

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：23903
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2021
課題番号：19K18778
研究課題名(和文) 頭頸部癌モデル動物の樹立と抗腫瘍ウイルスHF10の治療効果に関する分子機構の解明

研究課題名(英文) Establishment of head and neck cancer model animal and investigation of molecular mechanism about therapeutic effect of the oncolytic virus HF10

研究代表者
高野 学 (Takano, Gaku)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師

研究者番号：00812744
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)：本研究では発癌作用を持つ薬剤4NQOに着目し、新たなマウス由来の口腔癌細胞株NMOC1を樹立し、またNMOC1を利用し舌癌マウスモデルを確立した。また口腔癌マウスモデルにおけるHF10の治療効果を評価したところ、HF10は腫瘍細胞で増殖し、in vitro、in vivo共に良好な抗腫瘍効果を認めた。さらに腫瘍内浸潤リンパ球の変化を認めており、HF10による抗腫瘍免疫の増強が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で樹立した舌癌マウスモデルは安定して形成され、また正常な免疫能を持つ独自の口腔癌モデルであり、今後の頭頸部癌基礎研究に応用が可能と考えられた。また口腔癌マウスモデルにおけるHF10の治療効果を評価したところ、良好な抗腫瘍効果を認め、HF10が口腔癌の治療に有望な薬剤であることが示された。これらより本研究が頭頸部癌におけるウイルス療法の臨床応用への基盤になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have successfully established a new oral carcinoma cell line, NMOC1, that can be used to form tongue tumors in a mouse model. We have also demonstrated the oncolytic activity of HF10 in tongue tumor models. HF10 replicated in the tumor cells and killed oral carcinoma cells in vitro and in vivo. Immunohistochemical staining showed that HF10 induced infiltration of tumor infiltrating lymphocyte in the tumor mass, implying increased anti-tumor immunity.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：腫瘍溶解ウイルス 口腔癌マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

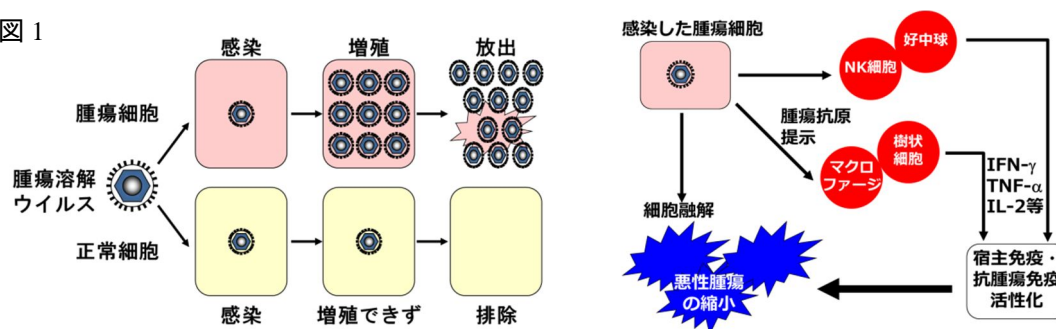
(1) 頭頸部癌治療の現状

頭頸部には呼吸、摂食、発声、味覚、聴覚、嗅覚など社会生活を営む上で重要な器官が集まる。頭頸部癌では手術、放射線治療、薬物療法による集学的治療が行われる。しかし、腫瘍や治療による上記機能障害は日常生活、社会生活での QOL の低下につながる。再建手術や放射線治療は進歩しているが、治療後の QOL が著しく低下する症例も多く存在する。また再発・遠隔転移を来す症例では、多くの場合制御は困難で、新規治療法の開発が望まれる。

(2) 腫瘍溶解ウイルス療法 (Oncolytic Virotherapy)

近年の遺伝子工学技術の進歩により、正常組織に対する病原性を排除し、癌細胞特異的に増殖し、破壊するウイルス治療が可能になってきた(図1)。研究者の共同研究先の名古屋大学医学部ウイルス学教室では、自然発生弱毒株から分離された単純ヘルペスウイルス1型である HF10 という抗腫瘍ウイルスを開発し、HF10 が多くの癌細胞株で増殖性が非常に高く、マウス腫瘍モデルにも優れた抗腫瘍性を示すことを報告してきた。また HF10 は腫瘍に直接、接種するが、接種した腫瘍への抗腫瘍効果だけでなく、接種により抗腫瘍免疫が誘導され、HF10 を接種していない腫瘍にも抗腫瘍効果を発揮することを報告した。

図1



(3) 頭頸部癌への新規治療法として腫瘍溶解ウイルス療法は新たな候補になるか?

