

令和元年6月5日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19893

研究課題名(和文)腫瘍選択的融解アデノウイルス製剤と免疫チェックポイント阻害剤との併用効果の検討

研究課題名(英文)Combination of telomerase-specific oncolytic adenovirus and immune checkpoint inhibitor

研究代表者

黒田 新士(Kuroda, Shinji)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：60633758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：現在臨床応用を目指して開発中のテロメラーゼ特異的腫瘍融解アデノウイルスは、マウス大腸がん細胞株およびマウス膵がん細胞株を用いた実験において、免疫原性細胞死のマーカーであるHMGB1やATPの放出を促すことで、CD8陽性Tリンパ球の腫瘍組織への誘導を促し、宿主の抗腫瘍免疫を増強することが立証された。さらに、免疫チェックポイント阻害剤の抗PD-1抗体との併用において、治療部位のみならず非治療部位に対しても強力な抗腫瘍効果を発揮することが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規治療法である腫瘍融解アデノウイルス療法は、強力に宿主の抗腫瘍免疫を活性化する治療法であり、抗腫瘍免疫のブレーキを解除することで治療効果を発揮する抗PD-1抗体などの免疫チェックポイント阻害剤との併用は理想的な治療戦略である。腫瘍に対するウイルスの局所治療が全身性の抗腫瘍免疫を活性化することから、遠隔転移部における抗腫瘍効果の増強にもつながり、さらなる治療成績の改善が期待される。

研究成果の概要(英文)：Telomerase-specific oncolytic adenovirus facilitated CD8-positive cytotoxic T lymphocytes recruitment into tumor tissues through immunogenic cell death induction after intratumoral administration, leading to activation of systemic antitumor immune responses. Combination therapy with PD-1 Ab created synergistic antitumor effects that even led to tumor eradication. These findings support the contention that novel therapeutic strategies employing oncolytic virotherapy are ideal partners for immune checkpoint inhibitors and that this combination can yield improved clinical benefits for patients with advanced tumors with distant metastases.

研究分野：消化器外科

キーワード：腫瘍融解アデノウイルス 抗PD-1抗体 免疫チェックポイント阻害剤 複合免疫療法 免疫原性細胞死

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アデノウイルスやヘルペスウイルスなどを用いたウイルス療法はがんに対する有望な新規治療法のひとつとして、世界中でその研究・開発が進められている。腫瘍細胞内でのみ特異的に増殖するようにウイルス遺伝子が組み換えられており、細胞融解という独特のメカニズムで細胞死を誘導する。

申請者は、腫瘍内で特異的に活性の高いヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) のプロモーターにより増殖が制御される腫瘍選択的融解アデノウイルス製剤 (テロメライシン) を開発し、近年米国にて各種固形腫瘍に対する第 Ⅲ 相臨床試験を終え、その人体における安全性と体内動態を確認した。また国内では、申請者が行ったテロメライシンと放射線との併用効果の研究結果に基づいて、岡山大学において頭頸部・胸部悪性腫瘍に対する放射線との併用による臨床研究が施行中であり、テロメライシンは臨床応用に向けた開発段階にある薬剤である。

がん免疫療法は以前より研究が行われてきた分野ではあるが、下記に示す免疫チェックポイント阻害剤の成功により、2013 年に Science 誌が発表する「Breakthrough of the year」(その年の最も発展的な研究に与えられる賞) にも選ばれ、近年一躍脚光を浴びるようになってきた。がん免疫療法の戦略は大きく 2 つに分けることができ、免疫活性反応の活性化にはがんワクチン療法や養子免疫療法などが、免疫抑制反応の抑制化には上述の免疫チェックポイント阻害が含まれる。

ヒトには元来、過剰な免疫反応から正常組織への障害を押さえる免疫チェックポイント機構が備わっているが、腫瘍組織ではこれが増強し免疫逃避・免疫疲弊が生じている。現在臨床使用されている、抗 CTLA-4 抗体と抗 PD-1 抗体は免疫チェックポイント阻害剤と呼ばれ、この腫瘍組織で亢進した免疫チェックポイント機構を阻害することでがん免疫の活性化を期待したものであり、臨床試験では大幅な生存期間の延長をもたらすことが示された。

