

令和 3 年 10 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16907

研究課題名(和文) サイトカインシグナル抑制因子ウイルスとPD-L1抗体との併用療法の開発

研究課題名(英文) Development of combination therapy of cytokine signaling suppressor virus and anti-PD-L1 antibody

研究代表者

一ノ瀬 亨 (Ichinose, Toru)

名古屋大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：60778091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、頭頸部がんの治療成績の向上のためウイルスゲノム中にJak/Stat経路の抑制性制御因子SOCS1を発現するように遺伝子改変した腫瘍溶解性ウイルスHF10と免疫チェックポイント阻害剤の組み合わせによる新規治療法の開発を目的とした。外来遺伝子カセットベクターを構築し、HF10ゲノムとの相同組換えによりSOCS1遺伝子が組み込まれたHF10-SOCS1の作成に成功した。マウス扁平上皮癌SCC7の両側側腹部腫瘍に対するHF10-SOCS1と免疫チェックポイント阻害剤との併用効果を検討したところ、両側の腫瘍に対してHF10より強い抗腫瘍効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、HF10-SOCS1の感染と免疫チェックポイント阻害剤の投与により癌免疫抑制環境が改善され、癌抗原特異的T細胞が腫瘍に強く浸潤し、体内のT細胞の機能も長く維持される事が期待される。本研究によって得られた結果はウイルス療法の新たな展開だけでなく、免疫細胞療法分野にも新しい知見を提供し、外科的切除のみでは治癒不可能な多くの癌患者さんの生命予後に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop new treatments by combining oncolytic virus HF10 that was genetically modified to express the inhibitory regulator SOCS1 of the Jak / Stat pathway in the viral genome and the immune checkpoint inhibitor to improve treatment outcome for head and neck cancer. A foreign gene cassette vector was constructed, and we succeeded in creating HF10-SOCS1 into which the regulatory SOCS1 gene was integrated by homologous recombination with the HF10 genome. We examined the combined effect of HF10-SOCS1 and immune checkpoint inhibitors on bilateral flank tumors of mouse squamous cell carcinoma SCC7 cell line and showed a stronger antitumor effect than HF10 on both tumors.

研究分野：ウイルス学

キーワード：腫瘍溶解性ウイルス 癌 サイトカインシグナル 免疫チェックポイント 頭頸部がん

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

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス HF10 は腫瘍内で増殖し癌細胞を破壊する作用とともに、In situ Vaccination として癌抗原認識を明確化し、免疫提示細胞の働きを賦活化する事で、遠隔転移腫瘍も抑制する(図1)。一方、癌を攻撃する CTL の働きを癌細胞の PD-L1 が減弱する事を阻止する免疫チェックポイント阻害剤は単独でも各種癌腫にその効果が示され、今後はさらに高い効果を示すために併用療法での使用が期待されている。

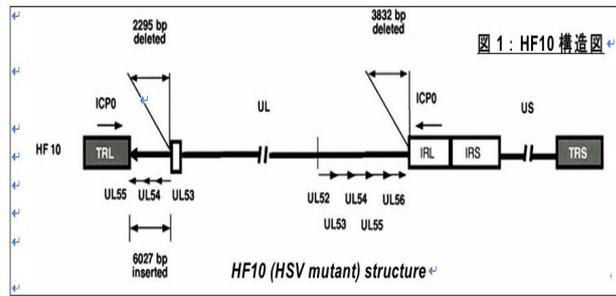


図1: HF10 構造図

SOCS1 は Jak/Stat 経路の負の抑制性制御因子である。咽頭扁平上皮癌の発達過程において、Jak/Stat 経路の SOCS1 の発現が抑制されており、ヒト喉頭癌細胞 Hep-2 を用いた機能解析では SOCS1 の高発現により、STAT3 の発現が抑制され、Hep-2 細胞の増殖、転移、浸潤が阻害されるとの報告がある。そこで、SOCS1 遺伝子を HF10 に導入し、腫瘍に投与することでウイルスに遺伝子導入した SOCS1 を腫瘍内に高発現させ、腫瘍の成長、転移、浸潤を抑制する。さらに、SOCS1 は Jak/Stat 経路の負の制御により IFN ガンマの発現を抑えることから、SOCS1 遺伝子を導入した HF10(HF10-SOCS1)が感染、増殖した腫瘍の微小環境中では IFN ガンマが減少する。これにより、腫瘍細胞における PD-L1 の発現が抑制され、腫瘍に浸潤した抗原特異的 T 細胞の細胞障害活性を失うことなく発揮させるという着想が本研究の根幹となっている。

