

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：23903
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2022
課題番号：18K07951
研究課題名（和文）腫瘍溶解性ウイルスによる抗がん免疫応答の解析と新規消化管がん治療開発への応用

研究課題名（英文）Development of novel immunotherapy for gastrointestinal cancer using oncolytic virus

研究代表者
森 義徳（Mori, Yoshinori）
名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・准教授

研究者番号：80468248
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）：一般的にウイルスはヒトに感冒症状などの悪影響を及ぼすことが知られているが、一部特定のウイルスはがんに感染することにより、がんを縮小させることが分かっている。レオウイルスはがんを縮小させる効果を持つ腫瘍溶解性ウイルスである。その機序は感染による直接的な効果と、がん免疫の活性化による間接的な効果がある。本研究で我々はレオウイルスのがんに対する免疫学的な効果の機序を解析し、その治療効果を高める方法を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レオウイルスはがん治療薬として開発が進んでいるが、レオウイルス単独では治療効果が十分ではない。この理由として、レオウイルスが腫瘍免疫応答においてプラスとマイナスの両面を持つことが考えられている。本研究では細胞実験、動物実験により、これらの基礎的な機序を明らかにした。更に新規がん免疫治療薬との併用で、プラス面を補強し、マイナス面を減弱できることを解明した。本研究によりレオウイルスによるがん治療の更なる進展が期待される。

研究成果の概要（英文）：Viruses are generally known to have adverse effects on humans, such as cold symptoms; however, some specific viruses are known to reduce cancer by infecting cancer. Reoviruses are oncolytic viruses with cancer-shrinking effects. This mechanism has a direct effect on infection and an indirect effect on the activation of cancer immunity. In this study, we analyzed the mechanism of the immunological effect of reovirus on cancer and identified a method to enhance its therapeutic effect.

研究分野：消化器内科

キーワード：消化管腫瘍 腫瘍溶解性ウイルス レオウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍溶解性ウイルス、レオウイルスは、がん細胞に特異的に感染し、細胞内部での増殖、細胞破壊、近接するがん細胞への感染拡大というサイクルの繰り返しにより抗腫瘍効果をもたらす。従来の抗がん剤や放射線治療とは異なる作用機序から、レオウイルスは次世代のがん治療薬として期待されており、実用化に向けて臨床試験が進行中である。最近では、レオウイルスの直接的な殺細胞効果に加えて、レオウイルスによる抗がん免疫活性の誘導が明らかにされ、レオウイルスを用いた「がん免疫療法」が新たな治療戦略として注目されている。

これまでに我々は、消化管腫瘍に対するレオウイルスの抗腫瘍効果について基礎的な研究を行い、レオウイルスが直接的に細胞死を誘導するだけでなく、腫瘍免疫と関連した TRAIL や Fas シグナル経路の活性を介し、オートクライン、パラクライン的に殺細胞効果をもたらすことを報告してきた。レオウイルスによる抗がん免疫誘導メカニズムとしては、がん細胞を死滅させる際に、がん抗原に特異的な抗腫瘍免疫を活性化する免疫応答誘導性細胞死を誘導していることや、腫瘍関連マクロファージの分化誘導、サイトカインの分泌誘導を介した抗がん免疫の活性化などが想定される。一方で、レオウイルスによる免疫刺激は、レオウイルスの排除を促進して、その抗腫瘍効果を減弱させることや、がん微小環境における免疫細胞の制御や免疫チェックポイントに関連した PD-1/PD-L1 の発現を誘導して、抗がん免疫に対して抑制的に作用することなどが報告されている。このようにレオウイルスは抗がん免疫に対して、促進的な作用と抑制的な作用を合わせ持つため、レオウイルスの抗がん免疫への促進的な作用を増強し、抑制的な作用を阻害するための標的となる免疫機構を明らかとすることが、レオウイルスによる「がん免疫療法」の臨床実用化には不可欠と考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、レオウイルスの消化管がんへの作用メカニズムを、抗がん免疫応答の観点から解析し、レオウイルスによる「がん免疫療法」の開発につながる基盤研究を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) レオウイルスによる免疫応答誘導性細胞死の検証

マウス大腸がん細胞株 CT26 にレオウイルスを暴露した後に、細胞を回収し、タンパクを抽出する。細胞がダメージを受けた際に細胞外に表出および放出され、免疫応答を誘導する因子である HMBG1 (high mobility group1) の放出を ELISA 法を用いて検証する。さらに、免疫応答誘導性細胞死と関連した細胞外への ATP の放出を、レオウイルスに暴露した細胞の培養液の ATP 濃度をカイネティックアッセイを用いて測定することにより評価する。また、レオウイルスによる抗腫瘍免疫の重要な因子であるインターフェロンの抑制効果について RT-PCR で評価した。さらに、インターフェロンの発現を制御している転写因子 IRF-3 の活性化について、IRF-3 のリン酸化を Western blot で、IRF-3 の核内移行を蛍光免疫染色で検証した。

(2) レオウイルスによる腫瘍微小環境への影響の検証

マウス大腸がん細胞株 CT26 を同系の BALB/c マウスに移植する。腫瘍の定着を確認後、レオウイルスを腫瘍局所に投与し、経時的に腫瘍径を計測し、レオウイルスによる腫瘍増殖抑制効果の評価する。さらにレオウイルス投与後に摘出した腫瘍の免疫組織染色により、がん微小環境における細胞傷害性 T 細胞、制御性 T 細胞、骨髄由来免疫抑制細胞などの免疫細胞のフェノタイピングを行う。免疫細胞の染色には、各免疫細胞の表面マーカー抗体 (CD3、CD4、CD8、CD11b、CD25、Gr-1、FoxP3 など) を用いる。さらに、腫瘍組織の単細胞懸濁液を調製し、各免疫細胞に特異的なマーカーを用いて、フローサイトメトリーにより腫瘍に浸潤した免疫細胞のフェノタイプを解析した。

