

令和元年6月21日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18252

研究課題名(和文)抗腫瘍免疫賦活機能を付加した癌特異的複製型HSV-1による肝細胞癌への治療開発

研究課題名(英文)A therapeutic strategy for human hepatocellular carcinoma using "armed" oncolytic herpes simplex viruses.

研究代表者

中竹 利知(NAKATAKE, Richi)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：40779401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌の新たな治療法の開発として、腫瘍選択的に複製する第三世代制限増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)：G47 およびT-01を基礎骨格として外来遺伝子を組み込み、IL-12や可溶性B7-1を発現する「武装化」HSV-1を用いた検討を行った。マウス肝癌腫瘍モデルにおける抗腫瘍免疫に焦点を置き、ウイルスの効果を評価した。機能付加されたウイルスは、基礎となるG47 およびT-01の能力に加えて、抗腫瘍免疫を介し格段に増強した抗腫瘍効果を示した。「武装化」HSV-1は、肝細胞癌に対し有効な新規治療法になりうる事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

第三世代制限増殖型遺伝子組換えHSV-1を用いたウイルス療法は、投与後にウイルスが腫瘍内で増幅するという癌細胞に共通した細胞生物学的機構を利用するため、癌化の遺伝学的背景に関わらず、様々ながん種に適用できる。抗腫瘍免疫を増強する機能付加型のT-mfIL12、T-B7-1は、T-01より格段に増強した抗腫瘍効果を示した。抗腫瘍免疫における重要性が認識されてきたサイトカイン発現の遺伝子を用いた新たな増殖型治療ベクターの開発は、抗腫瘍効果の向上の面において意義が大きい。基礎的データを収集する事により、肝細胞癌をも根治可能にする、革新的かつ実用的な新規治療の開発研究を推進する。

研究成果の概要(英文)：Multimodality therapies are used to manage patients with hepatocellular carcinoma (HCC), although advanced HCC is incurable. Oncolytic virus therapy is probably the next major breakthrough in cancer treatment. The third-generation oncolytic herpes simplex virus type 1 (oHSV-1) G47 and T-01 kill tumor cells without damaging the surrounding normal tissues. "Arming" oHSV with transgene(s) is a useful strategy to add certain antitumor functions to oncolytic viruses. T-01 is an base oHSV for "arming" interleukin (IL)-12 or soluble B7-1. "Arming" IL-12 or soluble B7-1 oHSV may significantly enhance the antitumor efficacy via augmentation of the antitumor immunity induction. At current study, we investigated the antitumor efficacy of "arming" oHSV on HCC and the host's immune response to HCC cells. Results demonstrate that "arming" oHSV may serve as a novel treatment for patients with HCC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：肝細胞癌 第三世代制限増殖型遺伝子組換えHSV-1 G47 IL-12 可溶性B7-1 抗腫瘍免疫 免疫チェックポイント阻害薬 ウイルス療法

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本では、年間約3万人が新たに肝臓癌の診断を受け、がん死の3位を占めている。肝臓癌が発見された時点で、約70%の患者は背景肝の肝硬変が悪化進行し、手術不可能な状態である。また進行肝細胞癌は予後が悪く、ステージ 期において生存期間中央値は6か月、門脈腫瘍塞栓を伴う再発肝細胞癌において2.7か月である。ソラフェニブが主に使用されるが、無効例や副作用のため中断例が多く、次の確立した治療法が存在しないため、新規治療法が待望されている。

近年、新しいがん治療法であるウイルス療法の研究が、国内外で精力的に進められている。ウイルス療法は、増殖型ウイルスを腫瘍細胞に感染させ、ウイルス増殖に伴うウイルス自身の直接的な殺細胞効果により、治癒を図る治療法である。がん治療用増殖型ウイルスはゲノムに遺伝子操作を加えられ、腫瘍内での複製能を保ちつつ、正常組織での病原性が最小限に押さえられている。腫瘍細胞に感染したウイルスは細胞内で複製し、その過程で感染細胞は死滅する。増殖したウイルスは周囲の腫瘍細胞に感染し、複製→細胞死→感染を繰り返して抗腫瘍効果を現す。また正常細胞に感染したウイルスは複製できず、細胞に障害が生じない。