### 2. 研究の目的

従来の頭頸部がんにおける治療の主体は手術と放射線療法であったが、近年になり化学療法、免疫療法を合わせた集学的治療が行われてきている。本研究は、治療成績の向上のためウイルスゲノム中に SOCS1 を発現するように遺伝子改変した腫瘍溶解性ウイルス HF10 と免疫チェックポイント阻害剤の組み合わせによる新規治療法の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) HF10 ゲノムの UL 遺伝子特定領域はフレームシフト変異のため機能していないことから、この遺伝子座に SOCS1 遺伝子を導入することを計画した。SOCS1 遺伝子は CMV プロモーターにより発現を制御し、IRES を介して蛍光色も発現するようにした。CMV promoter derived 外来遺伝子カセットの両端に各 500 塩基ずつ UL 遺伝子特定領域と同じ塩基配列を配したプラスミドを構築した。

(2) このプラスミドを HF10 ゲノムと共に Vero 細胞にトランスフェクションし、相同組換えにより SOCS1 遺伝子が組み込まれた HF10-SOCS1 を作成した。HF10-SOCS1 から SOCS1 の産生を確認するため、HF10 ならびに HF10-SOCS1 を 1 MOI で Vero 細胞に感染させ、1 日後に細胞を回収し、ウエスタンブロット法にて SOCS1 の産生を測定した。

(3) HF10-SOCS1 感染細胞において、IFN ガンマシグナルが抑制されるか検討した。マウス扁平上皮癌 SCC7 細胞に HF10 ならびに HF10-SOCS1 を 1 MOI で感染させ、24 時間後に IFN ガンマを添加した。12 時間後に SCC7 細胞表面上の PD-L1 の発現をフローサイトメーターにより調べた。

(4) マウスの皮下に作成した SCC7 腫瘍に対する HF10-SOCS1 と免疫チェックポイント阻害剤との併用効果を検討した。2 mm 角に細切した腫瘍を C3H マウスの皮下に 2 個移植した(両側側腹部移植モデル)。腫瘍の大きさが 100 立方 mm に達した時点で群分けを行い、投与を開始した。HF10 および HF10-SOCS1  $5 \times 10^5$  pfu を腫瘍内に 3 日毎に 3 回 (Day 0、3、6)、抗 PD-L1 抗体または抗 CTLA4 抗体は 3 日毎に 2 回 (Day 3、6) 腹腔内投与した。投与腫瘍ならびに非投与腫瘍サイズから抗腫瘍効果を評価した。

### 4. 研究成果

(1) CMV プロモーターにより SOCS1 遺伝子発現を制御し、IRES を介して蛍光遺伝子も発現するようにした外来遺伝子カセットの両端に UL 遺伝子特定領域と同じ塩基配列を配したカセットベクターを構築した。(図2)。

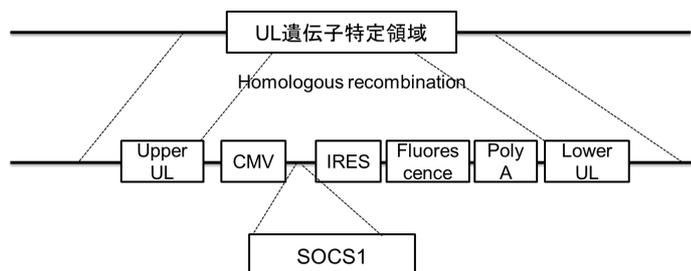


図2 構築したカセットベクター

(2) SOCS1 遺伝子が UL 遺伝子特定領域に組み込まれた HF10-SOCS1 を作成することがで

きた。HF10-SOCS1 から SOCS1 の産生を確認するため、HF10 ならびに HF10-SOCS1 を Vero 細胞に感染させ、ウエスタンブロット法にて SOCS1 の産生を測定した。その結果、HF10-SOCS1 感染細胞において SOCS1 の過剰産生が確認できた(図 3)。

