

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591973

研究課題名(和文)ケモカインCCL21と腫瘍溶解アデノウイルスを用いた新しい癌ワクチン療法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel cancer vaccine using chemokine CCL21 and oncolytic adenovirus

研究代表者

山野 智基 (Yamano, Tomoki)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：00599318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍溶解ウイルス感染細胞を癌抗原とするワクチン研究を行った。ウイルス感染10時間ではウイルス感染細胞(CT26：1万個)は全て腫瘍を形成したが、24時間では腫瘍を形成しなかった。CT26再接種で50%のマウスが腫瘍を拒絶、ウイルス未感染のCT26でも25%で腫瘍を拒絶した。次に細胞数10万個、ワクチン回数2回、CCL21併用で検討した。ウイルス未感染細胞では100%腫瘍が出来たが、MOI1000ウイルス感染細胞では23%に腫瘍を形成する一方、31%で腫瘍が拒絶された。これはCCL21での17%より高かった。これらの結果からMOI1000ウイルス感染細胞は癌抗原を発現していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We considered cancer vaccine using cancer cells infected with oncolytic virus as cancer antigen. At first, we assessed the duration of oncolytic virus infection with 104 mouse rectal cancer cells, CT26. The infection time of 24h, not 10h of oncolytic virus with MOI1000 was sufficient for complete inhibition of tumor growth when 104 of untreated CT26 cells were subsequently inoculated. 50% of mice vaccinated by CT26 cells infected with MOI1000 of oncolytic virus rejected subsequently inoculated CT26 cells, although 25% of mice without vaccination rejected subsequently inoculated CT26 cells. When 105 of CT26 cells were used for vaccination, 31% of mice vaccinated by CT26 cells infected with MOI1000 of oncolytic virus or 17% of mice vaccinated by CCL21 protein rejected subsequently inoculated CT26, respectively. All the mice without vaccination bore tumors. These results indicate CT26 cells infected with oncolytic virus are immunogenic to induce immune response to against CT26 cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：癌ワクチン 腫瘍溶解ウイルス

1. 研究開始当初の背景

腫瘍溶解ウイルスを用いた遺伝子治療は、腫瘍細胞特異的に増殖し腫瘍細胞を次々と溶解するという素晴らしい発想で、臨床応用が非常に期待されていた。しかし実施された臨床試験では、安全性は確認されたものの十分な治療効果は得られなかった。これは人体においてはウイルスに対する高度な防御システムにより癌細胞における感染、増殖が阻止されることが大きい。

一方、癌ワクチンにおいては腫瘍細胞全てに遺伝子導入をする必要は無く、遺伝子導入効率は必ずしも高い必要は無い。ウイルス感染細胞による癌関連抗原提示は免疫反応を強く誘導する可能性があることから、腫瘍溶解アデノウイルスを腫瘍免疫の増強に用いる癌ワクチン療法は新しい治療法として非常に期待出来ると考えられた。更にウイルスを用いた遺伝子治療に GM-CSF, IL-12 などのサイトカインを併用することで抗腫瘍効果が増強することが示されており、ケモカイン CCL21 が CCR7 を発現する成熟樹状細胞、ナイーブ T 細胞を誘導するケモカインであることからアジュバントとして用いることでワクチン効果が増強出来ると考えた。

2. 研究の目的

ケモカイン CCL21 をアジュバントとして用い、腫瘍溶解アデノウイルスに感染した癌細胞を癌ワクチンの抗原と考える新しい癌ワクチン療法の開発。

3. 研究の方法

(1) in vitro

腫瘍溶解アデノウイルスのマウス大腸癌細胞 CT26, CMT93 に対する in vitro での細胞傷害活性をクリスタルバイオレット法及びアラマーブルー法を用いて評価。また本ウイルスベクターには、GFP 発現遺伝子が挿入されており、これを用いてウイルス感染効率と伝播効率も評価。

(2) in vivo 実験

マウス CMT93 細胞は1千万個を皮下投与しても BL6 マウスに皮下腫瘍を形成しなかったため、in vitro の実験結果では、腫瘍溶解アデノウイルスで同様の抗腫瘍効果が見られた CT26 細胞を動物実験で用いた。CT26 細胞に腫瘍溶解アデノウイルスを感染させた細胞を抗原と考え、マウスに皮下投与した。アジュバントとしてマウス CCL21 組み換え蛋白を 0.5µg をワクチン1日前にワクチン予定部位に投与し、ウイルス感染は MOI を 0, 10, 100, 1000 で比較した。細胞数は1万個/10万個、ワクチン回数は1回/2回で検討した。ワクチン終了1-2週間後にワクチン部位と反対側(背部)にワクチン時と同数の CT26 細胞(未処理)を接種し、腫瘍形成の有無を確認した。

4. 研究成果

まずマウス大腸癌細胞 CT26, CMT93 に対する抗腫瘍効果を in vitro で検討した。MOI (Multiplicity of infection) 100, MOI 1000 で細胞にウイルスを感染させると、7日後には増殖型のウイルスでは MOI が 100~1000 で強い増殖抑制作用を示したが、非増殖型のウイルスでは増殖抑制作用は認めなかった。またヒト正常細胞に対しては細胞傷害性が見られなかった。

881: 腫瘍溶解アデノウイルス(本研究動物実験で使用)

883: 腫瘍溶解アデノウイルス(ファイバー改変型)