抗 PD-1 抗体 (nivolumab) は、2014 年に悪性黒色腫に対し世界に先駆けて初めて本邦において認可された薬剤である。2015 年現在、非小細胞肺癌に対し承認申請中であるが、他の癌腫に対する臨床試験でも良好な結果が報告されてきており、今後もその適応拡大が期待される薬剤である。

複数のがん病巣のうちのひとつに放射線照射すると、照射していない領域のがんも縮小する効果が見られることがあり、これはアブスコパル効果と呼ばれている。これには免疫の関与が示唆されており、近年抗 PD-1 抗体によるアブスコパル効果の増強も報告されている。

2. 研究の目的

テロメライシンは、投与方法に関して現時点では腫瘍への局所投与に限られているが、局所においては強力な腫瘍融解による抗腫瘍効果を引き起こすことが可能である。それに伴うがん抗原の放出や danger signal 放出による INF- γ 、IL-12 の誘導により、全身における免疫活性反応の活性化を引き起こし、転移部位における治療効果 (abscopal effect に似た作用) を期待できる。そこに免疫抑制反応の抑制化を生み出す免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-1 抗体との併用により、相乗的な抗腫瘍効果を期待できるのではないかとという着想に至った。

本研究では、申請者が臨床応用に向けて開発中の腫瘍選択的融解アデノウイルス製剤であるテロメライシンと、近年本邦において認可された免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-1 抗体との併用効果に関して、マウス・ヒトのがん細胞株およびヒトの腫瘍組織を用いて解析を行い、その有効性と有望性を検討する。

3. 研究の方法

ヒトの組織を用いた研究

- ・食道癌・胃癌切除組織における PD-L1 発現と臨床病理学的特徴の検討
- ・食道癌生検組織におけるテロメライシンのがん微小環境への影響の検討

マウスがん細胞を用いた研究 (主に in vivo)

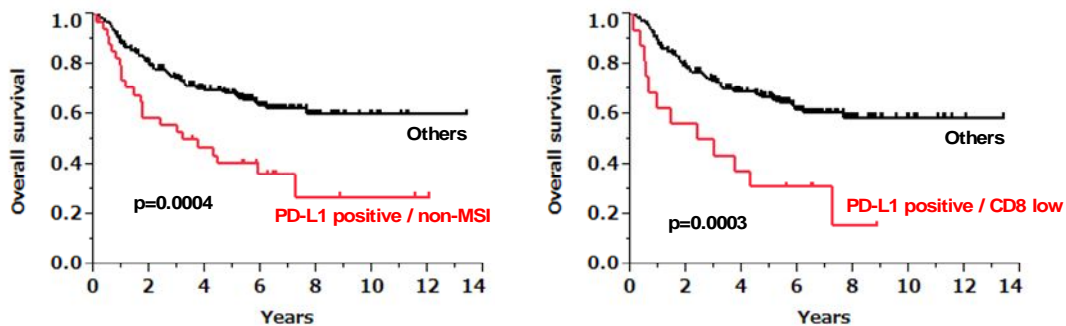
- ・マウス用テロメライシンとマウス用抗 PD-1 抗体の併用効果とがん微小環境への影響の検討
- 本研究においては、マウス用テロメライシンとして、マウス癌細胞株に感染性の高いペプチド改変ファイバーを搭載した腫瘍融解アデノウイルス (OBP-502) を用いた。また、細胞株は、CT26 (BALB/c マウス由来大腸癌細胞株) と Pan02 (C57BL/6 マウス由来膵癌細胞株) を用いた。

4. 研究成果

(1) ヒト食道癌・胃癌組織 (手術標本) における PD-L1 発現と臨床病理学的特徴の検討

255 例の胃癌手術標本において PD-L1 発現を免疫組織化学染色にて評価したところ、陽性は 37 例 (15%) であった。臨床病理学的因子との検討において、PD-L1 陽性は進行度が高くまた浸潤傾向の強い症例に有意に多く認められ、組織型では分化型癌に多く認められる傾向にあった。生存分析では、PD-L1 陽性群は陰性群と比較し有意に予後不良で、多変量解析においても、PD-L1 陽性は独立した予後不良因子であった。また、PD-L1 に MSI または CD8 陽性 T リンパ球の因子を組み合わせることでより有用な予後予測因子となることを立証した (下図)。また、再発形式