(3) レオウイルスによる腫瘍免疫応答および、abscopal 効果の検証

CT26 を BALB/c マウスの両側に移植し (dual flank tumor model)、形成された腫瘍の片側のみにレオウイルスを投与し、両側の腫瘍への抗腫瘍効果 (abscopal 効果) および、両側の腫瘍微小環境について抗がん免疫の観点から検証を行った。腫瘍微小環境の検証には、(2) と同様に免疫組織染色、フローサイトメトリーを用い、さらに RT-PCR を使用して、インターフェロンなどの腫瘍免疫と関連するサイトカインの発現について検証した。

(4) レオウイルスを用いた免疫複合療法の有効性の検証

レオウイルスと新規がん免疫療法薬として研究が進められている STING agonist との併用による抗がん免疫作用について、dual flank tumor model を用いて検証した。

4. 研究成果

(1) レオウイルスによる免疫応答誘導性細胞死の検討

細胞生存率アッセイを用いて、レオウイルスの CT26 に対する細胞毒性効果を確認した後、レオウイルスによる免疫原性細胞の誘導を評価するため、レオウイルスに曝露した CT26 細胞の培養

液中の ATP 濃度、およびレオウイルス曝露後に CT26 細胞から放出される HGMB-1 の濃度を測定した。レオウイルスに曝露した CT26 の培養液中の ATP 濃度は、レオウイルスに曝露していない CT26 の培養液よりも有意に高かったこと、また、CT26 をレオウイルス処理した培養液では、より高濃度の HGMB1 が検出されたことから、レオウイルスが CT26 に免疫応答誘導性細胞死を誘導していることが確認された。また、RT-PCR によるインターフェロンの発現の検証では、レオウイルスの投与によるインターフェロンの発現の変化はみられなかった。さらに、インターフェロンの発現を誘導する薬剤である STING agonist との併用試験では、レオウイルスが STING agonist によるインターフェロンの発現の増加を抑制する作用が確認された。また、Western blot、蛍光免疫染色による検証では、レオウイルスは IRF-3 のリン酸化および核内移行を誘導しなかった。

(2) レオウイルスによる腫瘍微小環境への影響の検証

マウス大腸がんモデルを用いた検証では、レオウイルスによる抗腫瘍効果が確認された。レオウイルス投与後の腫瘍を採取し、免疫染色により腫瘍に浸潤する免疫細胞のプロファイルおよび、腫瘍細胞への影響を検証した。レオウイルスを投与した腫瘍では、CD8 陽性 T 細胞、すなわち細胞障害性 T 細胞の増加を認め、グランザイム B、および cleaved caspase-3 陽性細胞の有意な増加を認めた。これらの結果は、レオウイルスが腫瘍微小環境において抗がん免疫を誘導したことを示すものがあった。さらに、フローサイトメトリーを用いた検証においても、レオウイルスを投与した腫瘍では、CD8 陽性 T 細胞数の増加が確認された。

(3) レオウイルスによる腫瘍免疫応答および、abscopal 効果の検証

マウスの両側に形成された腫瘍の片側のみにレオウイルスを投与したところ、(2)の検証と同様に、投与した腫瘍の縮小を認めた。レオウイルスを投与していない反対側の腫瘍に関しても縮小が認められ、abscopal 効果が確認された。しかし、長期間の観察によるマウスの生存期間の検証では、コントロール群と比較して、有意な生存の延長がみられず、レオウイルスによる abscopal 効果は限定的であることが示された。免疫染色による腫瘍微小環境の検証では、レオウイルスを投与した腫瘍およびレオウイルスを投与していない反対側の腫瘍とともに CD8 陽性 T 細胞数の増加が確認され、レオウイルスによる abscopal 効果を示唆する結果が得られた。しかし、フローサイトメトリーを用いた検証では、両側の腫瘍とともに CD8 陽性 T 細胞数の増加が確認されたが、有意差は認めなかった。免疫染色による細胞障害の評価では、両側の腫瘍とともに Ki67 の低下、cleaved caspase-3 の高発現を認めたが、グランザイム B については、レオウイルスを投与した腫瘍のみで有意に増加を示した。以上の結果から、レオウイルスにより abscopal 効果がもたらされるものの、その効果は十分ではなく、改善の余地があると考えられた。RT-PCR による腫瘍微小環境におけるサイトカインの発現については、インターフェロン、インターフェロン、IL-6 について検証したが、いずれも、両側の腫瘍で有意な発現の変化は確認できなかった。

(4) レオウイルスを用いた免疫複合療法の有効性の検証

これまでの検討から、レオウイルスの抗腫瘍免疫作用の障壁となっていると考えられる、インターフェロンの発現抑制作用を改善する目的で、インターフェロンの発現を誘導し抗腫瘍免疫を活性化作用を有する STING agonist (ADU-S100) との併用効果をマウス実験で検証した。dual flank tumor model を用いて併用による abscopal 効果を検証した結果、レオウイルス単独と比較して、優れた有効性が認められた。腫瘍の増殖抑制効果だけでなく、マウスの生存を延長する効果も示された。また、腫瘍微小環境の評価では、併用投与により、免疫染色、フローサイトメータともに、両側の腫瘍で有意に CD8 陽性 T 細胞の増加が確認された。インターフェロンの発現についても、両側の腫瘍で有意な上昇を認め、レオウイルスと STING agonist の併用により強力な抗腫瘍免疫が誘導されたと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	久保田 英嗣 (Kubota Eiji) (30405188)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	
研究分担者	片岡 洋望 (Kataoka Hitomi) (40381785)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関