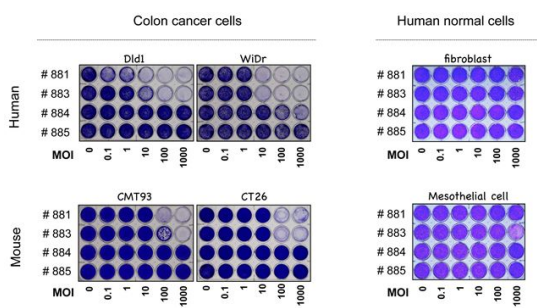
884: 非増殖型アデノウイルス

885: 非増殖型アデノウイルス(ファイバー改変型)

細胞実験で MOI が 100 以上でないと細胞傷害性が十分得られなかったため(ウイルスがヒトを宿主とするため、ヒト細胞には感染するがマウスには感染し難いため)、マウスに腫瘍形成させてから腫瘍溶解アデノウイルスを投与しても抗腫瘍効果が低いことが予想された。

Oncolytic Efficiency of Adenoviral Vectors

Crystal Violet Stain 7 days post-infection



そのため腫瘍溶解アデノウイルスを *in vitro* で十分に感染させたCT26細胞をマウス皮下に接種し、抗腫瘍効果が誘導出来るか検討した。ウイルス感染 10 時間で、CT26 を 1 万個皮下接種すると MOI 10, MOI 100, MOI 1000 全てで MOI ゼロ (ウイルス感染なし) と同様に腫瘍が生着した。ウイルス感染時間を 24 時間にすると CT26 を 1 万個皮下接種しても MOI 1000 では皮下腫瘍が出来なかった (0/8, MOI ゼロでも 25%(2/8)が皮下腫瘍出来ず)。

抗腫瘍免疫を確認するために再度 CT26 を 1 万個皮下接種すると 50%のマウスで腫瘍生着が拒絶されたが、MOI ゼロで最初に腫瘍が出来なかった 2 匹とも腫瘍生着が拒絶された。抗腫瘍免疫の増強を期待して CT26 を 10 万個に増量し、CCL21 と併用、ワクチンは 2 回行い、その後 CT26 を再度接種し抗腫瘍免疫を検討した。その結果 CT26 のみを接種した場合は全てのマウスで腫瘍が生着 (12/12) した。CCL21 のみでワクチンした場合、CCL21-MOI ゼロでワクチンした場合はどちらも 17% (1/6)に腫瘍が生着しなかった。MOI 1000 でワクチンした場合は単独で 33%(2/6)、CCL21 との併用(CCL21-MOI 1000)では 29%(2/7)に腫瘍が生着しなかった。ワクチン段階で腫瘍が出来なかったもので、その後の腫瘍細胞の再チャレンジで腫瘍が出来なかったものは CCL21 単独, CCL21-MOI ゼロで 100%(それぞれ 1/1)、MOI 1000, CCL21-MOI 1000 で 40%(それぞれ 2/5)であり MOI 1000 のウイルス感染 CT26 細胞は必ずしも十分な抗原として働い

ておらず、更なるワクチン療法の改良 (ウイルス感染時に、Immunogenic cell death を誘導する薬剤の併用など)が必要と考えられた。

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 2 件)

Takagi-Kimura Misato, Yamano Tomoki, Tagawa Masatoshi, Kubo Shuji.

Oncolytic virotherapy for osteosarcoma using midkine promoter-regulated adenoviruses. Cancer gene therapy 2014;21(3):126-32 (査読あり)

Takagi-Kimura Misato, Yamano Tomoki, Tamamoto Atsuko, Okamura Nobutaka, Okamura Haruki, Hashimoto-Tamaoki Tomoko, Tagawa Masatoshi, Kasahara Noriyuki, Kubo Shuji. Enhanced antitumor efficacy of fiber-modified, midkine promoter-regulated oncolytic adenovirus in human malignant mesothelioma. Cancer science 2013;104(11):1433-9 (査読あり)

[学会発表](計 3 件)

山野智基, 久保秀司, 矢野綾, 松原長秀, 山本英幸, 岡村春樹, 冨田尚裕: 「ケモカイン CCL21 と腫瘍溶解アデノウイルスを用いた新しい癌ワクチン療法の開発」、日本癌治療学会、2014 年 8 月 29 日(発表確定)、横浜

久保 秀司、木村 美智、玉本 敦子、山野智基、玉置 知子、笠原 典之、田川 雅敏. 二重制御型アデノウイルスを用いた骨肉腫に対する腫瘍溶解療法の開発. (一般) 日本人類遺伝学会第 58 回大会 2013.11 仙台

Kubo Shuji, Takagi-Kimura Misato,
Yamano Tomoki, Yoshikawa Yoshie, Emi
Mitsuru, Tagawa Masatoshi, Kasahara
Noriyuki, Hashimoto-Tamaoki Tomoko.
Dual targeted adenovirus for oncolytic
virotherapy in experimental human
osteosarcoma. (General Lecture) 第 72
回 日本癌学会学術総会 2013.10
Yokohama

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山野 智基 (YAMANO, Tomoki)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：00599318

(2) 研究分担者

久保 秀司 (KUBO, Shuji)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10441320
富田 尚裕 (TOMITA, Naohiro)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：00252643

大山 秀樹 (OHYAMA, Hideki)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90280685