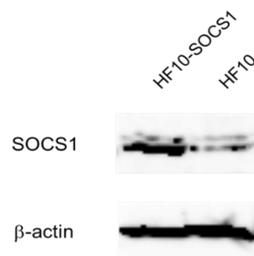


図3 HF10-SOCS1におけるSOCS1の産生

(3) SOCS1 は IFN ガンマシグナルを抑制することが知られていることから、HF10-SOCS1 感染 SCC7 細胞において、IFN ガンマ処理後の PD-L1 の発現が抑制されるかを検討した。その結果、親株 HF10 は IFN ガンマにより発現誘導される PD-L1 産生を抑制しなかったが、HF10-SOCS1 は明らかに PD-L1 産生を抑制した(図 4)。

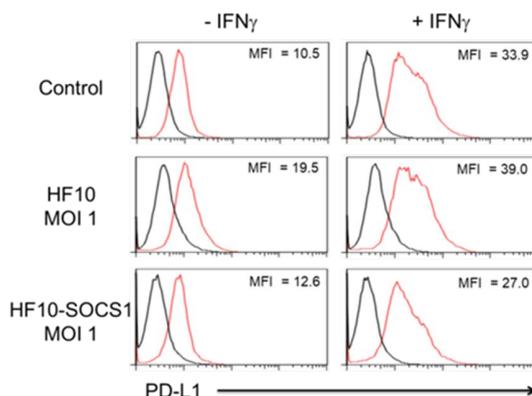


図4 IFNガンマにより発現誘導されたPD-L1のHF10-SOCS1による抑制

(4) HF10-SOCS1 と免疫チェックポイント阻害剤との併用は、HF10 単剤よりもより強く遠隔転移腫瘍に対して抗腫瘍抑制効果を示す事が期待される。そこで、SCC7 のマウス両側側腹部腫瘍に対する HF10-SOCS1 と免疫チェックポイント阻害剤との併用効果を検討した。HF10 および HF10-SOCS1 と抗 PD-L1 抗体の併用効果を検討した結果、投与ならびに非投与両方の腫瘍において HF10-SOCS1/抗 PD-L1 抗体併用群 > HF10-SOCS1 = HF10/抗 PD-L1 抗体併用群 > HF10 の順で抗腫瘍効果が確認できた(図 5)。また、HF10 および HF10-SOCS1 と抗 CTLA4 抗体の併用効果を検討した結果、投与ならびに非投与両方の腫瘍において HF10-SOCS1/抗 CTLA4 抗体併用群 > HF10-SOCS1 = HF10/抗 CTLA4 抗体併用群 > HF10 の順で抗腫瘍効果が確認できた(図 6)。

