

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02691

研究課題名(和文) 癌を支える癌関連間葉系幹細胞の癌ワクチンへの標的化

研究課題名(英文) Oncolytic virus targeting tumor associated mesenchymal stem cells

研究代表者

松村 繁 (Matsumura, Shigeru)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：60523511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍溶解性ウイルスは、免疫抑制的な癌微小環境を劇的に変化させる。膵癌に特徴的な癌組織の固さは、腫瘍細胞が引き込む癌関連線維芽細胞および間葉系幹細胞による。HSV1自然変異株である腫瘍溶解性ウイルスC-REV(HF10)によって間葉系幹細胞を標的とするかを試みた。腫瘍溶解性ウイルスは弱毒化株であるため、正常細胞に感染できるものの増殖はできない。正常細胞である間葉系幹細胞に対するC-REVの感受性を、癌細胞株と比較検討したところ、C-REVは間葉系幹細胞にも感染、増殖できた。マウス膵癌皮下腫瘍モデルにおいて、間葉系幹細胞を腫瘍内投与した腫瘍にC-REVを投与すると、間葉系幹細胞を減少させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で派生的に検証し報告したSTING経路と腫瘍溶解性ウイルスの知見は、新規治療法の提案につながった。2'3'-cGAMPは天然のSTINGアゴニストであるが、様々なSTINGアゴニストが世界中で開発競争を繰り広げている。腫瘍溶解性ウイルスとの併用療法は報告されておらず、今後臨床研究されていく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：One of the mechanisms for immune suppression in pancreatic tumors is the recruitment of mesenchymal stem cells (MSC), which turn into tumor-associated fibroblasts. C-REV, our oncolytic virus, has been shown to dramatically change the tumor microenvironment. Here, we examined whether C-REV has the ability to kill MSC in the tumor tissue. A naturally mutated attenuated HSV1, C-REV cannot replicate inside the healthy normal cells. However, we found that C-REV can infect and replicate in the MSC. Furthermore, C-REV treatment on the MSC-injected pancreatic tumors showed decreased numbers of MSC in the mouse model.

研究分野：細胞生物学

キーワード：腫瘍溶解性ウイルス

1. 研究開始当初の背景

腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス C-REV (旧称 HF10)は、名古屋大学ウイルス学教室で開発されたバイオ製剤であり、当該研究室で投与経路・併用療法の研究を行っている。これまでに非切除膵癌に対する臨床応用の結果を報告している (Kasuya, H. et al. Hepatogastroenterology 2011)。腫瘍溶解性ウイルスは、癌ワクチンとして免疫細胞の誘導・賦活化を通して、転移腫瘍を含む全身療法としての効果が明らかにされた (Caroline JB, et al. Nature 2011)。

腫瘍組織は不均一な癌細胞から成る。さらに癌細胞が誘引、性状を変化させた癌関連繊維芽細胞 (cancer associated fibroblasts:CAF) や間葉系幹細胞 (TA-MSC) が加わり、不完全な血管誘導を含めた非常に複雑な組織を為す。高増殖細胞を標的にした抗癌剤、分子標的抗癌剤、放射線療法において、治療抵抗性癌細胞が腫瘍組織に残存し癌再発の元凶となること、残存癌細胞は癌幹細胞であることが明らかにされた。TA-MSC が作り出す癌微小環境が癌幹細胞の存続を担保し、加えて癌の免疫寛容状態を作り出すことが示されてきている。すなわち、TA-MSC は腫瘍組織の影の支持基盤として機能する。また、特に膵臓癌では、癌細胞による線維芽細胞の「教化」が顕著で、腫瘍組織を非常に固いものにさせ、CD8+T 細胞の侵入を拒む障壁となっている。癌の治療抵抗性、再発をサポートする TA-MSC をターゲットにした治療法を開発できるならば、これまでの癌治療を基盤にしながら、その効果を相乗的に向上させることができるのではないかと仮説を立てた。しかし、癌細胞より正常組織に近く、ターゲットにすることは容易くはない。そこで、C-REV が TA-MSC を標的として殺せるのかを検証することを最初の糸口として研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス膵癌モデルを用いて、C-REV による癌関連間葉系幹細胞へ与える影響について検証を行い、C-REV による癌関連間葉系幹細胞の標的化の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスの四肢長骨より間葉系幹細胞の初代培養を行い、C-REV による感染の有無及びウイルス複製を検証する。また、樹立された間葉系幹細胞を導入し、同じく検証する。

