

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10328

研究課題名(和文)単純ヘルペスウイルスベクター(G47)を用いた抗腫瘍免疫増強法の確立

研究課題名(英文)Enhanced antitumor efficacy of oncolytic HSV1, G47delta

研究代表者

田中 実(Tanaka, Minoru)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：50332581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス療法では、がん治療用ウイルスの直接的な殺細胞効果によりがんが駆逐される。口唇ヘルペスの原因である単純ヘルペスウイルス1型の第3世代がん治療用ウイルスであるG47の臨床試験から得られたデータをもとに、G47が惹起する抗腫瘍免疫効果を増強する新たな治療法の開発を目指した。50項目以上のサイトカインについて検討し、G47投与後に主にNK細胞が放出するIFN- $\gamma$ や樹状細胞が放出するIL-12が上昇し、Th1活性化が誘導され、抗腫瘍免疫が誘導されることが確認された。ウイルス療法は、今後のがん治療において標準的な治療法として確立されるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：The viral therapy is a new treatment of enhanced tumor-selective viral replication and cell killing. G47 is a third-generation oncolytic herpes simplex virus type 1 (HSV-1) that has triple mutations created in the HSV-1 genome. G47 can actually induce systemic antitumor immunity by activating natural killer cells and Th1 cells. We believe G47 will become a standard treatment for malignant tumors.

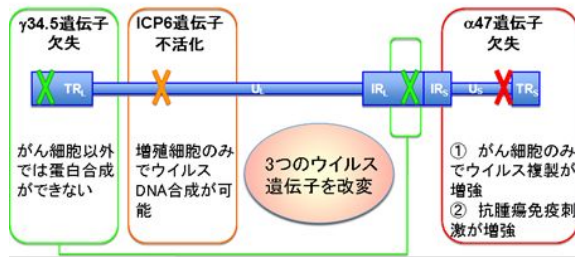
研究分野：悪性脳腫瘍

キーワード：ウイルス療法 がん治療用ウイルス 口唇ヘルペス G47 抗腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

我々が開発した第3世代がん治療用ウイルス(G47)は、単純ヘルペス1型(herpes simplex virus-1:HSV-1)第2世代がん治療用ウイルスであるG207の改良型で、3つの遺伝子に変異が加えられている。G47は、G207の安全性を維持しつつ、がん細胞におけるウイルス複製能を高め、さらに抗腫瘍免疫を増強するように開発された増殖型がん治療用ウイルスである(図1)。

図1 G47ΔのDNA構造と三重変異



効果的な抗腫瘍効果を得るためには、ウイルスが腫瘍細胞へ侵入することが必要で、ウイルスは腫瘍細胞内で増殖し、その過程で腫瘍細胞を破壊する直接的殺細胞効果に加えて、抗腫瘍免疫を獲得することで遠隔腫瘍に対しても効果を発揮することが重要である。G47が腫瘍細胞内で増殖して細胞膜が破壊されるとウイルスタンパクおよび腫瘍特異抗原が周囲に露出し、これらはマクロファージや樹状細胞の抗原提示細胞に取り込まれプロセッシングを受けて断片化し、細胞傷害性T細胞(Cytotoxic T cell: CTL)の受容体(TCR)に提示され、その際CD28を介するコストミュレーション(共刺激)により不応答性(アナジー)の誘導が回避され、ヘルパーT細胞(helper T cell: Th)エピソード(10-20アミノ酸)はMHCクラスII分子と結合しヘルパーT細胞のTCRに提示される。ヘルパーT細胞はサイトカインの特性により異なる機能をもつ亜集団に分化する。1型ヘルパーT細胞(Th1)は微生物によって誘導され、マクロファージなどの貪食細胞を活性化し、細胞性免疫を誘導する。2型ヘルパーT細胞(Th2)はカビやダニなどのアレルゲンに反応し、B細胞を活性化させて抗体を産生させている。1型ヘルパーT細胞(Th1)を活性化するIL-12やIFN- $\gamma$ が分泌されると、2型ヘルパーT細胞(Th2)を活性化するサイトカインであるIL-4やIL-10などは抑制される。T細胞活性化にはCD80やCD86などの補助刺激分子の発現を誘導するToll様受容体(Toll-like receptor: TLR)が必要であり、ヘルペスウイルスのタンパクはToll様受容体(TLR9)として働きIL-12やIFN- $\gamma$ を誘導して1型ヘルパーT細胞(Th1)の活性化に寄与する。抗原刺激と補助刺激の双方がそろって初めてT細胞は活性化され獲得免疫応答が誘導される。しかし、こうした腫瘍特異抗原の刺激により現れる免疫応答