に関する検討において、PD-L1 陽性群では腹膜播種再発が有意に少なく、血行性転移再発が多い傾向にあった。腹膜播種再発を来した 25 例のうち 3 例において再発時の播種結節の組織学的検討が可能であったが、この 3 例ではいずれも初回手術の原発巣と再発時の腹膜播種巣ともに PD-L1 陰性であった。多変量解析では、PD-L1 発現が腹膜播種再発の独立した予測因子であることが示された。



(2) . ヒト食道癌組織におけるテロメライシン投与のがん微小環境に及ぼす影響の検討

岡山大学で現在進行中の臨床研究（テロメライシンと放射線との併用）において、治療前後に採取された生検組織における CD8 リンパ球の発現を免疫組織化学染色にて確認したが、治療前後で大きな差異を認めなかった。2 症例のみの検討であることや採取部位が治療前後で異なることなどから、結論を得るためには更なる検討が必要と考えられた。

(3) . マウスがん細胞株における PD-L1 発現レベルの検討

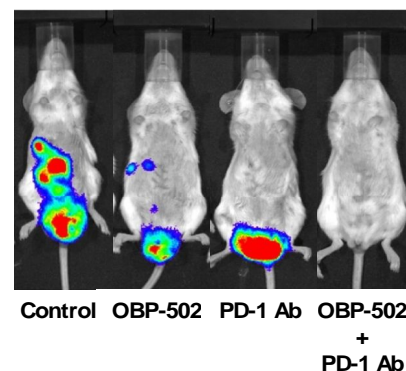
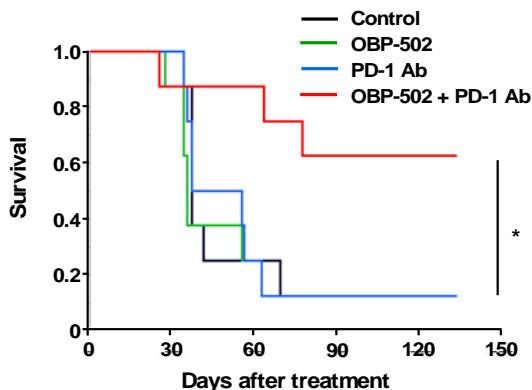
CT26 と Pan02 における PD-L1 発現を FACS にて検討し、両細胞株ともに PD-L1 陽性であることを確認した。

(4) . マウスがん細胞株を用いた皮下移植腫瘍モデルにおける治療効果とがん微小環境への影響

CT26 と Pan02 のマウス背部皮下腫瘍モデルにおいて、OBP-502 の腫瘍内投与は腫瘍組織への CD8 陽性リンパ球の浸潤を促し、抗 PD-1 抗体との併用においてはコントロール治療群に比し有意な抗腫瘍効果を発揮し、33% (4/12) のマウスにおいて腫瘍消失を認めた。腫瘍消失を認めた 4 匹のマウスに再度腫瘍の皮下投与を試みたが、50% (2/4) のマウスには生着せず獲得免疫による抗腫瘍効果の持続が確認された。また、CT26 の両側背部皮下腫瘍モデルを作成し、OBP-502 を片側の腫瘍にのみ投与を行ったところ、治療側のみならず非治療側の腫瘍の増殖も有意に抑制され、アブスコパル効果が確認された。このアブスコパル効果はヌードマウスでは消失しており、OBP-502 の局所投与が宿主の腫瘍免疫の増強につながっていることが確認された。

(5) . 転移を有するマウス同所性移植腫瘍モデルにおける治療効果とがん微小環境への影響

ルシフェラーゼを遺伝子導入した CT26 細胞株 (CT26-Luc) を、BALB/c マウスの直腸粘膜下に移植し、またその 2 日目に CT26-Luc を門脈内投与し、肝転移を有する直腸癌同所性モデルを作成した。マウスを 4 群 (PBS, OBP-502 腫瘍内投与, 抗 PD-1 全身投与, 併用) に分け、1 週間に 1 回ずつを計 3 回ずつ治療を行い、経時的に直腸癌と肝転移の腫瘍量を IVIS にて測定したところ、他群と比較して併用群において有意に腫瘍量が少なく、また生存率も有意に改善した(下図)。