(2) マウス膵癌細胞同種皮下移植モデルを用いて、同種間葉系幹細胞を腫瘍内投与する。この腫瘍に C-REV を腫瘍内投与した際の間葉系幹細胞の増減を検証する。また、腫瘍の増殖を調べる。

4. 研究成果

(1) 間葉系幹細胞を用いての評価

マウスの四肢長骨より間葉系幹細胞の初代培養を試みた。うまく培養できる FBS の Lot チェックに時間がかかった。継代培養条件に時間がかかった為、この FBS を用いて理研バイオリソー

スセンターより、C3H/He マウス由来の間葉系幹細胞株 (KUSA-A1) を導入した。培養が安定した後、C-REV を用いて、in vitro の細胞障害性アッセイ (MTT 法) を用いて評価した (図 1)。

正常細胞に位置づけられる KUSA-A1 は、

癌細胞株に比べて C-REV への感受性が低いことが分かったが、それでも感受性がないわけではなく、C-REV がそのまま間葉系幹細胞を標的化できる可能性が示唆された。

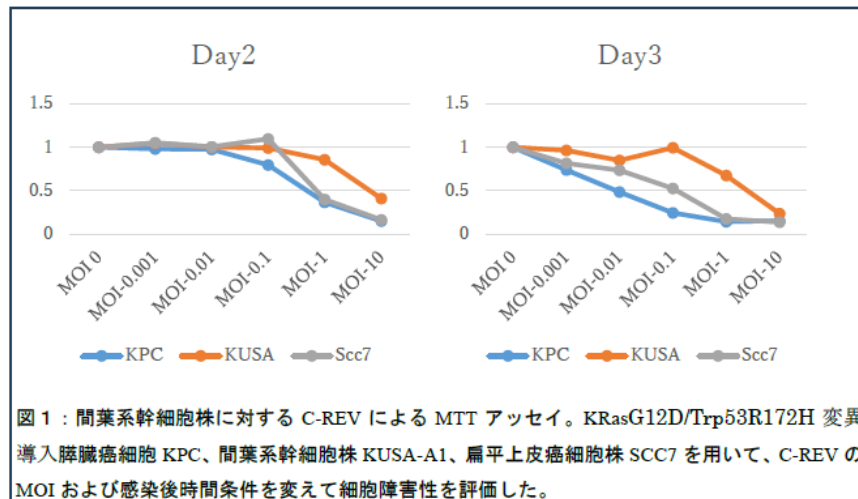


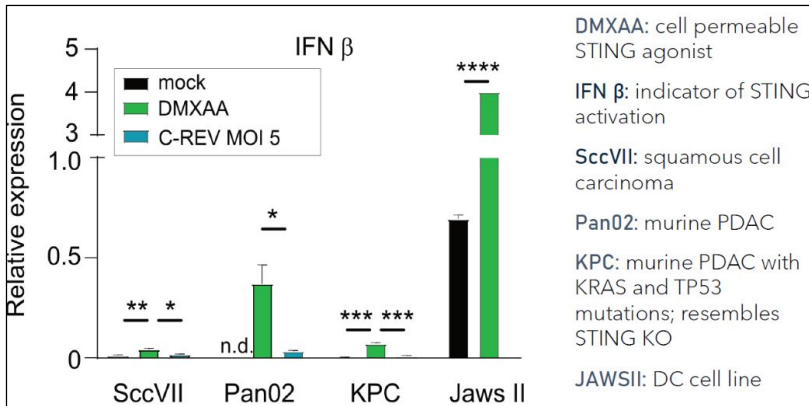
図 1 : 間葉系幹細胞株に対する C-REV による MTT アッセイ。KRasG12D/Trp53R172H 変異導入膵臓癌細胞株 KPC、間葉系幹細胞株 KUSA-A1、扁平上皮癌細胞株 SCC7 を用いて、C-REV の MOI および感染後時間条件を変えて細胞障害性を評価した。

