

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09653

研究課題名(和文) 骨軟部腫瘍へのがん免疫抑制阻害・活性化をもたらす革新的がん免疫ウイルス療法の開発

研究課題名(英文) Development of innovative immunovirotherapy facilitating anti-tumor immunity in bone and soft tissue tumors

研究代表者

伊地知 暢広 (Ijichi, Nobuhiro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：80380624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫誘導遺伝子を搭載した腫瘍溶解性ウイルスは、革新的な「がん免疫遺伝子・ウイルス治療」として期待されている。本研究では、独自のウイルス作製技術を基盤として、種々の可溶性免疫チェックポイント遺伝子及び免疫活性化遺伝子を搭載した新規のSurv.m-CRAを作製し、in vivo機能検証を行った。その結果、異なる作用を有する他の免疫活性化遺伝子搭載Surv.m-CRAとの併用による治療効果の増強傾向と高い安全性を明らかにした。本成果により、異なる治療作用を有する複数の腫瘍溶解性ウイルスによる、コンビネーション免疫遺伝子・ウイルス治療開発の重要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、次世代の「がん免疫遺伝子・ウイルス治療」の開発へ向け、可溶性免疫チェックポイント遺伝子の搭載戦略の有効性を示し、他の免疫活性化遺伝子搭載ウイルスとの併用による、治療効果増強の可能性を明らかにした。異なる治療作用を有する複数の腫瘍溶解性ウイルスによる、革新的なコンビネーション免疫遺伝子・ウイルス治療開発が難治性がんの根治へとつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Oncolytic viruses (OV) arming immunostimulatory genes are expected to be an innovative immuno-virotherapy. In this study, we developed novel Surv.m-CRAs armed with various soluble immune checkpoint genes and chemokine genes based on our m-CRA technology and verified their in vivo functions. As a result, these oncolytic viruses were revealed to have a tendency to enhance the therapeutic effect and high safety when used in combination with Surv.m-CRAs with other immunostimulatory genes. These results suggest the importance of developing combination immuno-virotherapies using multiple OVs with different therapeutic properties.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：がん免疫 免疫遺伝子ウイルス治療

1. 研究開始当初の背景

悪性骨軟部腫瘍や肝臓がんなどをはじめとする難治性がんは、特に転移性癌での高い致死率と相まって極めて予後不良である。このような難治性癌の共通特性として、化学療法や放射線療法などの従来療法が奏功せず、したがって外科手術に頼らざるを得ない状況である。一方で、外科手術以外の革新的な治療戦略の開発は、これまでほとんど成功していない。近年、種々の癌免疫抑制機構が明らかとなり、それらの阻害・解除による癌免疫活性化が有望な癌治療戦略候補として期待されているが、それぞれ克服すべき課題も残されている。

- ・がん免疫抑制に働く PD-1 等の免疫チェックポイントを標的とした阻害抗体医薬は、ブレイクスルーとなった一方、有効症例は限られ、膵癌などの難治性がんには無効、腫瘍局所での低い有効濃度に加え、全身投与に伴う副作用など、多くの克服課題が残っている。
- ・キメラ抗原受容体発現 T 細胞 (CAR-T) 療法は、血液がんには著明な治療効果を発揮する一方で、免疫細胞等の腫瘍浸潤が治療に必須の固形がんに対する奏効率は未だ低い。
- ・近年、さらなる有望ながん治療戦略として、「がん細胞で特異的にウイルスが増殖し殺傷効果を示す遺伝子組換えウイルス」の腫瘍溶解性ウイルス (OV) が注目されている。2015 年末に、サイトカイン GM-CSF (顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子) を搭載した OV (Amgen 社 T-Vec) が、欧米で First-in-class 医薬品として承認されたことにより、世界的には本分野全体が革新的ながん治療薬の最有力候補として期待され、OV と癌免疫療法との併用試験も世界レベルで進められてはいる。しかしながら、免疫活性化因子などの治療遺伝子を搭載する場合、全身性の過剰発現に伴う安全性の問題を潜在的に有することに加え、その発現制御の必要性については認識すらされていない。

このような背景から、がん制圧までをも視野に入れつつ、より安全で革新的治療効果をもたらす癌治療薬創出には、単なる併用を超えた革新戦略・技術開発が必要である。

2. 研究の目的

近年、種々の癌免疫抑制機構が明らかとなり、それらの阻害・解除による癌免疫活性化が有望な癌治療戦略候補として期待されている。しかしながら、それぞれ克服すべき課題も残されており、がん制圧までをも視野に入れつつ、より安全で革新的治療効果をもたらす癌治療薬創出には、単なる併用を超えた革新戦略・技術開発が必要である。

そこで本研究では、独自開発のがん治療ウイルスベクター (Surv.m-CRA) プラットフォーム作製技術を基盤に、免疫抑制阻害をもたらす「可溶型」免疫チェックポイント「遺伝子」や、免疫細胞腫瘍浸潤を誘導するケモカイン「遺伝子」等を至適・癌特異的発現制御下に搭載した、革新的な癌免疫治療腫瘍溶解性ウイルスを網羅的に作製・開発することを目的とする。特に、この「可溶型」免疫チェックポイント遺伝子産物は、PD-1/PD-L1 間の結合を競合的に阻害し、がん免疫抑制の阻害に繋がると期待される。このように、Surv.m-CRA の腫瘍溶解作用で創出された癌抗原ペプチドにより細胞性免疫が誘導されることに加え、がん免疫活性化「遺伝子」産物が腫瘍局所で至適高濃度、持続的に発現することで、全身性の副作用を伴うことなく、がん免疫抑制の阻害、あるいは免疫細胞の腫瘍浸潤が誘導され、相乗的な癌治療効果が期待される (図 1)。

