

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09451

研究課題名(和文) 光感受性ナノキャリアを用いた脳腫瘍のウイルス療法

研究課題名(英文) Oncolytic virus therapy with photo-sensitive nanocarrier for glioma

研究代表者

岩立 康男 (Iwate, Yasuo)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70272309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス療法は脳腫瘍の治療法として注目されている。キャリアとして開発したICG-リポソームは、脳腫瘍局所に集積し、光照射によって開裂して細胞死を誘導する。このときCD-8 T細胞を主体とする免疫細胞の局所浸潤とheat-shock protein-70 (HSP-70)の高発現が確認された。一方で、ウイルス療法ではマクロファージも高浸潤が認められたが、HSP-70の発現は見られなかった。HSP-70はToll-like receptor-4 (TLR-4)のリガンドであり、ICG-リポソームとウイルス療法の併用は、自然免疫系を活性化して獲得免疫へとつなげる強力な免疫療法となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は難治性腫瘍の一つであり、また神経機能の低下を伴うことが多く、腫瘍細胞特異性の高い治療法の開発が求められている。ウイルス療法は有効な治療法として注目されるが、更なる治療効果の向上が必要である。我々は、光感受性物質を結合させた脂質膜をそのキャリアとして用いることによって、ウイルスによる自然免疫の発動を強化できることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma (GM) is highly invasive to the surrounding normal brain tissue, so development of therapy with higher tumor-specificity is required. Virus therapy is one of the expected candidates. We used a sendai virus vector, which has a high ability to induce efficient gene introduction and cell fusion. This vector can induce macrophage infiltration and tumor-specific CD8 T cell induction. On the other hand, ICG-liposome is a photo-sensitive nano-carrier which can also induce acquired immunity but not significant innate immunity. This nano-carrier induced expression of heat-shock protein-70 (HSP-70) which could activate the virus-related macrophages through toll-like receptor-4 (TLR-4) to achieve a more effective virus therapy against GM.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：脳腫瘍 ウイルス療法 ナノ・キャリア 腫瘍特異的免疫

## 1. 研究開始当初の背景

代表的脳腫瘍であるグリオーマは、周囲の正常脳に浸潤性に発育するため、極めて治癒を得ることが難しい難知性腫瘍である。一般的に用いられる手術、放射線化学療法での生存期間中央値は1年半程度にとどまり、腫瘍細胞特異性の高い治療法の開発が求められている。腫瘍特異的免疫監視機構を強化する免疫学的治療が理論的に優れた方法であると思われる。一方で、中枢神経系は免疫学的寛容の場として知られており、抗原提示が不十分かつ免疫担当細胞の浸潤も起こりづらい部位として知られている。

そこで我々は、免疫学的寛容の場に発生した膠芽腫を皮下ワクチンとして全身の免疫システムに認知させ腫瘍特異的な細胞障害性 T リンパ球を誘導するとともに、この T リンパ球を、腫瘍内で IL-2 などのサイトカインを発現させることにより脳腫瘍内に集積させる治療実験を行ってきた。この免疫学的遺伝子治療により、これまでの文献上治癒を得ることが困難であった生着ラット脳腫瘍の約 30% を治癒させることに成功した。しかし、この結果は、脳以外の場所で誘導された腫瘍特異的 T リンパ球を用いた場合、脳腫瘍局所でリンパ球遊走作用を有するサイトカインを分泌させても、治癒が得られる確率は低いことを示している。したがって、脳腫瘍局所における抗原提示を増強することが必要であると考えた。

同時に我々は、遺伝子導入効率が高く、細胞質でのみウイルスゲノムを複製するセンダイウイルスベクターの開発を行ってきた。ウイルスタンパクのうち、出芽に必要な M タンパクを欠失させ (SeV/dM)、細胞融合に必要な F タンパクをグリオーマ細胞において高発現が確認されている urokinase-type plasminogen activator (uPA) によって開裂し活性型となるように改変した新規の腫瘍融解ウイルス [rSeV/dMFct14]、および M タンパクと F タンパクをともに欠失させ、安全性を高めるとともに interleukin-2 (IL-2) 遺伝子を搭載したウイルスベクターを作製した [rSeV/dMdF]。rSeV/dMFct14 に感染した細胞は uPA 存在下で細胞融合を繰り返し、最終的にアポトーシスに至る。このセンダイウイルスベクターを用いた場合、他の癌腫では強い樹状細胞活性化能を示したが、膠芽腫に対してはそれよりも弱い活性化能に止まっていた。頭蓋内に発生する膠芽腫に対して有効な治療法とするには、ウイルスを腫瘍局所に高濃度かつ広範囲に分布させ、かつ強い抗腫瘍免疫を誘導する戦略が必要となる。

## 2. 研究の目的

脳は免疫学的寛容の場として知られ、抗原提示が不十分であると同時に、免疫担当細胞の集積を得づらい組織である。したがって、皮下ワクチンなどによって腫瘍特異的な細胞障害性 T リンパ球が誘導されても、十分な治療効果を得ることが困難であった。我々は、すでに臨床応用されているセンダイウイルスベクターが、マクロファージ、マイクログリアなど自然免疫系細胞の強い集積をもたらすことを見出した。今回、新規に開発した nano-carrier である ICG-リポソームを併用することによって、この自然免疫系細胞の活性化を図ることを目指した。本研究の目的は、この組換えセンダイウイルスベクターと ICG-リポソームを併用することによって、脳腫瘍局所で強力な抗原提示を誘導できるか否かを検証することにある。最終的なエンドポイントは、脳腫瘍モデルラットの生存期間延長であり、T リンパ球やマクロファージ、マイクログリアの集積の有無も検討する。同時に安全性を確認し、将来的な臨床応用につなげることを目指して研究を行う。