(2) KPC(LSL-Kras G12D/+; LSL-Trp53R172H/+; Pdx-Cre)マウスに形成された膵臓癌より樹立された膵癌細胞株、KPC 細胞を用いた皮下腫瘍モデルでの検証を行った。その為、初代培養 MSC を B6 マウスより採取分離した。マウス大腿骨から骨髓細胞をメディウムとシリンジを用いて洗い出し、残った骨を 2 , 3 mm に切断、collagenaseII を添加したメディウムにて 1 時間振盪培養後、骨片を洗い骨片を 1 週間培養した。得られた MSC は、マーカーで確認した(CD45-/CD11b-/CD31-/Sca-1+/C44+/CD105+)。皮下腫瘍をマウスに形成させ、MSC を腫瘍内投与した。その際、C-REV を同時に腫瘍内に投与することで、腫瘍増殖に与える影響を検証した。C-REV は 2×10^6 Pfu、MSC は 2×10^4 細胞を腫瘍内投与した。また、C-REV と MSC を混ぜ合わせ事前に感染させた MSC を腫瘍内投与した。MSC を投与した群は PBS を投与した群と差は見られなかった。C-REV を単体で投与した群は腫瘍増殖を 60% 程度抑制したのに対し、C-REV 感染 MSC を投与した群は PBS 群と比べて 80% 程度の増殖抑制を示した。

(3) KUSA-A1 細胞および SCC7 細胞は C3H/He マウス由来であり、同種移植モデルとして実験可能であることから、SCC7 皮下腫瘍をマウスに形成させ、KUSA-A1 細胞の腫瘍内投与を行った。同じ腫瘍溶解性 HSV1 由来のウイルスだが、C-REV とは異なる 34.5 遺伝子を欠損させた臨床 HSV1 株由来のウイルスを用いて、同様の実験を行った。KUSA-A1 を投与した群は PBS 投与群よりも増殖が著しかった。また、驚いたことに (2) と同様に、ウイルス感染させた KUSA-A1 を投与した群はウイルス単独投与群よりも腫瘍増殖抑制ができることが示された。この詳細は現在精査中である。

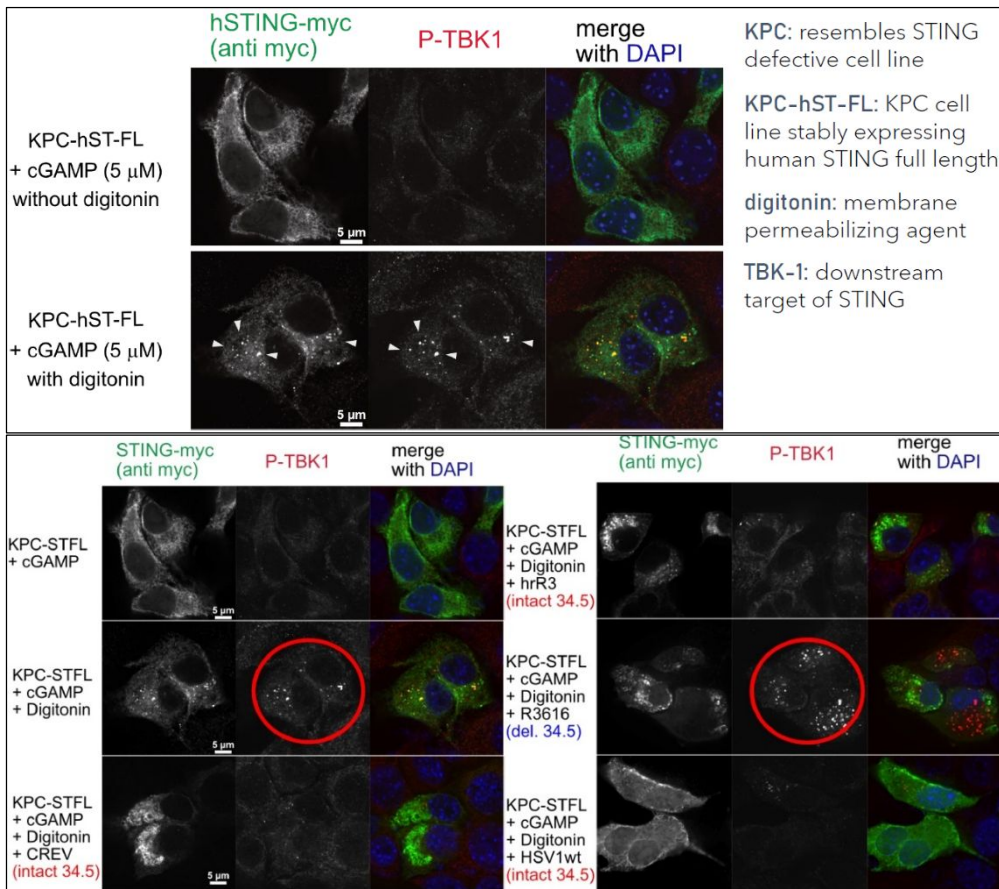
(2) (3) より、間葉系幹細胞は HSV1 腫瘍溶解性ウイルスに感受性であることがわかったが、in vivo において、がん関連繊維芽細胞へと教育されていく間葉系細胞がウイルス感受性であり続けるのかはさらなる検証が必要である。