(6) . テロメライシンと抗 PD-1 抗体の併用効果のメカニズム解明

in vitro において、CT26 および PAN02 を OBP-502 で治療したところ、Western blot および FACS にて PD-L1 発現が増強していることが確認され、このことが抗 PD-1 抗体との併用効果のメカニズムの一つと考えられた。研究期間全体を通して、テロメラーゼ特異的腫瘍融解アデノウイルス製剤は宿主の抗腫瘍免疫を活性化し、抗 PD-1 抗体との併用において有意な抗腫瘍効果を発揮することを証明した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Morihiro T, Kuroda S, Kanaya N, Kakiuchi Y, Kubota T, Aoyama K, Tanaka T, Kikuchi S, Nagasaka T, Nishizaki M, Kagawa S, Tazawa H, Fujiwara T. PD-L1 expression combined with microsatellite instability/CD8+ tumor infiltrating lymphocytes as a useful prognostic biomarker in gastric cancer. *Sci Rep.* 2019 Mar 15;9(1):4633. doi: 10.1038/s41598-019-41177-2. 査読あり

〔学会発表〕(計 11 件)

金谷信彦、黒田新士 他 . 腫瘍内リンパ球浸潤を誘導するテロメライシンと抗 PD-1 抗体を用いた新規複合免疫療法の開発 . 第 31 回日本バイオセラピー学会学術集会 . 2018 年

Nobuhiko Kanaya, Shinji Kuroda et al. Telomelysin as an immunotherapy agent sensitizing gastrointestinal tumors to anti-PD-1 antibody. 第 77 回日本癌学会学術集会. 2018 年

Nobuhiko Kanaya, Shinji Kuroda et al. Immunogenic Telomelysin synergizes with anti-PD-1 antibody in gastrointestinal tumors to anti-PD-1 antibody. 第 22 回日本がん免疫学会総会. 2018 年

Nobuhiko Kanaya, Shinji Kuroda et al. Immunogenic potential of Telomelysin sensitizing gastrointestinal tumors to anti-PD-1 antibody. 第 24 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会 . 2018 年

金谷信彦、黒田新士 他 . テロメラーゼ活性依存的腫瘍融解アデノウイルスと抗 PD-1 抗体による新たな複合免疫療法の開発 . 第 73 回日本消化器外科学会総会 . 2018 年

金谷信彦、黒田新士 他 . 腫瘍選択的融解アデノウイルス療法が腫瘍内リンパ球浸潤を増加させ、抗 PD-1 抗体の感受性を増強させる . 第 39 回癌免疫外科研究会 . 2018 年

Nobuhiko Kanaya, Shinji Kuroda et al. Telomelysin-induced immunogenic cell death synergizes with anti-PD-1 antibody in non-immunogenic gastrointestinal tumors. AACR 2018

金谷信彦、黒田新士 他 . テロメラーゼ依存的腫瘍選択的融解アデノウイルス製剤の免疫原性薬剤としての可能性と抗 PD-1 抗体との併用療法の有用性 . 第 30 回日本バイオセラピー学会学術集会総会 . 2017 年

Nobuhiko Kanaya, Shinji Kuroda et al. Potential of telomerase-specific oncolytic adenovirus as an immunogenic drug producing synergy with anti-PD-1 therapy. 第 76 回日本癌学会学術総会 . 2017 年

Nobuhiko Kanaya, Shinji Kuroda et al. Attractive ability of telomerase-specific oncolytic adenovirus as an immunogenic drug. 第 23 回日本遺伝子細胞治療学会. 2017 年

Toshiaki Morihiro, Shinji Kuroda et al. Combination of PD-L1 expression and microsatellite instability status is a useful and attractive prognostic factor in gastric cancer. AACR 2017

6 . 研究組織

該当なし

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。