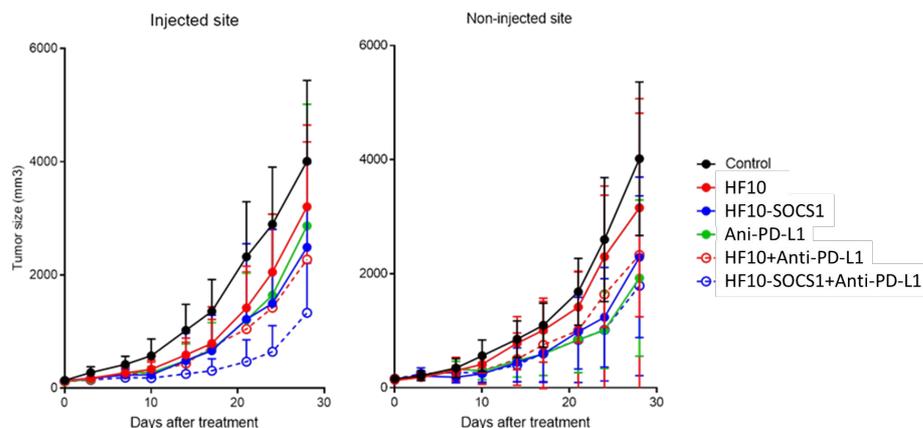


図5 HF10およびHF10-SOCS1と抗PD-L1抗体のSCC7に対する併用効果

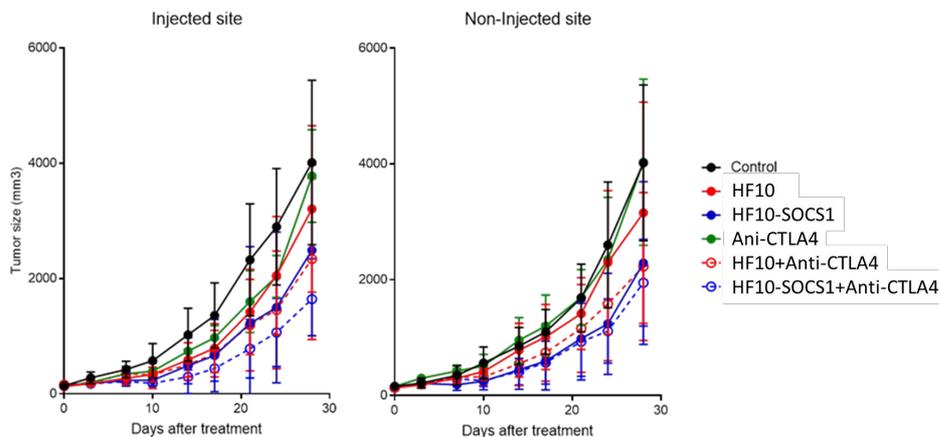


図6 HF10およびHF10-SOCS1と抗CTLA4抗体のSCC7に対する併用効果

(考察) HF10 の UL 特定領域に外来遺伝子である SOCS1 を導入することにより、SOCS1 の産生ならびに SOCS1 の機能を確認することができ、HF10 への外来遺伝子の導入に成功した。本研究で用いた方法は、SOCS1 以外の他の外来遺伝子の導入にも応用することができる。このことは適した修飾を加えることにより抗腫瘍効果が増強した次世代腫瘍溶解性ウイルス創出の可能性を示唆する。今後、HF10 に新たな遺伝子改変を行い、親株 HF10 の抗腫瘍効果を上回るウイルスを作製する予定である

HF10-SOCS1 は親株 HF10 より強い抗腫瘍効果を示し、さらに免疫チェックポイント阻害剤とのより強い併用効果を示すことが明らかになった。HF10-SOCS1 は IFN ガンマによる PD-L1 発現誘導を *in vitro* において抑制した。HF10-SOCS1 の *in vivo* における抗 PD-L1 抗体との併用により抗腫瘍効果が増強したことから、*in vivo* においても PD-L1 の発現を減弱させることにより、より少量の抗 PD-L1 抗体でも PD-1 PD-L1 結合を阻害した可能性が考えられる。今後、*in vivo* における HF10-SOCS1 による PD-L1 の発現抑制効果を検討する。HF10-SOCS1 が *in vivo* においても PD-L1 の発現を抑制するのであれば、抗 PD-1 抗体との併用効果も期待できる。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Eissa Ibrahim, Bustos-Villalobos Itzel, Ichinose Toru, Matsumura Shigeru, Naoe Yoshinori, Miyajima Noriyuki, Morimoto Daishi, Mukoyama Nobuaki, Zhiwen Wu, Tanaka Maki, Hasegawa Hitoki, Sumigama Seiji, Aleksic Branko, Kodera Yasuhiro, Kasuya Hideki, The Current Status and Future Prospects of Oncolytic Viruses in Clinical Trials against Melanoma, Glioma, Pancreatic, and Breast Cancers, *Cancers*, 査読有、Volume 10, 2018, 356-356  
DOI: 10.3390/cancers10100356

Hirooka Yoshiki, Kasuya Hideki, Ishikawa Takuya, Kawashima Hiroki, Ohno Eizaburo, Villalobos Itzel B., Naoe Yoshinori, Ichinose Toru, Koyama Nobuto, Tanaka Maki, Kodera Yasuhiro, Goto Hidemi, A Phase I clinical trial of EUS-guided intratumoral injection of the oncolytic virus, HF10 for unresectable locally advanced pancreatic cancer, *BMC Cancer*, 査読有、Volume 18, 2018, 596-596  
DOI: 10.1186/s12885-018-4453-z