はやがて時間の経過とともに収束していく。

2. 研究の目的

膠芽腫は、最も悪性な脳腫瘍であり、手術・放射線治療・化学療法など従来の治療法では根治が得られない。ウイルス療法は直接的な殺腫瘍細胞効果のみならず、抗腫瘍免疫を惹起して遠隔にある腫瘍にも抗腫瘍効果を期待でき、副作用も少ないことから新たながん治療法として期待されている。G47は、すでに国内で膠芽腫に対する臨床試験(医師主導治験)が進行中である。G47の直接的な殺腫瘍細胞効果は全例に確実に認められる一方、抗腫瘍免疫効果の程度は症例毎に異なる。そこで、本研究では、臨床試験ですでに抗腫瘍免疫の効果が検討された症例の血液および病理組織検体を用いて、各々の症例の経時的な抗腫瘍免疫反応を検証し、G47の免疫反応の関連分子の機構を解明し、抗腫瘍免疫効果をさらに増強させる方法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

進行性膠芽腫患者に対する増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスG47を用いたウイルス療法の臨床研究では定位脳手術により腫瘍内に直接G47を投与し、定期的にMRI画像や採血を行っている。本研究では研究用サンプルを採取することに同意取得した後、経時的に採血して得られた検体から白血球数、分画のほか、CD4/CD8、IL-1b、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-17、IL-21、IL-23p19、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ など50種以上のサイトカインをCytometric Bead Array(CBA)(図2)で解析し、サイトカイン相互作用ネットワークを検討した。また、共分散構造解析などの手法を用いてG47が惹起する抗腫瘍免疫の効果をさらに増強する新たな治療法の開発を目指した。さらに病理検体を用いてCD4、CD8、CD3、CD57等の免疫染色を行い、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を構成する各陽性細胞の経時的な変化を検討した。免疫応答の抑制を司る抑制性T細胞(regulatory T cell:Treg)についても検討した。

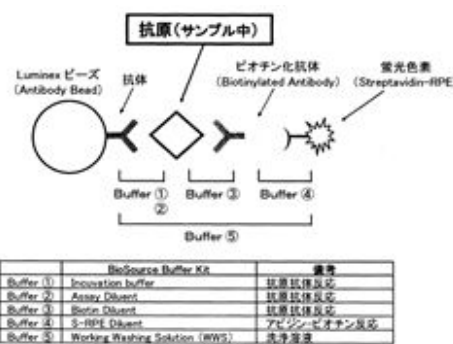
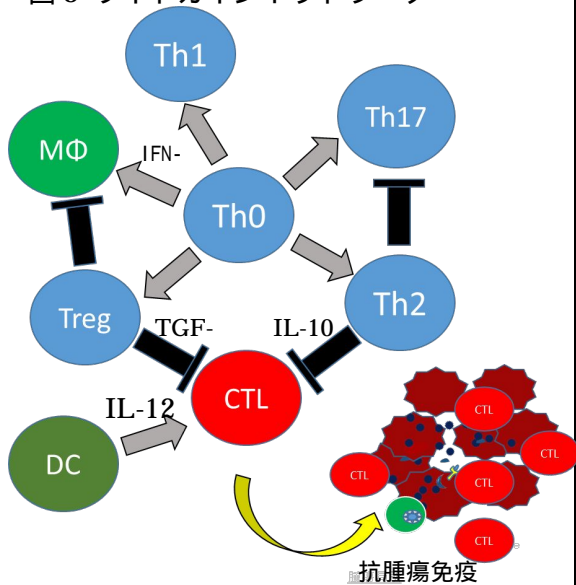