(4) さらに、(1) より派生的に C-REV の膵癌細胞株への感受性について検証した。ウイルス由来の二本鎖 DNA に対する宿主自然免疫応答機構に着目し、STING の癌細胞及び間葉系幹細胞における動態を検証した。癌細胞では程度の違いはあれ STING 経路の減弱が見られ、C-REV 感染によって STING 経路は完全に抑制された (Morimoto. D. et. Al, Cells, 2021)。また、間葉系幹細胞においても STING 経路の活性化が弱いこと、C-REV によって抑制されることがわかった。C-REV の癌細胞内での STING 経路への耐性から、STING アゴニストである 2'3'-cGAMP と C-REV の併用療法が派生的に考えられた。この仮説をマウスの膵臓癌皮下腫瘍モデルで検証したところ、併用療法での相乗的な抗腫瘍効果が得られた (特許出願済、Molecular Oncology, 2023)。

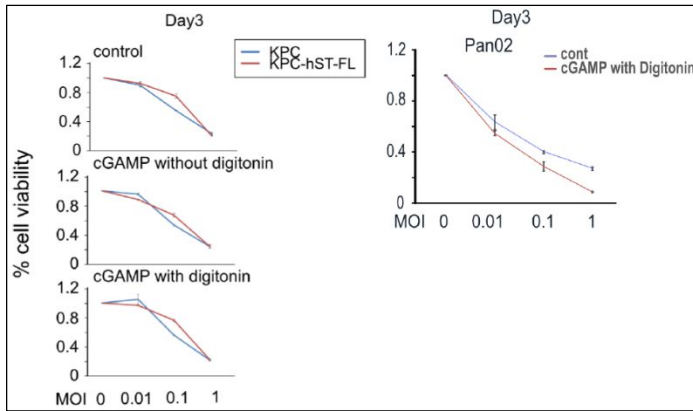


マウスの癌細胞株、SccVII、Pan02、KPC および、樹状細胞株 JAWSII を用いて、STING アゴニストの DMXAA にて処理を行い、6 時間後に qPCR 法にて IFNβ の発現誘導を確認した(緑)。未処理と比較して、いずれも

IFNβ の上昇が見られたものの、JAWSII の誘導反応は明らかに高かった。また、癌細胞株に C-REV を感染させても IFNβ の誘導は起こらなかった。このことから、これらマウスの癌細胞株は STING 経路がいずれも減弱していることが示唆された。そこで、KPC 細胞の STING 経路を可視化するため、hSTING の全長(hST-FL)を安定発現する株を作出し、hSTING および下流の TBK1 のリン酸化(P-TBK1)を細胞染色にて観察した。cGAMP を直接細胞培養中に加えても hSTING は反応しないが、細胞膜に穴をあける digitonin 処理を行うと cGAMP の細胞内流入が起こり、hSTING の凝集および P-TBK1 を観察した。



cGAMP + digitonin の条件下で、3 種類の HSV1 腫瘍溶解性ウイルスと野生型 HSV1 を感染させ、STING の反応性の観察を行った。C-REV および hrR3 を感染させると、STING の凝集が部分的に起こったが、P-TBK1 のシグナルは見られなかった。一方で、R3616 を感染させると、STING の凝集程度も強いうえで、P-TBK1 の強いシグナルが観察された。これとは逆に、野生型の HSV1 は STING の凝集を完全に抑制し、P-TBK1 シグナルも見られなかった。C-REV および hrR3 は 34.5 遺伝子が存在するのに対して、R3616 は 34.5 遺伝子が完全に欠失している。このことから、癌細胞の STING 経路抑制に 34.5 遺伝子の働きが重要であることが示唆された。