単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)のゲノムを遺伝子工学的に改変し、腫瘍細胞で選択的に複製するがん治療用遺伝子組換えHSV-1:G47が開発され、本邦で臨床展開が行われている。G47は、(1) γ 34.5遺伝子の欠失、(2)lacZ遺伝子挿入によるICP6遺伝子の不活性化、(3) α 47遺伝子欠失変異の三重変異を有し、ウイルス増殖能と抗腫瘍効果が向上しており、がん治療に適した遺伝子組換えウイルスである。腫瘍内におけるG47の増殖が、腫瘍細胞に特異的な抗腫瘍免疫を誘導するため、免疫による抗腫瘍効果の増強する特徴がある。G47 Δ は、平成21年からFirst-in-man試験が東京大学で開始され、医師主導治験(東京大学医科学研究所附属病院:膠芽腫)ならびに臨床研究(東京大学医科学研究所附属病院:神経芽細胞腫、東京大学医学部附属病院:前立腺癌)が進行中であり、様々ながん種に対する開発研究も進められている。本研究では、G47の次世代の癌特異的増幅型ベクターの開発を目的とする。使用するウイルスは、BAC(bacterial artificial chromosome)プラスミドと2つのrecombinase系を利用し、G47のICP6遺伝子を不活性化から欠失変異させることで、ICP6のreversionを生じにくくしながら、G47と同様の能力を持つ様に改良されたウイルス:T-01を基礎骨格として、T-01のICP6遺伝子欠失部位に直接免疫刺激遺伝子(マウスIL-12、可溶性マウスB7-1)を挿入したものである。すなわち、G47およびT-01のウイルス複製に伴う抗腫瘍効果に、IL-12や可溶性B7-1などの強力な抗腫瘍免疫作用を加えた、増殖性「武装化」遺伝子組換えHSV-1(T-mfIL12、T-B7-1)を使用する。

2. 研究の目的

肝細胞癌の新たな治療法の開発として、腫瘍選択的に複製する第三世代制限増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1):G47およびT-01を基礎骨格として外来遺伝子を組み込み、IL-12や可溶性B7-1を発現する「武装化」HSV-1を用いた検討を行う。現在の知見では、基礎となるT-01において、ヒト/マウス肝癌由来培養細胞株に対する高い抗腫瘍効果を認めた。機能付加されたウイルスは、G47およびT-01の能力に加えて、抗腫瘍免疫を介し格段に増強した抗腫瘍効果を持つと予想される。今回、マウス肝癌腫瘍モデルにおける抗腫瘍免疫に焦点を置き、ウイルス単独ならびに他の薬剤との併用を含めた効果を評価する。前臨床実験にて有効性を確立し、基礎的データの集積により肝細胞癌の根治的な治療を目指す。

3. 研究の方法

(1)T-B7-1、T-mfIL12の効果検討

*in vitro*においてT-01と比較し、T-B7-1、T-mfIL12のマウス肝癌に対する抗腫瘍効果と複製能の確認した。また動物実験では、*in vitro*で認めた基本的な殺細胞能力に加え、抗腫瘍免疫を介した抗腫瘍効果を評価した。

in vitro: ヒト肝細胞癌細胞株HuH-7ならびにマウス肝癌細胞株Hepa1-6に対して、T-mfIL12、T-B7-1の抗腫瘍効果と複製能の確認を行った。

in vivo: マウス肝癌Hepa1-6両側側腹部皮下移植腫瘍モデル(C57BL6マウス、 5.0×10^6 cells)における、T-B7-1、T-mfIL12の直接治療効果ならびに非接種部位に対する特異的抗腫瘍免疫効果の検討を行った。