ウイルス療法は腫瘍への局所投与という治療形態のため、低侵襲で、QOL を維持したまま治療が可能である。頭頸部癌は腫瘍への局所投与が容易であり、抗腫瘍ウイルス療法に適している癌種といえる。また正常組織への病原性を排除しており、重大な副作用が生じず、高齢者など標準治療が困難な症例に対しても治療選択肢となり得る。腫瘍溶解ウイルスは従来の治療と異なる機序で抗腫瘍効果を示すため、頭頸部癌の新規治療薬の選択肢となる可能性が高い。

2. 研究の目的

(1) 新たな頭頸部癌モデルマウスの樹立と HF10 の抗腫瘍効果の検討

頭頸部癌においては動物由来の癌細胞株や動物モデルが樹立されていない。そのためマウス腹壁由来の癌細胞株である SCC-VII による皮下腫瘍モデルが頭頸部癌の研究に代用されてきたが、臨床における頭頸部癌の実情を十分に反映していないと思われた。したがって本研究では動物由来の新たな頭頸部癌モデルマウスを樹立することが一つ目の目的である。また頭頸部癌への抗腫瘍ウイルスの効果を実験等で検討した前臨床的な研究もわずかしかなく、樹立した頭頸部癌モデルマウスにおける HF10 の抗腫瘍効果を検討することが二つ目の目的である。

3. 研究の方法

(1) 頭頸部癌モデルマウスの樹立と HF10 の抗腫瘍効果の検討

本研究では発癌作用を持つ薬剤 4NQO (4-ニトロキノリン-1-オキシド) を 4 週間、C3H マウスの舌に局所投与し舌腫瘍を誘導した。舌腫瘍について免疫染色などを施行し病理学的に評価した。この腫瘍よりマウス由来の舌扁平上皮癌細胞株 (以下 NMOC1 細胞) を樹立し、さらに NMOC1 細胞をマウスの舌に接種し腫瘍形成能を評価した。これにより舌癌モデルマウスを作成する。本研究ではさらにこの舌扁平上皮癌細胞株や舌癌モデルマウスを利用して HF10 の抗腫瘍効果を in vitro、in vivo の両面から検討した。

(2) HF10 により誘導された抗腫瘍免疫を評価 (メカニズムの解析)

HF10 による治療を行った後に腫瘍を採取し、組織切片を作成する。免疫染色を行い、治療により腫瘍内、周囲に CD8+ T cell、CD4+ T cell などが認められるかを検討する。