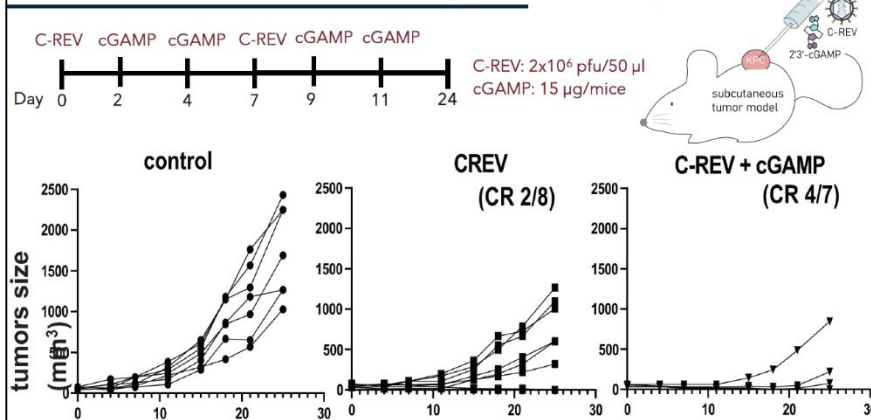


また、cGAMP による STING 経路活性化の有無にかかわらず、C-REV による殺細胞効果に差は見られなかった。

そこで、KPC 細胞を用いて免疫野生型のマウスの皮下に腫瘍を形成させ、そこに C-REV もしくは C-REV + cGAMP を腫瘍内投与し、腫瘍の増殖を測定した。併用

治療により、腫瘍の完全退縮が 7 例中 4 例見られ、強い抗腫瘍効果を示した。

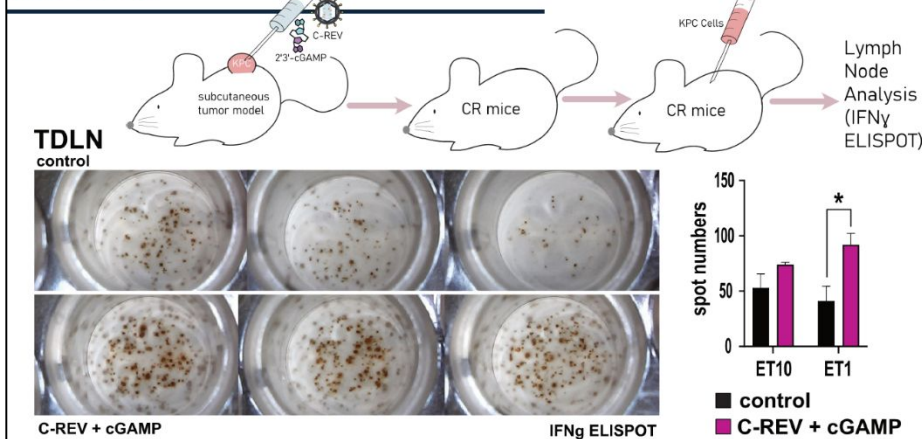
More combination therapy-treated mice eradicated KPC tumors than mice treated with either single mono-therapies



そこで、完全退縮を示した併用群マウスを 3 か月後に用いて、KPC 細胞をもう一度皮内に注射後 2 日で、リンパ節を採取、リンパ球を調製後、KPC 細胞

と in vitro で 24 時間培養後、IFN γ -ELISPOT assay を行った。このことから、併用群マウスは、KPC 細胞を認識する免疫細胞を多く保持していることが示された。