両側皮下腫瘍を目視確認後(腫瘍径0.5cm)、T-01、T-B7-1、T-mfIL12(2×10^6 pfu/回)を片側腫瘍内に投与し(day 0,3)、投与後28日間の体積変化を確認した。

(2)T-01とソラフェニブの併用療法による直接的な抗腫瘍効果の検討

武装化ウイルス(T-mfIL12、T-B7-1)の効果検討を行うと同時に、データのあるT-01と現在臨床で使用されているソラフェニブとの併用の効果を検討した。まずヒト肝細胞がん細胞株に対し、*in vitro*での効果検討を行った。その後*in vivo*での、ヌードマウス皮

下モデルにおける、ソラフェニブの血管新生阻害効果と T-01 の直接的な抗腫瘍効果(抗腫瘍免疫を含まない)との併用による効果を検討した(TUNNEL 染色など)。

(3)第三世代がん治療用 HSV-1 による細胞障害とエントリーレセプターとの関連性の検討

Nakatake R et al. A third-generation oncolytic herpes simplex virus inhibits the growth of liver tumors in mice. *Cancer Sci.* 2018; 109: 600-610.において、*in vitro*での第三世代がん治療用 HSV-1(T-01)の細胞障害性実験を行った。肝癌細胞株 15 種類の検討において、T-01 の抗腫瘍効果の弱い 2 種類の細胞株(HLE と JHH5)が存在した。HSV の細胞への侵入には、五つのエンペロープ糖タンパク質(glycoprotein B(gB), gC, gD, gH および gL)が関与している。主要受容体として、gD 受容体では nectin-1 および HVEM が発現している。主に nectin-1 であるが、様々な臓器細胞に関して、ウイルス療法とレセプター発現との関係性が調べられた論文が散見された(thyroid cancer や squamous cell carcinoma では殺細胞と受容体の発現が比例していると報告があるが、Neuroblastomas では相関しないとの報告があった)。肝癌細胞株における第三世代がん治療用 HSV-1 の抗腫瘍効果はエントリーレセプターの発現に依存する可能性があり、細胞障害性と nectin-1 および HVEM の発現を検討した。

4. 研究成果

(1)T-B7-1, T-mfIL12 の効果検討

in vitro: T-B7-1, T-mfIL12 の抗腫瘍効果は MOI:0.01 ならびに 0.1 において、T-01 と同等の効果を有した。また MOI:0.01 における低濃度感染後 48 時間経過した T-mfIL12, T-B7-1 のウイルス複製能に関しても T-01 と同等であった。

in vivo: 両側皮下腫瘍を目視確認後(腫瘍径 0.5cm)、T-01, T-B7-1, T-mIL12(2×10^5 pfu/回)を片側腫瘍内に投与し(day 0,3)、投与後 28 日間の体積変化を確認した。ウイルス接種側の皮下腫瘍に関して、mock 群に対し T-01, T-B7-1, T-mIL12 群は有意に腫瘍縮小効果を認め、ほぼ腫瘍が消退した。またウイルス非接種側では、mock ならびに T-01 群に対して、T-B7-1 ならびに T-mIL12 群は有意に腫瘍縮小効果を認め、ほぼ腫瘍が消退した。投与後 28 日に両側皮下腫瘍が消退した T-B7-1, T-mIL12 群のマウス(各群 n=10)に対し、再度 Hepa1-6(5.0×10^6 cells)を背部皮下に移植し、30 日経過観察を行なった(Rechallenge assay, 対照群は同週齢の同マウス(n=10))。再移植後 30 日の時点で、腫瘍の生着は T-B7-1, T-mIL12 群は各々 0/10 匹であり、対照群は 6/10 匹であった。T-B7-1, T-mIL12 接種後の特異的抗腫瘍免疫効果によって、抗腫瘍免疫が惹起され皮下腫瘍の生着が阻害されたと考えられた。