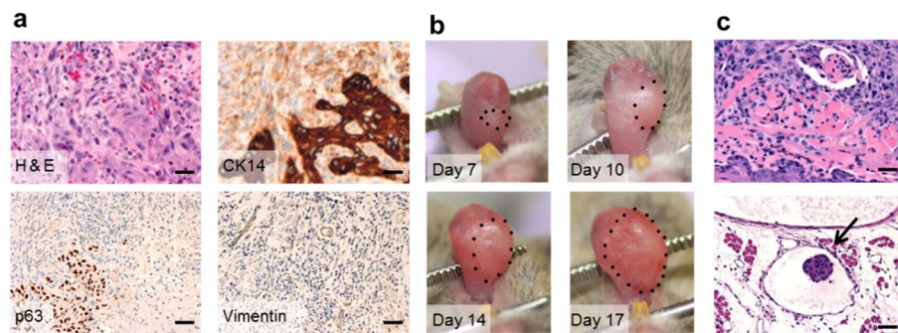
4. 研究成果

(1) 頭頸部癌モデルマウスの樹立

4NQO を 4 週間、C3H マウスの舌に局所投与し舌腫瘍を誘導した。腫瘍を採取し、病理学的に

評価すると、CK14、p63 は陽性であり、組織学的にも扁平上皮癌の所見を認めた（図 2a）。この腫瘍よりマウス由来の舌扁平上皮癌細胞株（以下 NMOC1 細胞）を樹立した。さらに NMOC1 細胞を 1×10^6 個マウスの舌に接種し腫瘍形成能を評価したところ、接種後 7 日以内に腫瘍形成を確認でき、また経時的な増大も認めた（図 2b）。形成された腫瘍を病理学的に評価すると、腫瘍は内舌筋への浸潤とリンパ管への転移を認めた（図 2c）。以上より我々は新たなマウス由来の口腔癌細胞株 NMOC1 を樹立し、また舌癌マウスモデルを確立した。この舌癌マウスモデルは安定して形成され、また正常な免疫能を持つ独自の口腔癌モデルであり、今後の頭頸部癌基礎研究に応用が可能と考えられた。

図 2



(2) 頭頸部癌モデルマウスにおける HF10 の抗腫瘍効果の検討

まず *in vitro* における HF10 の抗腫瘍効果を検討したところ、NMOC1 細胞において HF10 は良好に増殖し、また良好な殺細胞効果を示した。また、舌癌の臨床検体からヒト舌扁平上皮癌細胞株を分離・培養したところ、HF10 はこれらの細胞でも良好に増殖し殺細胞効果を示した（図 3、図 4）。

図 3 HF10 の殺細胞効果

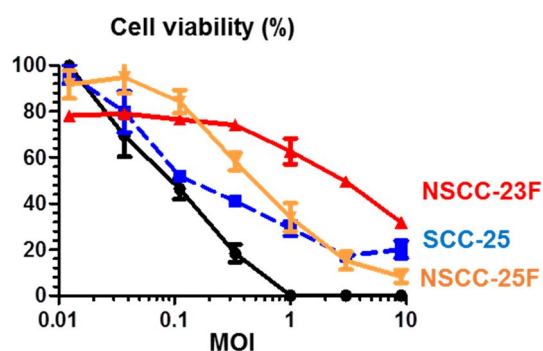
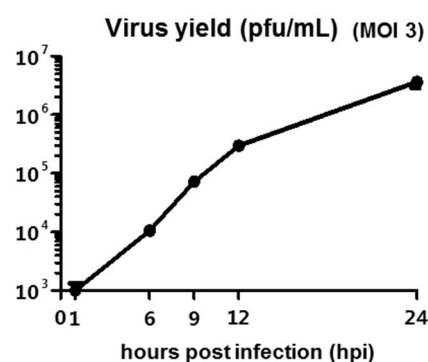
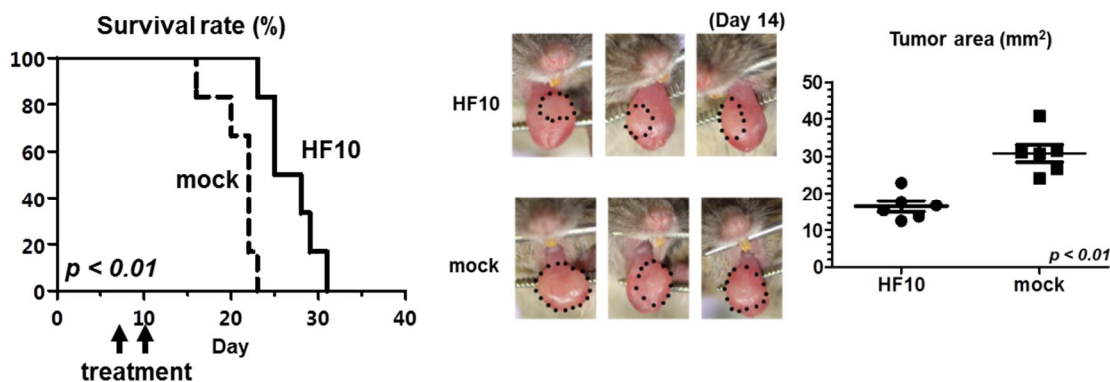