Combination therapy drastically increased tumor-specific CD8 T cells



これらの結果は、STING アゴニストと腫瘍溶解性ウイルスの併用療法の可能性を示唆し、腫瘍溶解性ウイルスによる免疫反応をいかに増強するかの手掛かりとなる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Eissa I.R., Mukoyama N., Abdelmoneim, M., Naoe, Y., Matsumura, S., Bustos-Villalobos I., Ichinose T., Miyajima N., Morimoto D., Tanaka M., Fujimoto, Y., Kodera Y., Kasuya H.	4. 巻 1
2. 論文標題 Oncolytic herpes simplex virus HF10 (canerpaturev, C-REV) promotes accumulation of CD8+PD-1-tumor-infiltrating T cells in PD-L1 enriched tumor microenvironment.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Cancer	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33550.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Eissa IR, Bustos-Villalobos I, Ichinose T, Matsumura S, Naoe Y, Miyajima N, Morimoto D, Mukoyama N, Zhiwen W, Tanaka M, Hasegawa H, Sumigama S, Aleksic B, Kodera Y, Kasuya H.	4. 巻 10
2. 論文標題 The Current Status and Future Prospects of Oncolytic Viruses in Clinical Trials against Melanoma, Glioma, Pancreatic, and Breast Cancers.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers10100356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Daishi Morimoto, Shigeru Matsumura, Itzel Bustos-Villalobos, Patricia Angela Sibal, Toru Ichinose, Yoshinori Naoe, Ibrahim Ragab Eissa, ohamed Abdelmoneim, Nobuaki Mukoyama, Noriyuki Miyajima, Maki Tanaka, Yasuhiro Kodera and Hideki Kasuya	4. 巻 10
2. 論文標題 C-REV Retains High Infectivity Regardless of the Expression Levels of cGAS and STING in Cultured Pancreatic Cancer Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10061502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 1.Sibal P.A.#, Matsumura S.#, Ichinose T., Bustos-Villalobos I., Morimoto D., Eissa I.R., Abdelmoneim M., Aboalela M.A., Mukoyama N., Tanaka M., Naoe Y., Kasuya H.	4. 巻 1
2. 論文標題 STING Activator 2'3'-cGAMP Enhances HSV1-based Oncolytic Viral Therapy.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Mol. Oncology	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.13603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shigeru Matsumura, Zhiwen Wu, Toru Ichinose, Yoshinori Naoe, Itzel Bustos Villalobos, Ibrahim Ragab Eissa, Suguru Yamada, Yasuhiro Kodera, Maki Tanaka, and Hideki Kasuya
2. 発表標題 大腸癌モデルにおけるセツキシマブとC-REVとの併用治療効果について
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigeru Matsumura, Zhiwen Wu, Toru Ichinose, Yoshinori Naoe, Itzel Bustos Villalobos, Ibrahim Ragab Eissa, Suguru Yamada, Yasuhiro Kodera, Maki Tanaka, and Hideki Kasuya
2. 発表標題 Combination of cetuximab and oncolytic virus canepaturev synergistically inhibits human colorectal cancer growth
3. 学会等名 癌免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigeru Matsumura, Zhiwen Wu, Toru Ichinose, Yoshinori Naoe, Itzel Bustos Villalobos, Ibrahim Ragab Eissa, Suguru Yamada, Yasuhiro Kodera, Maki Tanaka, and Hideki Kasuya
2. 発表標題 Combination therapy of Cetuximab and CANERPATUREV suppresses human colorectal cancer growth
3. 学会等名 日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsumura S, Morimoto D, Naoe Y, Ichinose T, Eissa IR, Tanaka M, Kodera Y, Kasuya H
2. 発表標題 STING is dispensable for low susceptibility to C-REV (HF10) in pancreatic cancer cell lines
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsumura S, Morimoto D, Naoe Y, Ichinose T, Eissa IR, Tanaka M, Kodera Y, Kasuya H
2. 発表標題 STING is dispensable for low susceptibility to C-REV (HF10) in pancreatic cancer cell lines
3. 学会等名 4th Annual Oncolytic virotherapy summit
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柏谷 英樹 (Kasuya Hideki) (00402636)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	直江 吉則 (Naoe Yoshinori) (50392048)	名古屋大学・医学系研究科・特任准教授 (13901)	
研究分担者	一ノ瀬 亨 (Ichinose Ryo) (60778091)	名古屋大学・医学系研究科・研究員 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------