(2)T-01 とソラフェニブの併用療法による直接的な抗腫瘍効果の検討

in vitro: ヒト肝細胞癌細胞株 HuH-7, PLC/PRF/5 に対して、T-01 単独の細胞障害性を検討したが MOI:0.01 において効果不足であったため、sorafenib 併用による抗腫瘍効果を検討した。細胞障害性試験を T-01(MOI:0.01) + sorafenib (4-8 μ M)において行い、相乗効果を確認した。また抗腫瘍効果におけるメカニズムの確認のため、MAP キナーゼのリン酸化について western 法を用いて確認した。T-01 単独では MAP キナーゼのリン酸化の阻害効果が生じないが、sorafenib 単独では阻害効果が生じた。そして T-01+sorafenib では sorafenib 単独の阻害効果を減衰することはなかった。

in vivo: ヌードマウス皮下モデル(HuH-7)における sorafenib 併用による抗腫瘍効果検討した。T-01 単独投与において 2×10^5 pfu では腫瘍体積が半分程度となり腫瘍縮小効果を認めた。sorafenib 単独では 10mg/kg/day の投与で同様程度の効果であった。そのため T-01: 2×10^5 pfu ならびに sorafenib: 10mg/kg/day の併用を行い、相乗効果を確認した。28 日間の腫瘍サイズの観察において、mock 群に対して併用投与群は、有意に腫瘍サイズの縮小効果を認めた。また血清サンプルにおいて、併用投与群は mock 群に対して腫瘍マーカーである α -フェトプロテインの減少を有意に認めた。病理学的検査(T-01 ならびに sorafenib 投与 7 日目にサンプル採取)において、HE 染色では T-01 ならびに sorafenib 単独群に比べ、併用群では細胞の壊死像を認めた。TUNEL 染色では T-01(2×10^5 ならびに 2×10^5 pfu) 単独では apoptosis を認めなかったが、sorafenib(10mg/kg/day) 単独群に対して T-01(2×10^5 pfu) ならびに sorafenib(10mg/kg/day) 併用群は有意に apoptosis 陽性細胞を認めた。

(3)第三世代がん治療用 HSV-1 による細胞障害とエントリーレセプターとの関連性の検討

T-01 の抗腫瘍効果が強かった HuH-7 ならびに KYN-2 を含めて、HLE と JHH5 における HVEM と Nectin-1 の発現に関して FCM 法を用いて確認した。HuH-7 での HVEM の発現、そして PLC/PRF/5 と JHH5 での非常に弱い発現を認めた。Nectin-1 は JHH-5 のみ非常に弱い発現を認め、効果の強かった細胞株(HuH-7, PLC/PRF/5)と効果のなかった細胞株(HLE, JHH-5)では nectin-1, HVEM の発現の相関はなかった。

今後、同種の両側側腹部皮下移植腫瘍モデルでの、T-B7-1,T-mfIL12 の直接治療効果ならびに非接種部位に対する特異的抗腫瘍免疫効果検討について、病理学的検討など詳細に進めていく。また免疫チェックポイント阻害薬を併用して行う。前臨床実験にて有効性を確立し、基礎的データの集積により肝細胞癌の根治的な治療を目指す。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Nakatake R, Kaibori M, Nakamura Y, Tanaka Y, Matushima H, Okumura T, Murakami T, Ino Y, Todo T, Kon M. A third-generation oncolytic herpes simplex virus inhibits the growth of liver tumors in mice. Cancer Sci. 2018; 109: 600-610. DOI: 10.1111/cas.13492 査読あり

〔学会発表〕(計1件)

Nakatake R. Effect of a third-generation oncolytic herpes simplex virus on the growth of human hepatocellular carcinoma, 2018 Gastrointestinal Cancers Symposium

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：藤堂 具紀

ローマ字氏名：(TODO, Tomoki)

(2)研究協力者

研究協力者氏名：海堀 昌樹

ローマ字氏名：(KAIBORI, Masaki)

(3)研究協力者

研究協力者氏名：松島 英之

ローマ字氏名：(MATSUSHIMA, Hideyuki)

(4)研究協力者

研究協力者氏名：奥村 忠芳

ローマ字氏名：(OKUMURA, Tadayoshi)

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。