図 4 HF10 の増殖能



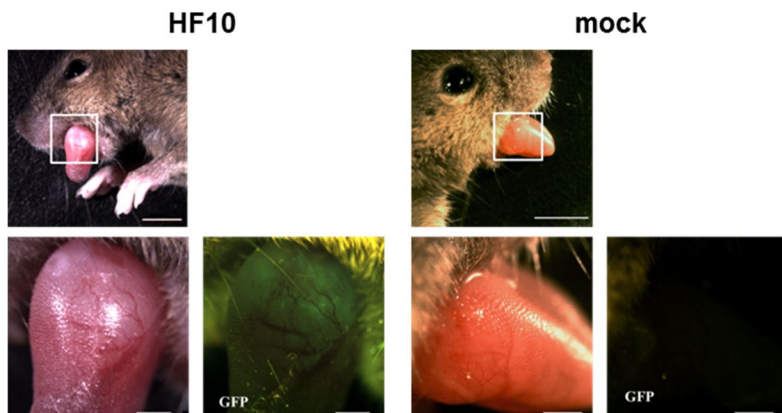
続いて *in vivo* における HF10 の抗腫瘍効果を検討するため、NMOC1 細胞を用いた舌癌マウスモデルを作成し、HF10 の抗腫瘍効果を検討した。NMOC1 細胞 (1×10^6 個) をマウスの舌に接種し舌腫瘍を作成し、舌腫瘍内に HF10 を接種したところ、HF10 治療群はコントロール群と比較して、腫瘍成長の抑制効果や生存率の改善を認めた（図 5）。

図 5 頭頸部癌モデルマウスにおける HF10 の抗腫瘍効果



また HF10 が舌腫瘍に感染していることを確認するため、GFP 遺伝子を組み込んだ HF10 を腫瘍に接種し 24 時間後に蛍光顕微鏡で観察したところ、舌腫瘍内にのみ GFP の発現が認められ、HF10 が舌腫瘍特異的に分布していることが確認できた (図 6)。