### 〔学会発表〕(計 8 件)

Shigeru Matsumura, Daishi Morimoto, Yoshinori Naoe, Toru Ichinose, Maki Tanaka, Yasuhiro Kodera, Hideki Kasuya, STING is dispensable for low susceptibility to C-REV(HF10) in pancreatic cancer cell lines, 4th ONCOLYTIC VIROTHERAPY Summit(国際学会)、2018

Hideki Kasuya, Yoshiki Hirooka, Yoshinori Naoe, Shigeru Matsumura, Itzel Bustos, Toru Ichinose, Ibrahim Eissa, Wu Zhiwen, Nobuaki Mukoyama, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Hidemi Goto, Maki Tanaka, Clinical trial using HF10 with Gemcitabine and Erlotinib for 9 patients of Unresectable pancreatic cancer, 第 56 回日本癌治療学会学術集会、2018

Yoshinori Naoe, Nobuaki Mukoyama, Ibrahim Eissa, Toru Ichinose, Shigeru Matsumura, Itzel Bustos, Wu Zhiwen, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Maki Tanaka, Yasushi Fujimoto, Michihiko Sone, Yasuhiro Kodera, Hideki Kasuya, The synergistic effect of the combination therapy of PD-L1 immune checkpoint inhibitor and oncolytic herpes simplex virus Canerpaturev(C-REV), 第 56 回日本癌治療学会学術集会、2018

Hideki Kasuya, Yoshiki Hirooka, Yoshinori Naoe, Shigeru Matsumura, Itzel Bustos, Toru Ichinose, Ibrahim Eissa, Wu Zhiwen, Nobuaki Mukoyama, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Hidemi Goto, Maki Tanaka, Final total Data of Clinical trial using HF10 with Gemcitabine and Erlotinib against Unresectable Pancreatic Cancer, 第 24 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2018

Nobuaki Mukoyama, Ibrahim Eissa, Yoshinori Naoe, Toru Ichinose, Shigeru Matsumura, Itzel Bustos, Wu Zhiwen, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Maki Tanaka, Yasushi Fujimoto, Michihiko Sone, Yasuhiro Kodera, Hideki Kasuya, The synergistic effect of the combination therapy of PD-L1 immune checkpoint inhibitor and oncolytic herpes simplex virus HF10, 第 24 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2018

Daishi Morimoto, Yoshinori Naoe, Shigeru Matsumura, Toru Ichinose, Ibrahim Eissa, Itzel Bustos, Noriyuki Miyajima, Nobuaki Mukoyama, Wu Zhiwen, Maki Tanaka, Yasuhiro Kodera, Hideki Kasuya, Does the expression level of STING correlate with susceptibility to

oncolytic virus HF10 in human pancreatic cell lines?、第24回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2018

Noriyuki Miyajima、Yoshinori Naoe、Shigeru Matsumura、Itzel Bustos、Toru Ichinose、Ibrahim Eissa、Wu Zhiwen、Nobuaki Mukoyama、Daishi Morimoto、Maki Tanaka、Hideki Kasuya、Involvement of cGAS and STING in sensitivity to oncolytic virus HF10 in breast cancer cell lines、第24回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2018

H Kasuya、Y Naoe、S Matsumura、I Bustos、T Ichinose、I Eissa、W Zhiwen、N Miyajima、D Morimoto、M Tanaka、Combination therapy of oncolytic HSV HF10 and immune checkpoint inhibitor、International Oncolytic Virus Conference 2018 (国際学会)、2018

〔その他〕

ホームページ等

名古屋大学大学院医学系研究科 癌免疫治療研究室

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/intlexch/cancerimmuno/www/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：粕谷 英樹

ローマ字氏名：(KASUYA, hideki)

研究協力者氏名：直江 吉則

ローマ字氏名：(NAOE, yoshinori)

研究協力者氏名：松村 繁

ローマ字氏名：(MATSUMURA, shigeru)

研究協力者氏名：Bustos Itzel

ローマ字氏名：(BUSTOS, itzel)

研究協力者氏名：Eissa Ibrahim

ローマ字氏名：(EISSA, ibrahim)

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。