このように、OV と免疫チェックポイント阻害抗体薬の併用療法だけでも期待されている現状において、「抗体ではなく『可溶型』の免疫チェックポイント『遺伝子』を OV に直接搭載する」という戦略は未だ報告のない極めて新規性の高い独走先駆的研究である。さらに、免疫細胞の腫瘍浸潤誘導戦略とも組み合わせることで原発巣だけでなく多発転移巣も治療可能とする革新的な癌免疫治療腫瘍溶解性ウイルス医薬となることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 免疫チェックポイント遺伝子、免疫細胞腫瘍浸潤誘導遺伝子搭載 Surv.m-CRA の作製

まず、独自開発した Surv.m-CRA に、至適かつ癌特異的な発現をもたらす複数の恒常的あるいは組織・癌特異的プロモーターを導入後、その下流に種々の免疫チェックポイント遺伝子やケモカイン遺伝子を組み入れたウイルスの作製・精製を行う。その後、これらウイルスのがん細胞株への感染実験により、免疫チェックポイント蛋白質及びケモカイン蛋白質の *in vitro* でのタンパク質発現を ELISA 法あるいはウェスタンブロットング法により確認する。さらに、細胞増殖アッセイ等によりウイルスによる細胞傷害効果を確認する。

(2) 各種新規 Surv.m-CRA のハムスター癌モデルでの治療実験と免疫学的解析

まず、確立したシンジェニックハムスター癌モデルにて、各種免疫チェックポイント遺伝子あるいはケモカイン遺伝子搭載 Surv.m-CRA を投与する治療実験を行い、腫瘍体積の縮小や生存率の改善等の治療効果を評価する。その際、免疫チェックポイント蛋白質及びケモカイン蛋白質の各種臓器における *in vivo* での発現を同様に確認する。併せて、免疫誘導・転移巣治療の効果解析のため、同/異種細胞株でのチャレンジテストを行う。免疫学的解析として、まず各種の免疫細胞マーカー抗体のハムスター種への交差性、特異性を検証する。最適抗体が選定できたら、免疫細胞・組織染色、フローサイトメーター解析を行い、実験系を確立する。これら実験系により、治療後の局所、あるいは転移組織での、浸潤免疫細胞の解析を行い、治療効果の分子メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

本研究では、これまでの研究で得られた至適かつ癌特異的な発現をもたらす複数の恒常的あるいは組織・癌特異的プロモーターを選択し、まずそれら下流に種々の可溶性免疫チェックポイント遺伝子やケモカイン遺伝子を組み入れた 10 数種類の新規 Surv.m-CRA を作製した。その後、これらウイルスのがん細胞株への感染実験を行い、ウイルスの *in vitro* 特性を検証した。その結果、survivin プロモーターによるがん細胞特異的な細胞殺傷効果を細胞増殖アッセイなどにより確認した。加えて、免疫チェックポイント蛋白質及び免疫細胞腫瘍浸潤誘導蛋白質のプロモーター強度依存的、あるいは組織・癌特異的なタンパク質発現を ELISA 法にて確認できた。

次に、可溶性免疫チェックポイント遺伝子搭載ウイルスについて、当該免疫チェックポイント分子とそのリガンドとの結合に対する阻害活性を検討した結果、ほぼ同じアミノ酸配列を持つ Recombinant protein と比較し、comparable な阻害活性を有することを確認できた。

さらに、ハムスター由来腎がん細胞株を皮下移植した、シンジェニックハムスター皮下腫瘍モデルにおいて *in vivo* 機能検証を行った。その結果、いずれのウイルスについても単独での腫瘍増殖抑制効果は弱い傾向であったものの、他の免疫活性化遺伝子搭載ウイルスとの併用により、治療効果が増強する傾向が得られた。一方、ウイルス投与により生存率低下や体重低下などの副作用は全期間を通じて観察されなかったことから、高い安全性が確認された。これらの成果は、難治性がんの根治に向け、異なる治療作用を有する複数の腫瘍溶解性ウイルスによる、コンビネーション免疫遺伝子・ウイルス治療開発の重要性を示唆するものであり、今後のさらなる開発へとつながることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三井 薫、伊地知 暢広、井手 佳菜子、小賤 健一郎
2. 発表標題 COVID-19 下でのオンライン組織学実習への取り組み
3. 学会等名 日本解剖学会第76回九州支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西川路 侑耶、伊地知 暢広、三井 薫、小賤健一郎
2. 発表標題 次世代の腫瘍溶解性ウイルスの開発と癌と再生医学への治療応用
3. 学会等名 日本解剖学会第76回九州支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三井 薫、伊地知 暢広、井手 佳菜子、松田 恵理子、小賤 健一郎
2. 発表標題 鹿児島大学での COVID-19 下でのオンライン組織学実習への取り組み
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

〔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	小賤 健一郎 (KOSAI KEN-ICHIRO) (90258418)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	

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