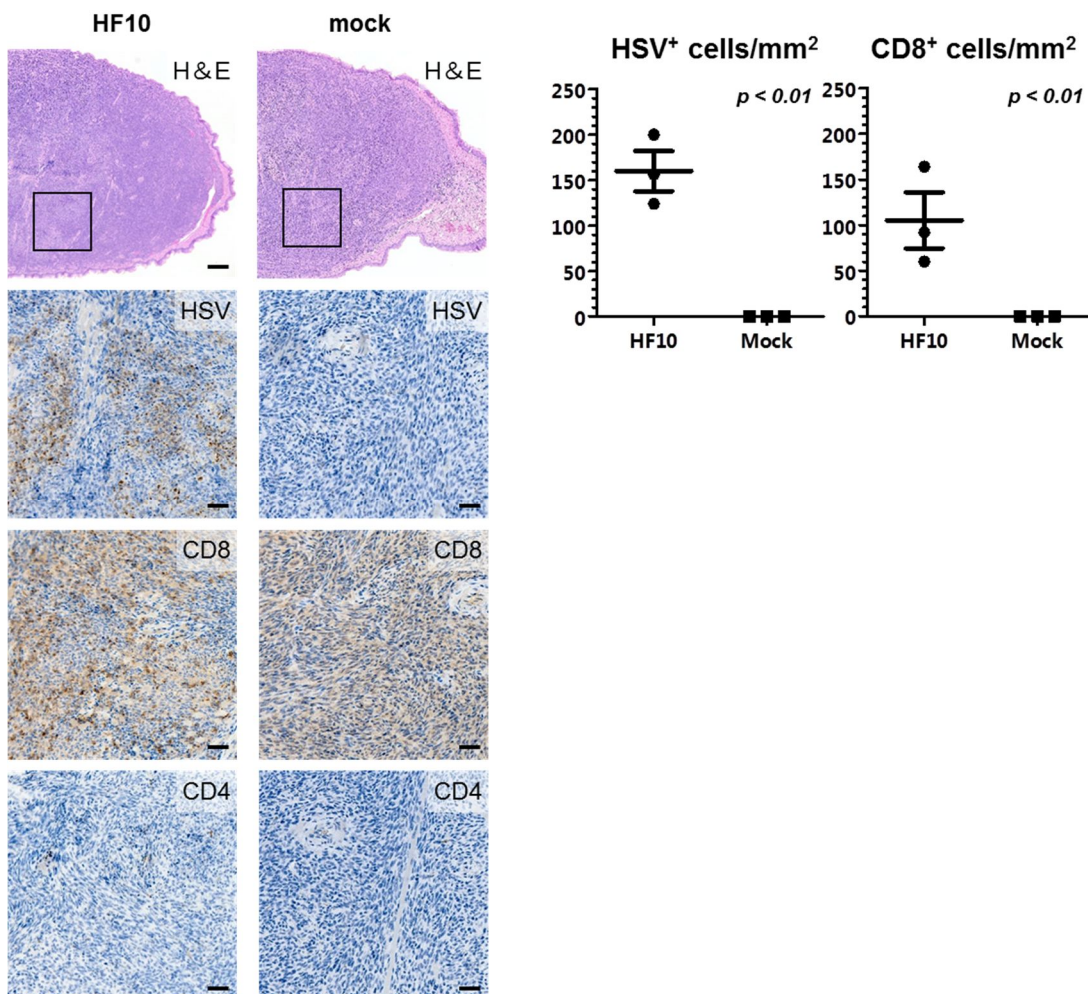
図 6 頭頸部癌モデルマウスにおける HF10 の増殖能の評価



(3) HF10 により誘導された抗腫瘍免疫の評価 (メカニズムの解析)

HF10 治療により誘導された腫瘍内浸潤リンパ球を評価するため、HF10 接種の 24 時間後に舌腫瘍を採取し、病理組織学的に評価した。HF10 治療群では HSV 抗原が認められる区域に腫瘍細胞の壊死を認め、その周囲に CD8 陽性 T 細胞が浸潤していた (図 7)。

図 7 HF10 治療により誘導された腫瘍内浸潤リンパ球の評価



(4) まとめ

今回、我々は新たなマウス由来の口腔癌細胞株 NMOC1 を樹立し、また舌癌マウスモデルを確立した。この舌癌マウスモデルは安定して形成され、また正常な免疫能を持つ独自の口腔癌モデルであり、今後の頭頸部癌基礎研究に応用が可能と考えられた。また口腔癌マウスモデルにおける HF10 の治療効果を評価したところ、HF10 は腫瘍細胞で増殖し、in vitro、in vivo 共に良好な抗腫瘍効果を認めた。さらに腫瘍内浸潤リンパ球の変化を認めており、HF10 による抗腫瘍免疫の増強が示唆された。これらの結果から HF10 が口腔癌の治療に有望な薬剤であることが示された。

< 引用文献 >

Takano G, Esaki S, Goshima F, Enomoto A, Hatano Y, Ozaki H, Watanabe T, Sato Y, Kawakita D, Murakami S, Murata T, Nishiyama Y, Iwasaki S, Kimura H. Oncolytic activity of naturally attenuated herpes-simplex virus HF10 against an immunocompetent model of oral carcinoma. Mol. Ther. Oncolytics 20, 2020, 220-227.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takano G, Esaki S, Goshima F, Enomoto A, Hatano Y, Ozaki H, Watanabe T, Sato Y, Kawakita D, Murakami S, Murata T, Nishiyama Y, Iwasaki S, Kimura H.	4. 巻 20
2. 論文標題 Oncolytic activity of naturally attenuated herpes-simplex virus HF10 against an immunocompetent model of oral carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol. Ther. Oncolytics	6. 最初と最後の頁 220-227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omto.2020.12.007.	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 -

〔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 高野学、江崎伸一、五島典、今泉冴恵、岩城翔、的場琢磨、川北大介、村上信五、岩崎真一
2. 発表標題 口腔癌マウスモデルにおける腫瘍溶解ウイルスHF10の抗腫瘍効果
3. 学会等名 第44回 日本頭頸部癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野学、江崎伸一、岩城翔、小栗恵介、的場琢磨、川北大介、村上信五
2. 発表標題 マウス口腔癌における腫瘍溶解ウイルスHF10とオキサリプラチンの抗腫瘍効果
3. 学会等名 第43回 日本頭頸部癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Gaku Takano, Fumi Goshima, Shinichi Esaki, Takahiro Watanabe, Yoshitaka Sato, Takayuki Murata, Yukihiro Nishiyama, Hiroshi Kimura
2. 発表標題 The efficacy of oncolytic HSV-1 HF10 for head and neck carcinoma
3. 学会等名 第67回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究協力者	江崎 伸一 (Esaki Shinichi) (20620983)	名古屋市立大学・耳鼻咽喉・頭頸部外科・講師 (23903)	
研究協力者	五島 典 (Goshima Fumi)	名古屋大学・ウイルス学・講師 (13901)	

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