### 3. 研究の方法

Fisher rat-9L gliosarcoma の系による脳腫瘍モデルを作製し、一定期間の後に rSeV/dM Fct14 および rSeV/dMdf による治療を行い、その効果と安全性を確認する。投与方法として ICG-リポソームを用いた場合の併用効果も確認する。治療効果については、(1) 生存期間・治癒率、(2) 7 テスラ動物専用 MRI による腫瘍体積の経時的変化の観察、(3) 7AAD/CFSE cytotoxicity assay による腫瘍特異的細胞障害性 T リンパ球誘導の定量、(4) 摘出脳における免疫担当細胞浸潤の量やマイクログリアの活性化、免疫関連分子発現（自然免疫系の内在性リガンド）に関する免疫組織化学、などにより行い、安全性の確認には、(1) 脳を含め種々の臓器を摘出し、その病理組織検査を行う、(2) 神経症状発現などをモニターする。

### 4. 研究成果

組み換えセンダイウイルスベクターである rSeV/dMFct14 は uPA 高発現の細胞株 U251、U373 に細胞癒合を起こし細胞死を誘導すること、また uPA 低発現株では細胞癒合が起こらないことを確認した。rSeV/dMFct14 あるいは rSeV/dMdf を 9L-gliosarcoma 細胞によるラット脳腫瘍モデルの脳腫瘍局所に投与すると生存期間の延長を認めた。治療後 2 週間目に脳を摘出し、種々の免疫関連タンパクの発現について検討したところ、いずれの組み換えウイルスにおいても、CD8 T cell、CD4 T cell、CD11b+マクロファージの浸潤を認めた。一方、ICG-リポソーム投与と光照射による治療でも生存期間の延長を認めるとともに、組織学的に広範な壊死とアポトーシスを認めた。免疫担当細胞に関しては、CD8 T cell の集積を認めたが、CD4 T cell、CD11b+マクロファージの浸潤は認められなかった。

ICG-リポソームによる治療は樹状細胞に対する内在性リガンドである HSP-70 を強く発現させることを見出した。したがって、ICG-リポソームの併用は、ウイルスベクターによって集積した自然免疫系細胞（マクロファージ、マイクログリア）を活性化し、獲得免疫の発動を強力に推進することによって、さらに有効な治療に結びつくと考えられる。

また、ICG-リポソームによる治療を行った場合、7AAD/CFSE cytotoxicity assay により、腫瘍特異的細胞障害性 T リンパ球が、通常の皮下ワクチン療法よりも強力に誘導されていることが示された。

長期生存ラットにおいて、神経症状の出現、体重の異常変化、臓器異常などはいずれも認められず、また MRI 検査にて脳浮腫の所見もなかったことより、その安全性も確認された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hara A, Koyama-Nasu R, Toyoda T, Iwadate Y, Motohashi S, et al.	4. 巻 70
2. 論文標題 CD1d expression in glioblastoma is a promising target for NKT cell-based cancer immunotherapy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother.	6. 最初と最後の頁 1239-1254
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-020-02742-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawauchi D, Takahashi M, Satomi K, Iwadate Y, Ichimura K, Tomiyama A, et al	4. 巻 112
2. 論文標題 The ALK inhibitors, alectinib and ceritinib, induce ALK-independent and STAT3-dependent glioblastoma cell death.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 2442-2453
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14885	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takashima Y, Hamano M, Fukai J, Iwadate Y, Kajiwara K, Kobayashi T, Hondoh H, Yamanaka R.	4. 巻 10
2. 論文標題 GSEA-assisted gene signatures valid for combinations of prognostic markers in PCNSL	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 8435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-65463-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sumazaki M, Shimada H, Ito M, Shiratori F, Iwadate Y, et al.	4. 巻 111
2. 論文標題 Serum anti-LRPAP 1 is a common biomarker for digestive organ cancers and atherosclerotic diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 4453-4464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14652.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Li SY, Yoshida Y, Kobayashi E, Adachi A, Iwadate Y, et al.	4. 巻 46
2. 論文標題 Association between serum anti-ASXL2 antibody levels and acute aschemic stroke, acute myocardial infarction, diabetes mellitus, chronic kidney disease and digestive organ cancer, and their possible association with atherosclerosis and hypertension.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Med	6. 最初と最後の頁 1274-1288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijmm.2020.4690.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takashima Y, Kawaguchi A, Sato R, Iwadate Y, Yamanaka R, et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Differential expression of individual transcript variants of PD-1 and PD-L2 genes on Th-1/Th-2 status is guaranteed for prognosis prediction in PCNSL.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 10004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46473-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takashima Y, Kawaguchi A, Iwadate Y, Yamanaka R, et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 miR-548b, miR-554, and miR-1202 are reliable prognosis predictors of the miRNAs associated with cancer immunity in primary central nervous system lymphoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0229577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0229577	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takashima Y, Kawaguchi A, Iwadate Y, Yamanaka R, et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 MicroRNA signature constituted of miR-30d, miR-93, and miR-181b is a promising prognostic marker in primary central nervous system lymphoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0210400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0210400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibata S, Shinozaki N, Tamura Y, Iwadate Y, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Photo-immune therapy with liposomally formulated phospholipid-conjugated indocyanine green induces specific antitumor responses with heat shock protein-70 expression in a glioblastoma model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 175-183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26544	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------