図2 サイトカインキット原理図

#### 4. 研究成果

抗腫瘍免疫については、G47 投与後に主にナチュラルキラー細胞 (natural killer cell: NK 細胞) が放出する IFN- $\gamma$  や樹状細胞が放出する IL-12 が上昇し、1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) 活性化が誘導されるが、IL-4、IL-6 は上昇せず 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) は抑制されていることが確認され、組織学的にも G47 の投与後に腫瘍浸潤リンパ球が増加し、CD4 陽性細胞や CD8 陽性細胞の構成が経時的に変化していくことも確認された。つぎに免疫応答を抑制する制御性 T 細胞 (Treg) の誘導を検討した (図 3)。制御性 T 細胞の発生・分化、機能を制御する転写因子である Foxp3 の免疫染色を行った。Foxp3 陽性細胞は存在したが、Foxp3 のみでは誘導性制御性 T 細胞細胞の同定は困難であった。しかし、G47 投与による抗腫瘍免疫の惹起の後に抑制性 T 細胞が活性化される可能性は示唆されたため、今後ウイルス療法後に免疫チェックポイント阻害剤を併用することでウイルス療法の抗腫瘍効果がさらに増強され、治療効果が向上する可能性がある。

図 3 サイトカインネットワーク



Th1 は抗腫瘍免疫惹起に寄与するが、Th1 は抑制的に働く。G47 では Th1 が活性化され、IFN- $\gamma$ 、IL-12 の活性化が確認されている。

#### 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 6 件)

Nakatomi H, Miyazaki H, Tanaka M, Kin T, Yoshino M, Oyama H, Usui M, Moriyama H, Kojima H, Kaga K, Saito N. Improving functional preservation in acoustic neuroma surgery. Clinical article

J Neurosurg; 122(1): 24-33, 2015 査読有  
DOI: 10.3171/2014.8.JNS132525

Nakatomi H, Jacob JT, Carlson ML, Tanaka S, Tanaka M, Saito N. Long-term risk of recurrence and regrowth after gross total and subtotal resection of sporadic vestibular schwannoma. J Neurosurg 2017 査読有 DOI: 10.3171/2016.11.JNS16498

田中実、藤堂具紀: G47 を用いた悪性グリオーマのウイルス療法。脳神経外科ジャーナル 25 (12): 973-978, 2016. 査読有

田中実、藤堂具紀: ウイルス療法。In 三国信啓 (編): 脳神経外科診療プラクティス: グリオーマ治療の Decision Making. 東京、文光堂、2016, pp.239-241. 査読なし

田中実、藤堂具紀: ウイルス療法。日本臨床 74 (増刊号 7「脳腫瘍学 基礎研究と臨床研究の進歩」): 780-784, 2016. 査読なし

田中実、岩井美和子、藤堂具紀: がんのウイルス療法。実験医学 34 (12): 2052-2055, 2016. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

田中 実、再発膠芽腫に対する Extended field stereotactic radiosurgery の有効性の検討 第 33 回日本脳腫瘍学会 2015 年

田中 実、抗がんウイルス G47 を用いた膠芽腫の第 2 相試験 第 34 回日本脳腫瘍学会 2016 年

田中 実、膠芽腫を対象とした抗がんウイルス G47 の第 II 相試験 第 35 回日本脳腫瘍学会 2017 年

〔図書〕(計 1 件)

田中 実、藤堂 具紀: ウイルス療法 日本脳神経外科学会・日本病理学会編 臨床・病理 脳腫瘍取扱い規約 第 4 版 東京、金原出版 2018, pp 182-185 査読なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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〕

東京大学医科学研究所  
<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/>

東京大学医科学研究所附属病院 脳腫瘍外科  
<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/glioma/>

東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 先端がん治療分野  
<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/cancer/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 実 (Tanaka, Minoru)  
東京大学・医科学研究所・特任准教授  
研究者番号：50332581

(2) 研究分担者

藤堂 具紀 (Todo, Tomoki)  
東京大学・医科学研究所・教授  
研究者番号：80272566

稲生 靖 (Ino, Yasushi)  
東京大学・医科学研究所・准教授  
研究者番号：50372371

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )