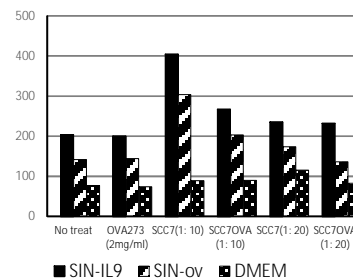
#### (7) 腫瘍免疫細胞評価

IL-9 発現シンドビスウイルスを投与群の脾臓細胞を回収し、CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、Treg (Foxp3 陽性) 細胞、B 細胞、骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) の分布を解析した。DMEM のみの投与群と比較すると、CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の比率が、それぞれ 9.2% から 12.8%、4.6% から 6.1% と増加していた。また、CD4/8 比も 1.7 から 2.0 へ上昇していた。MDSC は DMEM のみが 3.4% に対して 1.3% と減少していた。

#### (8) 獲得腫瘍免疫の評価

IL-9 発現シンドビスウイルスを投与群の脾臓細胞を回収し、各腫瘍抗原 (腫瘍細胞株 SCC7、オボアルブミンペプチド) による刺激に対する IFN を発現する細胞数を ELISPOT 法で評価した。SIN-IL9 投与群では、コントロールである DMEM 投与群と比較すると、腫瘍細胞 (SCC7) による刺激に対し、有意に INF を放出する細胞数が多かった (図 5)。

図 5 . カウント数



### 5 . 主な発表論文等

#### [雑誌論文] (計 1 件)

Kageyama K, Ohara M, Saito K, Ozaki S, Terai M, Mastrangelo MJ, Fortina P, Aplin AE, Sato T. Establishment of an orthotopic patient-derived xenograft mouse model using uveal melanoma hepatic metastasis. J Transl Med. 2017 Jun 23;15(1):145 査読あり

#### [学会発表] (計 3 件)

永塚啓太郎、齋藤謙悟、丹沢秀樹他：口腔癌における Cavin/caveolin-1 複合体シグナルを標的とした腫瘍進展抑制法の検索 第 63 回 日本口腔外科学会総会 2018 年 11 月 2 日 幕張(千葉)

齋藤謙悟、白澤浩他：新規フェニル化合物 CCL360、CCL361 による G2/M 期停止とアポトーシス誘導 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 27 日 大阪

坪坂歩、齋藤謙悟、白澤浩他：新規化合物 CCL441 は細胞周期を G2/M 期で停止させアポトーシスを誘導する 第 76 回日本癌学会総会 2017 年 9 月 30 日 横浜

#### [図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：白澤 浩

ローマ字氏名： Shirasawa Hiroshi

研究協力者氏名：丹沢 秀樹

ローマ字氏名： Tanzawa Hideki

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。